

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 626**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 47/61 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2011 PCT/US2011/045873**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12016131**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2011 E 11741727 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2598172**

54 Título: **Catalizadores nucleofílicos para enlace oxima**

30 Prioridad:

30.07.2010 US 369186 P

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

18.11.2019

73 Titular/es:

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)
1200 Lakeside Drive
Bannockburn, IL 60015, US y
BAXALTA GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SIEKMANN, JUERGEN;
HAIDER, STEFAN;
ROTTENSTEINER, HANSPETER;
IVENS, ANDREAS;
TURECEK, PETER y
ZOECHLING, OLIVER**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 731 626 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

Catalizadores nucleofílicos para enlace oxima

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para conjugar un polímero soluble en agua con una proteína.

10 **Antecedentes de la invención**

10 La preparación de conjugados formando un enlace covalente entre el polímero soluble en agua y la proteína terapéutica puede llevarse a cabo mediante una variedad de métodos químicos. La pegilación de fármacos polipeptídicos los protege en la circulación y mejora sus perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos (Harris y Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003;2:214-21). El proceso de pegilación une unidades de repetición de etilenglicol (polietilenglicol (PEG)) a un fármaco polipeptídico. Las moléculas de PEG tienen un gran volumen hidrodinámico (5 - 15 10 veces el tamaño de proteínas globulares), son muy solubles en agua e hidratadas, no tóxicas, no inmunogénicas y se eliminan rápidamente del cuerpo. La pegilación de moléculas puede conducir a resistencia aumentada de fármacos a degradación enzimática, semivida aumentada *in vivo*, frecuencia de dosificación reducida, inmunogenicidad disminuida, estabilidad física y térmica aumentada, solubilidad aumentada, estabilidad líquida 20 aumentada y agregación reducida. Los primeros fármacos pegilados los aprobó la FDA a comienzos de los años noventa. Desde entonces, la FDA ha aprobado varios fármacos pegilados para administración oral, inyectable y tópica.

25 El ácido polisialílico (PSA), también denominado ácido colomínico (CA), es un polisacárido que se produce de manera natural. Es un homopolímero de ácido N-acetilneuramínico con enlace $\alpha(2\rightarrow8)$ cetosídico y contiene grupos diol vecinales en su extremo no reductor. Está cargado negativamente y es un constituyente natural del cuerpo humano. Puede producirse fácilmente a partir de bacterias en grandes cantidades y con características físicas predeterminadas (patente estadounidense n.º 5.846.951). Debido a que el PSA producido por bacterias es química 30 inmunológicamente idéntico a PSA producido en el cuerpo humano, el PSA bacteriano no es inmunogénico, incluso cuando se acopla a proteínas. Al contrario que algunos polímeros, el ácido PSA es biodegradable. El acoplamiento covalente de ácido colomínico con catalasa y asparaginasa ha demostrado aumentar la estabilidad enzimática en presencia de enzimas proteolíticas o plasma sanguíneo. Estudios comparativos *in vivo* con asparaginasa polisialilada y no modificada revelaron que la polisialilación aumentó la semivida de la enzima (Fernandes y Gregoriadis, Int J Pharm. 2001;217:215-24).

35 El acoplamiento de derivados de PEG con péptidos o proteínas lo revisan Roberts *et al.* (Adv Drug Deliv Rev 2002;54:459-76). Un enfoque para el acoplamiento de polímeros solubles en agua con proteínas terapéuticas es la conjugación de los polímeros por medio de los restos de hidrato de carbono de la proteína. Pueden oxidarse fácilmente grupos hidroxilo vecinales (OH) de hidratos de carbono en proteínas con peryodato de sodio (NaIO₄) para 40 formar grupos aldehído activos (Rothfus et Smith, J Biol Chem 1963; 238:1402-10; van Lenten et Ashwell, J Biol Chem 1971;246:1889-94). Posteriormente, el polímero puede acoplarse a los grupos aldehído del hidrato de carbono mediante el uso de reactivos que contienen, por ejemplo, un grupo hidrazida activo (Wilchek M y Bayer EA, Methods Enzymol 1987; 138:429-42). Una tecnología más reciente es el uso de reactivos que contienen grupos aminoóxilo que reaccionan con aldehídos para formar enlaces oxima (documentos WO 96/40662, WO2008/025856).

45 Ejemplos adicionales que describen la conjugación de un polímero soluble en agua con una proteína terapéutica se describen en el documento WO 06/071801 que enseña la oxidación de restos de hidrato de carbono en el factor de Von Willebrand y posterior acoplamiento a PEG usando química de hidrazida; publicación estadounidense n.º 2009/0076237 que enseña la oxidación de rFVIII y posterior acoplamiento a PEG y otros polímeros solubles en agua 50 (por ejemplo PSA, HES, dextrano) usando química de hidrazida; documento WO 2008/025856 que enseña la oxidación de diferentes factores de coagulación, por ejemplo rFIX, FVIII y FVIIa y posterior acoplamiento a, por ejemplo, PEG, usando química de aminoóxilo formando un enlace oxima; y patente estadounidense n.º 5.621.039 que enseña la oxidación de FIX y posterior acoplamiento a PEG usando química de hidrazida. El documento WO94/28024 divulga un método de formación de un enlace hidrazida entre PEG y EPO oxidados que tienen un grupo hidrazida activo.

55 Recientemente, se describió un método mejorado que comprende oxidación con peryodato suave de ácidos siálicos para generar aldehídos seguido por reacción con un grupo aminoóxilo que contiene reactivo en presencia de cantidades catalíticas de anilina (Dirksen A., y Dawson PE, Bioconjugate Chem. 2008;19,2543-8; y Zeng Y *et al.*, Nature Methods 2009;6:207-9). La catálisis de anilina acelera drásticamente la ligación de oxima, permitiendo el uso de concentraciones muy bajas del reactivo. El uso de catalizadores nucleofílicos también se describe en Dirksen, A., *et al.*, J Am Chem Soc., 128:15602-3 (2006); Dirksen, A., *et al.*, Angew chem. Int Ed., 45:7581-4 (2006); Kohler, J.J., ChemBioChem., 10:2147-50 (2009); Giuseppone, N., *et al.*, J Am Chem Soc., 127:5528-39 (2005); y Thygesen, M.B., *et al.*, J Org Chem., 75:1752-5 (2010).

65 Aunque la catálisis de anilina puede acelerar la ligación de oxima permitiendo tiempos de reacción cortos y el uso de

concentraciones muy bajas del reactivo de aminoóxido, la anilina tiene propiedades tóxicas que deben considerarse cuando, por ejemplo, la proteína terapéutica conjugada forma la base de un producto farmacéutico. Por ejemplo, se ha demostrado que la anilina induce metemoglobinemia (Harrison, J.H., y Jollow, D.J., *Molecular Pharmacology*, 32(3) 423-431, 1987). El tratamiento nutritivo a largo plazo de ratas ha demostrado que induce tumores en el bazo (Goodman, DG., *et al.*, *J Natl Cancer Inst.*, 73(1):265-73, 1984). Los estudios *in vitro* también han demostrado que la anilina tiene el potencial de inducir mutaciones cromosómicas y tiene la posiblemente actividad genotóxica (Bombhard E.M. et Herbold B, *Critical Reviews in Toxicology* 35,783-835, 2005).

Considerando las propiedades posiblemente peligrosas de la anilina y a pesar de los métodos disponibles de conjugación de polímeros solubles en agua con proteínas terapéuticas, permanece la necesidad de desarrollar materiales y métodos para conjugar polímeros solubles en agua con proteínas que mejoran las propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas de la proteína mientras se minimizan los costes asociados con los diversos reactivos y se minimizan los riesgos para la salud del paciente receptor.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para conjugar polímeros con proteínas que mejoran las propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas de la proteína mientras se minimizan los costes asociados con los diversos reactivos y los riesgos para la salud de los pacientes receptores cuando la reacción de conjugación se cataliza mediante un catalizador nucleofílico. En diversas realizaciones de la invención, se proporciona el catalizador alternativo m-toluidina para sustituir anilina. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones.

En una realización, se proporciona un método de conjugación de un polímero soluble en agua con un resto de hidrato de carbono oxidado de una proteína terapéutica que comprende poner en contacto el resto de hidrato de carbono oxidado con un polímero soluble en agua activado en condiciones que permiten la conjugación; conteniendo dicho polímero soluble en agua un grupo aminoóxido activo y se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, R.U.), ácido polisialílico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, dextrano, carboximetil-dextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolina, poliacriloilmorfolina, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico y poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal) (PHF); y dicho resto de hidrato de carbono oxidado mediante incubación con un tampón que comprende un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en peryodato de sodio NaIO_4 , tetraacetato de plomo $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ y perrutenato de potasio (KRuO_4); en el que se forma un enlace oxima entre el resto de hidrato de carbono oxidado y el grupo aminoóxido activo en el polímero soluble en agua; y en el que dicha formación de enlace oxima se cataliza mediante el catalizador nucleofílico m-toluidina.

En otra realización, se proporciona un método de conjugación de un polímero soluble en agua con un resto de hidrato de carbono oxidado de una proteína terapéutica que comprende poner en contacto el resto de hidrato de carbono oxidado con un polímero soluble en agua activado en condiciones que permiten la conjugación; dicha proteína terapéutica seleccionada del grupo que consiste en factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de Von Willebrand (VWF), factor V (FV), factor X (FX), factor XI (FXI), factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (TF), proteasa ADAMTS13, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor 1 estimulante de colonias (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), EPO, interferón-alfa (IFN-alfa), interferón de consenso, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-omega, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombotopoyetina (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, polipéptido 1 de tipo angiopoyetina (ANGPTL1), polipéptido 2 de tipo angiopoyetina (ANGPTL2), polipéptido 3 de tipo angiopoyetina (ANGPTL3), polipéptido 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4), polipéptido 5 de tipo angiopoyetina (ANGPTL5), polipéptido 6 de tipo angiopoyetina (ANGPTL6), polipéptido 7 de tipo angiopoyetina (ANGPTL7), vitronectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína 1 morfogenética de hueso, proteína 2 morfogenética de hueso, proteína 3 morfogenética de hueso, proteína 4 morfogenética de hueso, proteína 5 morfogenética de hueso, proteína 6 morfogenética de hueso, proteína 7 morfogenética de hueso, proteína 8 morfogenética de hueso, proteína 9 morfogenética de hueso, proteína 10 morfogenética de hueso, proteína 11 morfogenética de hueso, proteína 12 morfogenética de hueso, proteína 13 morfogenética de hueso, proteína 14 morfogenética de hueso, proteína 15 morfogenética de hueso, receptor IA de proteína morfogenética de hueso, receptor IB de proteína morfogenética de hueso, receptor II de proteína morfogenética de hueso, factor neurotrófico derivado de cerebro, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, receptor de factor neurotrófico ciliar, cripto, críptico, factor 1 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor 2α quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor 2β quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor β de crecimiento de células endoteliales, endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, epígeno, epiregulina, atrayente de neutrófilos derivados de epitelio, factor 4 de crecimiento de fibroblastos, factor 5 de crecimiento de fibroblastos, factor 6 de crecimiento de fibroblastos, factor 7 de crecimiento de fibroblastos, factor 8 de crecimiento de fibroblastos, factor 8b de crecimiento de fibroblastos, factor 8c de crecimiento de fibroblastos, factor 9 de crecimiento de fibroblastos, factor 10 de crecimiento de fibroblastos, factor 11 de crecimiento de fibroblastos, factor 12 de crecimiento de fibroblastos, factor 13 de crecimiento de fibroblastos, factor 16 de crecimiento de fibroblastos, factor 17 de crecimiento de fibroblastos, factor 19 de crecimiento de

fibroblastos, factor 20 de crecimiento de fibroblastos, factor 21 de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor α 1 de factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, receptor α 2 de factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, proteína relacionada con el crecimiento, proteína α relacionada con el crecimiento, proteína β relacionada con el crecimiento, proteína γ relacionada con el crecimiento, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de hepatoma, factor I de crecimiento de tipo insulina, receptor de factor de crecimiento de tipo insulina, factor II de crecimiento de tipo insulina, proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor α de factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento nervioso, receptor de factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina-3, neurotrofina-4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento de placenta, factor 2 de crecimiento de placenta, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor AA de crecimiento derivado de plaquetas, factor AB de crecimiento derivado de plaquetas, cadena B de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor BB de crecimiento derivado de plaquetas, receptor α de factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor β de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor de factor de células madre, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, factor α de crecimiento transformante, factor de crecimiento transformante β , factor β 1 de crecimiento transformante, factor β 1.2 de crecimiento transformante, factor β 2 de crecimiento transformante, factor β 3 de crecimiento transformante, factor β 5 de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante latente, proteína I de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína II de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína III de unión a factor β de crecimiento transformante, linfopoyetina estromal tímica (TSLP), receptor de factor de necrosis tumoral tipo I, receptor de factor de necrosis tumoral tipo II, receptor activador de plasminógeno de tipo urocinasa, proteína activadora de fosfolipasa (PUP), insulina, lectina, ricina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimuladora de folículos, hormona estimuladora de la tiroides, activador de plasminógeno tisular, IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, α -galactosidasa, β -galactosidasa, ADNasa, fetuina, hormona luteinizante, estrógeno, albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, transferrina, trombopoyetina, urocinasa, integrina, trombina, leptina, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanercept), una proteína de la tabla 1, o un fragmento, derivado o variante de los mismos biológicamente activo; conteniendo dicho polímero soluble en agua un grupo aminoóxilo activo y se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, R.U.), ácido polisialílico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, dextrano, carboximetil-dextrano, poli(óxido de alquileño) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolina, poli(acrililomorfolina), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico, y poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal) (PHF); y dicho resto de hidrato de carbono oxidado mediante incubación con un tampón que comprende un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en peryodato de sodio (NIO₄), tetraacetato de plomo (Pb(OAc)₄) y perrutenato de potasio (KRuO₄); en el que se forma un enlace oxima entre el resto de hidrato de carbono oxidado y el grupo aminoóxilo activo en el polímero soluble en agua; y en el que en dicha oxima la formación de enlace se cataliza mediante un catalizador nucleofílico m-toluidina.

En todavía otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que una disolución que comprende una concentración inicial de la proteína terapéutica entre aproximadamente 0,3 mg/ml y aproximadamente 3,0 mg/ml se ajusta a un valor de pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0 antes de ponerse en contacto con el polímero soluble en agua activado.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa un valor por encima o por debajo de un valor mencionado. En diversas realizaciones, el término "aproximadamente" incluye el valor mencionado más o menos el 0,1, el 0,2, el 0,3, el 0,4, el 0,5, el 0,6, el 0,7, el 0,8, el 0,9, el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9 o el 10% del valor mencionado.

En aún otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la concentración inicial de la proteína terapéutica es de aproximadamente 1,0 mg/ml y el pH es de aproximadamente 6,0. En una realización relacionada, la concentración inicial de la proteína terapéutica es de aproximadamente 0,75 mg/ml y el pH es de aproximadamente 6,0. En todavía otra realización relacionada, la concentración inicial de la proteína terapéutica es de aproximadamente 1,25 mg/ml y el pH es de aproximadamente 6,0.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la proteína terapéutica se pone en contacto con una concentración en exceso deseada de polímero soluble en agua activado, en el que la concentración en exceso es un exceso de aproximadamente 1 molar y aproximadamente 300 molar. En otra realización, la concentración en exceso es un exceso molar de aproximadamente 50 veces.

En todavía otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la proteína terapéutica se incuba con el polímero soluble en agua activado en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,5 horas y aproximadamente 24 horas; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación. En otra realización, las condiciones

comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 120 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz; y con agitación. Tal como se usa en el presente documento, el término "agitación" se pretende que incluya agitación a diversas velocidades e intensidades (por ejemplo, agitación suave) mediante productos y equipos de fabricación o laboratorio usados comúnmente.

5 En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el catalizador nucleofílico se añade en una cantidad para dar como resultado una concentración final de catalizador nucleofílico de entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 50 mM, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,1 minutos y aproximadamente 30 minutos; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación. En otra realización, la concentración final del catalizador nucleofílico es de aproximadamente 10 mM, y las condiciones comprenden un periodo de tiempo de hasta aproximadamente 15 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz; y con agitación.

15 En todavía otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el agente oxidante se añade en una cantidad para dar como resultado una concentración final de agente oxidante entre aproximadamente 50 μ M y aproximadamente 1000 μ M, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,1 minutos y 120 minutos; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación. En otra realización, la concentración final de agente oxidante es de aproximadamente 400 μ M, y las condiciones comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 10 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz y con agitación.

25 En aún otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la conjugación del polímero soluble en agua con el resto de hidrato de carbono oxidado de la proteína terapéutica se detiene mediante la adición de un agente de extinción seleccionado del grupo que consiste en L-cisteína, metionina, glutatión, glicerol, metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), triptófano, tirosina, histidina o derivados de los mismos, cresol, imidazol, y combinaciones de los mismos; en el que el agente de extinción se añade en una cantidad para dar como resultado una concentración final de agente de extinción entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 120 minutos; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación. En otra realización, el agente de extinción es L-cisteína. En todavía otra realización, la L-cisteína se añade para dar como resultado una concentración final de aproximadamente 10 mM y las condiciones comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 60 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz y con agitación.

35 En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente que comprende: a) una primera etapa que comprende ajustar el valor de pH de una disolución que comprende la proteína terapéutica a un valor de pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, en la que la concentración de proteína terapéutica es de entre aproximadamente 0,3 mg/ml y aproximadamente 3,0 mg/ml; b) una segunda etapa que comprende oxidar uno o más hidratos de carbono en la proteína terapéutica, en la que el agente oxidante se añade a la disolución en la primera etapa para dar como resultado una concentración final de entre aproximadamente 50 μ M y aproximadamente 1000 μ M, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,1 minutos y aproximadamente 120 minutos; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz, y con o sin agitación; c) una tercera etapa que comprende poner en contacto la proteína terapéutica con una concentración en exceso deseada de polímero soluble en agua activado, en la que la concentración en exceso es un exceso entre aproximadamente 1 molar y aproximadamente 300 molar, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,5 horas y aproximadamente 24 horas, una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación; d) una cuarta etapa que comprende añadir un catalizador nucleofílico a la disolución de la tercera etapa, en la que el catalizador nucleofílico se añade para dar como resultado una concentración final de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 50 mM, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,1 minutos y aproximadamente 30 minutos; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz, y con o sin agitación; e) una quinta etapa en la que la proteína terapéutica se incuba con el polímero soluble en agua activado y catalizador nucleofílico en condiciones que permiten la conjugación del polímero soluble en agua activado con uno o más hidratos de carbono oxidados en la proteína terapéutica, comprendiendo dichas condiciones un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,5 horas y aproximadamente 24 horas, una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz, y con o sin agitación; y f) una sexta etapa en la que la conjugación del polímero soluble en agua con el uno o más hidratos de carbono oxidados de la proteína terapéutica en la quinta etapa se detiene mediante la adición de un agente de extinción seleccionado del grupo que consiste en L-cisteína, metionina, glutatión, glicerol, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (metabisulfito de sodio), triptófano, tirosina, histidina o derivados de los mismos, cresol, imidazol, y combinaciones de los mismos; en la que el agente de extinción se añade para dar como resultado una concentración final de aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 120 minutos; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz, y con o sin agitación. En otra realización, la concentración inicial de la proteína terapéutica en la primera etapa es de aproximadamente 1 mg/ml y

el pH es de aproximadamente 6,0; en la que la concentración final de agente oxidante en la segunda etapa es de aproximadamente 400 μM , y las condiciones comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 10 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz y con agitación; en la que la concentración en exceso en la tercera etapa es un exceso de aproximadamente 50 molar; en la que las condiciones en la tercera etapa comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 15 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz y con agitación; en la que la concentración final del catalizador nucleofílico en la cuarta etapa es de aproximadamente 10 mM, y las condiciones en la cuarta etapa comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 15 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz y con agitación; en la que las condiciones de incubación de la proteína terapéutica con el polímero soluble en agua activado y catalizador nucleofílico en la quinta etapa comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 2 horas; una temperatura de aproximadamente 22°C; ausencia de luz; y con agitación; y en la que el agente de extinción en la sexta etapa es L-cisteína; y en la que la L-cisteína se añade para dar como resultado una concentración final de aproximadamente 10 mM y las condiciones en la sexta etapa comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 60 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz y con agitación.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el polímero soluble en agua es PSA. En otra realización, el PSA está comprendido por aproximadamente 10 - 300 unidades de ácido siálico. En otra realización, el polímero soluble en agua es PEG.

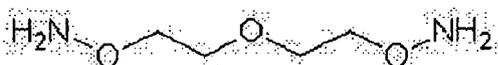
En todavía otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la proteína terapéutica es FIX. En otra realización, la proteína terapéutica es FVIIa. En otra realización, la proteína terapéutica es FVIII.

En aún otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el agente oxidante es peryodato de sodio (NaIO_4).

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el resto de hidrato de carbono oxidado de la proteína terapéutica se ubica en el péptido de activación de la proteína de la coagulación sanguínea.

En una realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que se prepara PSA haciendo reaccionar un ligador de aminoóxilo activado con PSA oxidado; en el que el ligador de aminoóxilo se selecciona del grupo que consiste en:

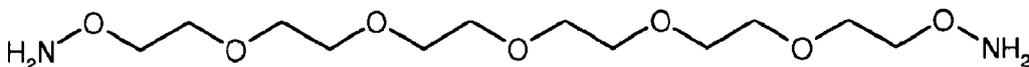
a) un ligador de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina de fórmula:



b) un ligador de 3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina de fórmula:



c) un ligador de 3,6,9,12,15-penatoxa-heptadecano-1,17-dioxiamina de fórmula:



en el que el PSA se oxida mediante incubación con un agente oxidante para formar un grupo aldehído terminal en el extremo no reductor del PSA. En una realización relacionada, el ligador de aminoóxilo es 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina.

En todavía otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el agente oxidante es NaIO_4 .

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el catalizador nucleófilo m-toluidina se proporciona a una concentración de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 50 mM. En todavía otra realización, la m-toluidina está presente en la reacción de conjugación a una concentración de aproximadamente 10 mM.

En aún otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente que comprende además la etapa de reducir un enlace oxima en la proteína terapéutica conjugada incubando la proteína terapéutica conjugada en un tampón que comprende un compuesto reductor seleccionado del grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3), ácido ascórbico (vitamina C) y NaBH_3 . En una realización, el compuesto reductor es cianoborohidruro

de sodio (NaCNBH_3).

5 En todavía otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente que comprende además la etapa de purificar la proteína terapéutica conjugada. En otra realización, la proteína terapéutica conjugada se purifica mediante un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía, filtración y precipitación. En otra
10 realización, la cromatografía se selecciona del grupo que consiste en cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), cromatografía de exclusión molecular (SEC), cromatografía de afinidad y cromatografía de fase inversa. En todavía otra realización, se usa una sal anticaotrópica en una etapa de carga de cromatografía y en una etapa de lavado de cromatografía. En aún otra realización, la cromatografía tiene lugar en una columna. En otra realización, la columna comprende una resina de cromatografía seleccionada del grupo que
15 consiste en Phenyl-Sepharose FF y Butyl-Sepharose FF. En otra realización, la resina está presente en la columna a una altura de lecho de entre aproximadamente 5 cm y aproximadamente 20 cm. En una realización, la altura de lecho es de aproximadamente 10 cm.

20 En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente que comprende una o más etapas de lavado en las que la dirección de flujo se establece en flujo ascendente y en las que la velocidad de flujo es de entre aproximadamente 0,2 cm/min y aproximadamente 6,7 cm/min. Tal como se usa en el presente documento, el término "flujo descendente" se refiere a una dirección de flujo desde la parte superior de la columna cromatográfica hasta la parte inferior de la columna cromatográfica (dirección de flujo normal / modo convencional). Tal como se usa
25 en el presente documento, el término "flujo ascendente" se refiere a una dirección de flujo desde la parte inferior hasta la parte superior de la columna (dirección de flujo inversa). En una realización, la velocidad de flujo es de aproximadamente 2 cm/min.

30 En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente que comprende una o más etapas de elución en las que la dirección de flujo se establece en flujo descendente y en las que la velocidad de flujo es de entre aproximadamente 0,1 cm/min y aproximadamente 6,7 cm/min. En una realización relacionada, la velocidad de flujo es de aproximadamente 1 cm/min.

35 En todavía otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente que comprende concentrar la proteína terapéutica conjugada mediante ultra/diafiltración (UF/DF). En otra realización, la concentración final de proteína terapéutica es de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3 mg/ml.

40 En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la proteína terapéutica comprende entre aproximadamente 5 y aproximadamente 11 restos de polímero soluble en agua. En otra realización, la proteína terapéutica comprende entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3 polímeros solubles en agua.

45 En todavía otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la proteína terapéutica conjugada se purifica usando cromatografía; en el que se usa una sal anticaotrópica para una etapa de carga y para una etapa de lavado; comprendiendo el método una o más etapas de lavado en las que la dirección de flujo se establece en flujo ascendente y en las que la velocidad de flujo es de entre aproximadamente 0,2 cm/min y aproximadamente 6,7 cm/min y una o más etapas de elución en las que la dirección de flujo se establece en flujo descendente y en las que la velocidad de flujo es de entre aproximadamente 0,2 cm/min y aproximadamente 6,7 cm/min; que comprende además concentrar la proteína terapéutica conjugada mediante ultra/diafiltración (UF/DF). En otra realización, la cromatografía es cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); en la que la velocidad de flujo de la una o más etapas de lavado es de aproximadamente 2 cm/min; y en la que la velocidad de flujo de la una o más etapas de elución es de aproximadamente 1 cm/min.

50 También se proporciona una proteína terapéutica modificada producida por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente.

55 En todavía otra realización de la invención, se proporciona un método de formación de un enlace oxima entre un resto de hidrato de carbono oxidado en una proteína terapéutica y un polímero soluble en agua activado que contiene un grupo aminoóxilo activo que comprende las etapas de: a) oxidar un resto de hidrato de carbono en una proteína terapéutica incubando dicha proteína con un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en peryodato de sodio (NaIO_4), tetraacetato de plomo ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$) y perrutenato de potasio (KRuO_4); y b) formar un enlace oxima entre el resto de hidrato de carbono oxidado de la proteína terapéutica y el polímero soluble en agua activado que contiene un grupo aminoóxilo activo en presencia de un catalizador nucleofílico en condiciones que permiten la formación de dicho enlace oxima; en el que dicho polímero soluble en agua que contiene un grupo aminoóxilo activo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, R.U.), ácido polisialílico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, dextrano, carboximetil-dextrano, poli(óxido de alquileño) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolina, poli(acrililomorfolina), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico, y poli(1-hidroxi metil etileno hidroximetil formal) (PHF); en el que el catalizador nucleofílico es m-toluidina.

En aún otra realización, se proporciona un método de formación de un enlace oxima entre un resto de hidrato de carbono oxidado en una proteína terapéutica y un polímero soluble en agua activado que contiene un grupo aminooxilo activo que comprende las etapas de: a) oxidar un resto de hidrato de carbono en una proteína terapéutica incubando dicha proteína con un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en peryodato de sodio (NaIO₄), tetraacetato de plomo (Pb(OAc)₄) y perrutenato de potasio (KRuO₄); y b) formar un enlace oxima entre el resto de hidrato de carbono oxidado de la proteína terapéutica y el polímero soluble en agua activado que contiene un grupo aminooxilo activo en presencia de un catalizador nucleofílico en condiciones que permiten la formación de dicho enlace oxima; en el que la proteína terapéutica se selecciona del grupo que consiste en factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de Von Willebrand (VWF), factor V (FV), factor X (FX), factor XI (FXI), factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (TF), proteasa ADAMTS13, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor 1 estimulante de colonias (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), EPO, interferón-alfa (IFN-alfa), interferón de consenso, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-omega, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombopoyetina (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, polipéptido 1 de tipo angiopoyetina (ANGPTL1), polipéptido 2 de tipo angiopoyetina (ANGPTL2), polipéptido 3 de tipo angiopoyetina (ANGPTL3), polipéptido 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4), polipéptido 5 de tipo angiopoyetina (ANGPTL5), polipéptido 6 de tipo angiopoyetina (ANGPTL6), polipéptido 7 de tipo angiopoyetina (ANGPTL7), vitronectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína 1 morfogenética de hueso, proteína 2 morfogenética de hueso, proteína 3 morfogenética de hueso, proteína 4 morfogenética de hueso, proteína 5 morfogenética de hueso, proteína 6 morfogenética de hueso, proteína 7 morfogenética de hueso, proteína 8 morfogenética de hueso, proteína 9 morfogenética de hueso, proteína 10 morfogenética de hueso, proteína 11 morfogenética de hueso, proteína 12 morfogenética de hueso, proteína 13 morfogenética de hueso, proteína 14 morfogenética de hueso, proteína 15 morfogenética de hueso, receptor IA de proteína morfogenética de hueso, receptor IB de proteína morfogenética de hueso, receptor II de proteína morfogenética de hueso, factor neurotrófico derivado de cerebro, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, receptor de factor neurotrófico ciliar, cripto, críptico, factor 1 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor 2 α quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor 2 β quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor β de crecimiento de células endoteliales, endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, epígeno, epiregulina, atrayente de neutrófilos derivados de epitelio, factor 4 de crecimiento de fibroblastos, factor 5 de crecimiento de fibroblastos, factor 6 de crecimiento de fibroblastos, factor 7 de crecimiento de fibroblastos, factor 8 de crecimiento de fibroblastos, factor 8b de crecimiento de fibroblastos, factor 8c de crecimiento de fibroblastos, factor 9 de crecimiento de fibroblastos, factor 10 de crecimiento de fibroblastos, factor 11 de crecimiento de fibroblastos, factor 12 de crecimiento de fibroblastos, factor 13 de crecimiento de fibroblastos, factor 16 de crecimiento de fibroblastos, factor 17 de crecimiento de fibroblastos, factor 19 de crecimiento de fibroblastos, factor 20 de crecimiento de fibroblastos, factor 21 de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor α 1 de factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, receptor α 2 de factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, proteína relacionada con el crecimiento, proteína α relacionada con el crecimiento, proteína β relacionada con el crecimiento, proteína γ relacionada con el crecimiento, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de hepatoma, factor I de crecimiento de tipo insulina, receptor de factor de crecimiento de tipo insulina, factor II de crecimiento de tipo insulina, proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor α de factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento nervioso, receptor de factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina-3, neurotrofina-4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento de placenta, factor 2 de crecimiento de placenta, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor AA de crecimiento derivado de plaquetas, factor AB de crecimiento derivado de plaquetas, cadena B de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor BB de crecimiento derivado de plaquetas, receptor α de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor β de crecimiento derivado de plaquetas receptor, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor de factor de células madre, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, factor α de crecimiento transformante, factor β de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante, factor β 1.2 de crecimiento transformante, factor β 2 de crecimiento transformante, factor β 3 de crecimiento transformante, factor β 5 de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante latente, proteína I de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína II de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína III de unión a factor β de crecimiento transformante, linfopoyetina estromal tímica (TSLP), receptor de factor de necrosis tumoral tipo I, receptor de factor de necrosis tumoral tipo II, receptor de activador de plasminógeno de tipo urocinasa, proteína activadora de fosfolipasa (PUP), insulina, lectina, ricina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimuladora de folículos, hormona estimuladora de la tiroides, activador de plasminógeno tisular, IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, α -galactosidasa, β -galactosidasa, ADNasa, fetuina, hormona luteinizante, estrógeno, albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, transferrina, trombopoyetina, urocinasa, integrina, trombina, leptina, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanercept), una proteína de la tabla 1, o un fragmento, derivado o variante de los mismos biológicamente activo; en el que dicho polímero soluble en agua que contiene un grupo aminooxilo activo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, R.U.), ácido polisialico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, dextrano,

carboximetil-dextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolona, poli(acrililormorfolina), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolona, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico y poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal) (PHF); en el que el catalizador nucleofílico es m-toluidina.

5 En aún otra realización, se proporciona un método de formación de un enlace hidrazona entre un resto de hidrato de carbono oxidado en una proteína terapéutica y un polímero soluble en agua activado que contiene un grupo hidrazida activo que comprende las etapas de: a) oxidar un resto de hidrato de carbono en una proteína terapéutica incubando dicha proteína con un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en peryodato de sodio (NaIO₄), tetraacetato de plomo (Pb(OAc)₄) y perrutenato de potasio (KRuO₄); y b) formar un enlace hidrazona entre el resto de hidrato de carbono oxidado de la proteína terapéutica y el polímero soluble en agua activado que contiene un grupo hidrazida activo en presencia de un catalizador nucleofílico en condiciones que permiten la formación de dicho enlace hidrazona; en el que dicho polímero soluble en agua que contiene un grupo hidrazida activo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, R.U.), ácido polisialico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, dextrano, carboximetil-dextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolona, poli(acrililormorfolina), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolona y anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico y poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal) (PHF); en el que el catalizador nucleofílico es m-toluidina.

En otra realización, un método de formación de un enlace hidrazona entre un resto de hidrato de carbono oxidado en una proteína terapéutica y un polímero soluble en agua activado que contiene un grupo hidrazida activo que comprende las etapas de: a) oxidar un resto de hidrato de carbono en una proteína terapéutica incubando dicha proteína con un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en peryodato de sodio (NaIO₄), tetraacetato de plomo (Pb(OAc)₄) y perrutenato de potasio (KRuO₄); y b) formar un enlace hidrazona entre el resto de hidrato de carbono oxidado de la proteína terapéutica y el polímero soluble en agua activado que contiene un grupo hidrazida activo en presencia de un catalizador nucleofílico en condiciones que permiten la formación de dicho enlace hidrazona; en el que la proteína terapéutica se selecciona del grupo que consiste en factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de Von Willebrand (VWF), factor V (FV), factor X (FX), factor XI (FXI), factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (TF), proteasa ADAMTS13, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor 1 estimulante de colonias (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), EPO, interferón-alfa (IFN-alfa), interferón de consenso, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-omega, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombopoyetina (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, polipéptido 1 de tipo angiopoyetina (ANGPTL1), polipéptido 2 de tipo angiopoyetina (ANGPTL2), polipéptido 3 de tipo angiopoyetina (ANGPTL3), polipéptido 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4), polipéptido 5 de tipo angiopoyetina (ANGPTL5), polipéptido 6 de tipo angiopoyetina (ANGPTL6), polipéptido 7 de tipo angiopoyetina (ANGPTL7), vitronectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína 1 morfogenética de hueso, proteína 2 morfogenética de hueso, proteína 3 morfogenética de hueso, proteína 4 morfogenética de hueso, proteína 5 morfogenética de hueso, proteína 6 morfogenética de hueso, proteína 7 morfogenética de hueso, proteína 8 morfogenética de hueso, proteína 9 morfogenética de hueso, proteína 10 morfogenética de hueso, proteína 11 morfogenética de hueso, proteína 12 morfogenética de hueso, proteína 13 morfogenética de hueso, proteína 14 morfogenética de hueso, proteína 15 morfogenética de hueso, receptor IA de proteína morfogenética de hueso, receptor IB de proteína morfogenética de hueso, receptor II de proteína morfogenética de hueso, factor neurotrófico derivado de cerebro, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, receptor de factor neurotrófico ciliar, cripto, críptico, factor 1 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor 2 α quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor 2 β quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor β de crecimiento de células endoteliales, endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, epígeno, epiregulina, atrayente de neutrófilos derivados de epitelio, factor 4 de crecimiento de fibroblastos, factor 5 de crecimiento de fibroblastos, factor 6 de crecimiento de fibroblastos, factor 7 de crecimiento de fibroblastos, factor 8 de crecimiento de fibroblastos, factor 8b de crecimiento de fibroblastos, factor 8c de crecimiento de fibroblastos, factor 9 de crecimiento de fibroblastos, factor 10 de crecimiento de fibroblastos, factor 11 de crecimiento de fibroblastos, factor 12 de crecimiento de fibroblastos, factor 13 de crecimiento de fibroblastos, factor 16 de crecimiento de fibroblastos, factor 17 de crecimiento de fibroblastos, factor 19 de crecimiento de fibroblastos, factor 20 de crecimiento de fibroblastos, factor 21 de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor α 1 de factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, receptor α 2 de factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, proteína relacionada con el crecimiento, proteína α relacionada con el crecimiento, proteína β relacionada con el crecimiento, proteína γ relacionada con el crecimiento, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de hepatoma, factor I de crecimiento de tipo insulina, receptor de factor de crecimiento de tipo insulina, factor II de crecimiento de tipo insulina, proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor α de factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento nervioso, receptor de factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina-3, neurotrofina-4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento de placenta, factor 2 de crecimiento de placenta, factor de crecimiento de células

5 endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor AA de crecimiento derivado de plaquetas, factor AB de crecimiento derivado de plaquetas, cadena B de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor BB de crecimiento derivado de plaquetas, receptor α de factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor β de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor de factor de células madre, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, factor α de crecimiento transformante, factor β de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante, factor β 1.2 de crecimiento transformante, factor β 2 de crecimiento transformante, factor β 3 de crecimiento transformante, factor β 5 de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante latente, proteína I de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína II de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína III de unión a factor β de crecimiento transformante, linfopoyetina estromal tímica (TSLP), receptor de factor de necrosis tumoral tipo I, receptor de factor de necrosis tumoral tipo II, receptor activador de plasminógeno de tipo urocinasa, proteína activadora de fosfolipasa (PUP), insulina, lectina ricina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimuladora de folículos, hormona estimuladora de la tiroides, activador de plasminógeno tisular, IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, α -galactosidasa, β -galactosidasa, ADNasa, fetuina, hormona luteinizante, estrógeno, albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, transferrina, trombotopoyetina, urocinasa, integrina, trombina, leptina, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanercept), una proteína de la tabla 1, o un fragmento, derivado o variante de los mismos biológicamente activo; en el que dicho polímero soluble en agua que contiene un grupo hidrazida activo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, R.U.), ácido polisialílico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, dextrano, carboximetil-dextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolina, poli(acrililormorfina), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico y poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal) (PHF); en el que el catalizador nucleofílico es m-toluidina.

25 En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el polímero soluble en agua que contiene un grupo aminooxilo activo se prepara mediante un método que comprende: incubar una disolución que comprende un polímero soluble en agua oxidado con un ligador de aminooxilo activado que comprende un grupo aminooxilo activo en condiciones que permiten la formación de un enlace oxima estable entre el polímero soluble en agua oxidado y el ligador de aminooxilo activado, comprendiendo dichas condiciones un periodo de tiempo de entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 24 horas; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz, y con o sin agitación; formando de ese modo un polímero soluble en agua que contiene un grupo aminooxilo activo; y b) purificar el polímero soluble en agua que contiene un grupo aminooxilo activo mediante un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía, filtración y precipitación. El término "polímero soluble en agua activado" se refiere, en una realización, a un polímero soluble en agua que contiene un grupo aldehído.

40 En aún otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el polímero soluble en agua que contiene un grupo aminooxilo activo se prepara mediante un método que comprende: a) incubar una disolución que comprende un polímero soluble en agua oxidado con un ligador de aminooxilo activado que comprende un grupo aminooxilo activo en condiciones que permiten la formación de un enlace oxima estable entre el polímero soluble en agua oxidado y el ligador de aminooxilo activado, comprendiendo dichas condiciones un periodo de tiempo de entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 24 horas; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz, y con o sin agitación; formando de ese modo un polímero soluble en agua que contiene un grupo aminooxilo activo; b) incubar una disolución que comprende el polímero soluble en agua que contiene un grupo aminooxilo activo de etapa a) con un agente reductor en condiciones que permiten la formación de un enlace alcoxamina estable entre el polímero soluble en agua oxidado y el ligador de aminooxilo activado., comprendiendo dichas condiciones un periodo de tiempo de entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 24 horas; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación; y c) purificar el polímero soluble en agua que contiene un grupo aminooxilo activo mediante un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía, filtración y precipitación.

55 En todavía otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el polímero soluble en agua que contiene un grupo aminooxilo activo se prepara mediante un método que comprende: a) incubar una disolución que comprende un polímero soluble en agua oxidado con un ligador de aminooxilo activado que comprende un grupo aminooxilo activo en condiciones que permiten la formación de un enlace oxima estable entre el polímero soluble en agua oxidado y el ligador de aminooxilo activado, comprendiendo dichas condiciones un periodo de tiempo de entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 24 horas; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz, y con o sin agitación; formando de ese modo un polímero soluble en agua que contiene un grupo aminooxilo activo; b) incubar una disolución que comprende el polímero soluble en agua que contiene un grupo aminooxilo activo de etapa a) con un catalizador nucleofílico en condiciones que comprenden un periodo de tiempo entre 1 minuto y 24 horas; una temperatura entre 2°C y 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación; y c) purificar el polímero soluble en agua que contiene un grupo aminooxilo activo mediante un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía,

filtración y precipitación.

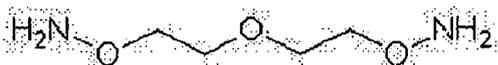
En aún otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el polímero soluble en agua que contiene un grupo aminoóxilo activo se prepara mediante un método que comprende: a) incubar una disolución que comprende un polímero soluble en agua oxidado con un ligador de aminoóxilo activado que comprende un grupo aminoóxilo activo en condiciones que permiten la formación de un enlace oxima estable entre el polímero soluble en agua oxidado y el ligador de aminoóxilo activado, comprendiendo dichas condiciones un periodo de tiempo de entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 24 horas; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz, y con o sin agitación; formando de ese modo un polímero soluble en agua que contiene un grupo aminoóxilo activo; b) incubar una disolución que comprende el polímero soluble en agua que contiene un grupo aminoóxilo activo de etapa a) con un catalizador nucleofílico en condiciones que comprenden un periodo de tiempo entre 1 minuto y 24 horas; una temperatura entre 2°C y 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación; c) incubar una disolución que comprende el polímero soluble en agua que contiene un grupo aminoóxilo activo de etapa b) con un agente reductor en condiciones que permiten la formación de un enlace alcoxamina estable entre el polímero soluble en agua oxidado y el ligador de aminoóxilo activado, comprendiendo dichas condiciones un periodo de tiempo de entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 24 horas; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación; y d) purificar el polímero soluble en agua que contiene un grupo aminoóxilo activo mediante un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía, filtración y precipitación.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el polímero soluble en agua oxidado se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, R.U.), ácido polisialílico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, dextrano, carboximetil-dextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolona, poliácidoilmorfolina, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolona, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico y poli(1-hidroximetiletileno hidroximetilformal) (PHF), y en el que dicho polímero soluble en agua se oxida mediante incubación con un agente oxidante para formar un grupo aldehído terminal en el extremo no reductor del polímero soluble en agua. En una realización, el polímero soluble en agua es PSA.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el agente oxidante es NaIO_4 .

En todavía otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el ligador de aminoóxilo se selecciona del grupo que consiste en:

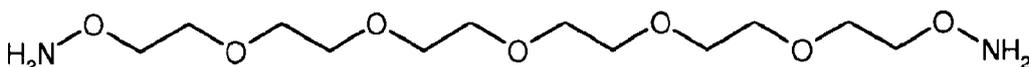
a) un ligador de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina de fórmula:



b) un ligador de 3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina de fórmula:



c) un ligador de 3,6,9,12,15-penatoxa-heptadecano-1,17-dioxiamina de fórmula:



En aún otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3), ácido ascórbico (vitamina C) y NaBH_3 . En una realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3).

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el catalizador nucleofílico es m-toluidina. En otra realización, el catalizador nucleofílico se añade en una cantidad para dar como resultado una concentración final de catalizador nucleofílico de entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 50 mM.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente que comprende además concentrar la proteína terapéutica conjugada mediante ultra/diafiltración (UF/DF).

60 **Figuras**

La figura 1 muestra la estructura primaria del factor de la coagulación IX (SEQ ID NO: 1).

La figura 2 muestra el acoplamiento de rFIX oxidado a aminooxi-PSA.

La figura 3 muestra la síntesis de los ligadores di-aminoxilo solubles en agua 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina y 3,6,9-trioxaundecano-1,11-dioxiamina.

La figura 4 muestra la preparación de aminooxi-PSA.

La figura 5 muestra la visualización de conjugados de PSA-FIX preparados en presencia de diferentes catalizadores mediante SDS PAGE. a) Comparación de anilina con m-toluidina usando diferentes concentraciones; b) comparación de anilina con ácido o-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, p-aminobenzamida y ácido sulfanílico; c) comparación de anilina y m-toluidina con o-anisidina y m-anisidina.

La figura 6 muestra el porcentaje de polisialilación con diversos catalizadores nucleofílicos.

Descripción detallada de la invención

Las propiedades farmacológicas e inmunológicas de proteínas terapéuticas puede mejorarse mediante modificación química y conjugación con compuestos poliméricos tales como polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, ácido polisialílico (PSA), almidón de hidroxialquilo (HAS), almidón de hidroxietilo (HES), hidrato de carbono, polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, almidón, dextrano, carboximetil-dextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolona, poliacriloilmorfolina, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolona, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico, poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal) (PHF), 2-metacriloloxi-2'-etiltrimetilamoniofosfato (MPC). Las propiedades de los conjugados resultantes dependen generalmente con fuerza de la estructura y el tamaño del polímero. Por tanto, habitualmente se prefieren en la técnica polímeros con una distribución de tamaño definida y estrecha. Pueden fabricarse fácilmente polímeros sintéticos como PEG con una distribución de tamaño estrecha, mientras que puede purificarse PSA de manera tal que da como resultado una preparación de PSA final con una distribución de tamaño estrecha. Además, reactivos de pegilación con cadenas poliméricas definidas y distribución de tamaño estrecha están en el mercado y disponibles comercialmente por un precio razonable.

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

Proteínas terapéuticas

En determinadas realizaciones de la invención, los polipéptidos y polinucleótidos mencionados anteriormente se ejemplifican mediante las siguientes proteínas terapéuticas: enzimas, antígenos, anticuerpos, receptores, proteínas de la coagulación sanguínea, factores de crecimiento, hormonas y ligandos. En determinadas realizaciones, la proteína terapéutica es una proteína de la coagulación sanguínea tal como factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de Von Willebrand (VWF), factor V (FV), factor X (FX), factor XI (FXI), factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (TF) o proteasa ADAMTS13. En una realización, una proteína terapéutica según la invención es una glicoproteína o, en diversas realizaciones, una proteína que no se glicosila naturalmente *in vivo* (es decir, una proteína que no contiene un sitio de glicosilación natural o una proteína que no se glicosila en una célula huésped antes de la purificación).

En determinadas realizaciones, la proteína terapéutica es inmunoglobulinas, citocinas tales IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor 1 estimulante de colonias (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), EPO, interferón-alfa (IFN-alfa), interferón de consenso, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-omega, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombopoyetina (TPO), angiopoyetinas, por ejemplo Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, los polipéptidos humanos de tipo angiopoyetina ANGPTL 1 a 7, vitronectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína 1 morfogenética de hueso, proteína 2 morfogenética de hueso, proteína 3 morfogenética de hueso, proteína 4 morfogenética de hueso, proteína 5 morfogenética de hueso, proteína 6 morfogenética de hueso, proteína 7 morfogenética de hueso, proteína 8 morfogenética de hueso, proteína 9 morfogenética de hueso, proteína 10 morfogenética de hueso, proteína 11 morfogenética de hueso, proteína 12 morfogenética de hueso, proteína 13 morfogenética de hueso, proteína 14 morfogenética de hueso, proteína 15 morfogenética de hueso, receptor IA de proteína morfogenética de hueso, receptor IB de proteína morfogenética de hueso, receptor II de proteína morfogenética de hueso, factor neurotrófico derivado de cerebro, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, receptor de factor neurotrófico ciliar, cripto, críptico, factor 1 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor 2 α quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor 2 β quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor β de crecimiento de células endoteliales, endotelina 1, factor de

5 crecimiento epidérmico, epígeno, epiregulina, atrayente de neutrófilos derivado de epitelio, factor 4 de crecimiento de fibroblastos, factor 5 de crecimiento de fibroblastos, factor 6 de crecimiento de fibroblastos, factor 7 de crecimiento de fibroblastos, factor 8 de crecimiento de fibroblastos, factor 8b de crecimiento de fibroblastos, factor 8c de crecimiento de fibroblastos, factor 9 de crecimiento de fibroblastos, factor 10 de crecimiento de fibroblastos, factor 11 de crecimiento de fibroblastos, factor 12 de crecimiento de fibroblastos, factor 13 de crecimiento de fibroblastos, factor 16 de crecimiento de fibroblastos, factor 17 de crecimiento de fibroblastos, factor 19 de crecimiento de fibroblastos, factor 20 de crecimiento de fibroblastos, factor 21 de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor α 1 de factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, receptor α 2 de factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, proteína relacionada con el crecimiento, proteína α relacionada con el crecimiento, proteína β relacionada con el crecimiento, proteína γ relacionada con el crecimiento, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de hepatoma, factor I de crecimiento de tipo insulina, receptor de factor de crecimiento de tipo insulina, factor II de crecimiento de tipo insulina, proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor α de factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento nervioso, receptor de factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina-3, neurotrofina-4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento de placenta, factor 2 de crecimiento de placenta, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor AA de crecimiento derivado de plaquetas, factor AB de crecimiento derivado de plaquetas, cadena B de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor BB de crecimiento derivado de plaquetas, receptor α de factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor β de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor de factor de células madre, TNF, incluyendo TNF0, TNF1, TNF2, factor α de crecimiento transformante, factor de crecimiento transformante β , factor β 1 de crecimiento transformante, factor β 1.2 de crecimiento transformante, factor β 2 de crecimiento transformante, factor β 3 de crecimiento transformante, factor β 5 de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante latente, proteína I de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína II de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína III de unión a factor β de crecimiento transformante, linfopoyetina estromal tímica (TSLP), receptor de factor de necrosis tumoral tipo I, receptor de factor de necrosis tumoral tipo II, receptor de activador de plasminógeno de tipo urocinasa, factor de crecimiento endotelial vascular, y proteínas quiméricas y fragmentos biológica o inmunológicamente activos de los mismos.

35 En determinadas realizaciones, la proteína terapéutica es alfa-, beta- y gamma-interferones, factores estimulantes de colonias incluyendo factores estimulantes de colonias de granulocitos, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de plaquetas, proteína activadora de fosfolipasa (PUP), insulina, proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas, factores de necrosis tumoral y alelos relacionados, formas solubles de receptores de factor de necrosis tumoral, receptores de interleucina y formas solubles de receptores de interleucina, factores de crecimiento tales como factores de crecimiento tisular, tales como TGF α o TGF β y factores de crecimiento epidérmico, hormonas, somatomedinas, hormonas pigmentarias, factores de liberación hipotalámicos, hormonas anti-diuréticas, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimuladora de folículos, hormona estimuladora de la tiroides, activador de plasminógeno tisular e inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, una galactosidasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, ADNasa, fetuina, hormona luteinizante, estrógeno, corticosteroides, albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, transferrina, trombotopoyetina, urocinasa, ADNasa, integrinas, trombina, factores de crecimiento hematopoyético, leptina, glicosidasas, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanercept), y fragmentos de los mismos, o cualquier proteína de fusión que comprende cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente o fragmentos de los mismos. Además de las proteínas mencionadas anteriormente, la siguiente tabla 1 proporciona proteínas terapéuticas contempladas por la presente invención:

Tabla 1

Péptido secretado de células dendríticas foliculares	Enzima convertidora de angiotensina	Miembro 6 de la familia de interleucina-1	Herstatina
Dermokina	Antitrombina III	Proteína 2 expresada en próstata y testículo	Proteína 28 que contiene repetición rica en leucina
Proteína 1 secretada relacionada con Frizzled	Apolipoproteína B-100	Fosfolipasa secretora A2 del grupo XIA	Proteína de tipo LRRN4 C-terminal
Ectodisplasina A	Apolipoproteína D	Cadena de colágeno alfa-3 (V)	Proteína 2 que contiene el dominio Ly6/PLAUR
Proteína 2 secretada relacionada con Frizzled	Apolipoproteína E	Proteína 1 de tipo alfa-2-macroglobulina	Proteína transmembrana 81
Resistina	Beta-1,4-galactosiltransferasa 1	Dermatopontina	Proteína 3 de tipo proteína de la mielina cero
Osteopontina	Proteína 7 morfogenética	Proteína asociada al	Homólogo de proteína

ES 2 731 626 T3

	de hueso	cartílago	notum
Proteína 5 secretada relacionada con Frizzled	Subunidad B de subcomponente complemento C1q	Proteína Desert hedgehog	UDP-glucuronosiltransferasa 3A2
Proteína 4 secretada relacionada con Frizzled	Cadena alfa de proteína de unión a C4b	Proteína 2 de la matriz extracelular	Protocadherina alfa-1
Fosfoproteína 24 secretada	Calreticulina	Factor intrínseco gástrico	Fosfolipasa D4
Glipicano-6	Globulina de unión a corticosteroides	Interleucina-33	Retinol deshidrogenasa 10
Proteína 3 secretada relacionada con Frizzled	Carboxipeptidasa A1	Proteína 2 morfogénica de hueso	Lectina 14 de tipo Ig de unión a ácido siálico
Quimiocina 4 con motivo C-C	Carboxipeptidasa A2	Proteína 6 morfogénica de hueso	Proteína transmembrana 161 A
Proteína de melanocitos Pmel 17	Eotaxina	Proteína no caracterizada KIAA0564	Proteína transmembrana 161B
Proteína 1 relacionada con Ly-6/uPAR secretada	Quimiocina 13 con motivo C-C	Cerberus	Proteína transmembrana 182
Beta-microseminoproteína	Quimiocina 18 con motivo C-C	Hidrato de carbono sulfotransferasa 8	Proteína FAM24B
Glipicano-4	Quimiocina 20 con motivo C-C	Proteína asociada a contactina de tipo 3	Proteína transmembrana 52
Miembro 15 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral	Receptor de activación expresado en células mieloides 2	Proteína de tipo fosfolipasa A2 secretora del grupo XIIIB	Proteína 4 que contiene dominio de superfamilia facilitadora principal
Resistina de tipo beta	Quimiocina 2 con motivo C-C	Corticoliberina	UDP-glucuronosiltransferasa 2A3
Miembro 12 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral	Factor de crecimiento transformante inducido por la proteína beta ig-h3	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 19	Proteína asociada a ameloblastos odontogénicos
SPARC	Ligando CD40	Proteína UPF0556 C19orf10	Proteína neurosecretora VGF
Glipicano-5	Corneodesmosina	Quimiocina 3 con motivo C-X-C	Fosfoproteína secretada 2, 24 kDa
Homólogo 2 de proteína de gradiente anterior	Factor de complemento D	Cistatina-M	Proteína FAM150B
Homólogo 2 de proteína Canopy	Cromogranina A	Defensina-5	Factor crecimiento/diferenciación 9
Glipicano-1	Cadena de colágeno alfa-1 (I)	Defensina-6	Proteína 1 de tipo clusterina
Proteína 2 que contiene dominio A de factor de von Willebrand	Proteína 18 que contiene dominio de desintegrina y metaloproteinasa	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 18	Proteína 2 que contiene dominio transmembrana e inmunoglobulina
Proteína 1 de la ruta de señalización inducible por WNT1	Dominio de proteína secretora rica en cisteína LCCL que contiene 1	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 3	Proteína que contiene el dominio de lectina de tipo C UNQ5810/PRO19627
Quimiocina 1 con motivo C-C	Cadena de colágeno alfa-4 (IV)	Proteína 4 relacionada con Dickkopf	Lipocalina-10 específica de epidídimo
Proteína 2 de unión a calcio modular relacionada con SPARC	Proteína asociada a la diferenciación de queratinocitos	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de

ES 2 731 626 T3

		5	trombospondina 8
Miembro A de la familia 11 del dominio de lectina de tipo C	Complemento C4-B	Proteína 1 relacionada con epéndimo de mamífero	Lipocalina-8 específica de epidídimo
Proteína 2 relacionada con Ly-6/uPAR secretada	Cadena de colágeno alfa-2 (V)	Fibrilina-3	Péptido básico rico en prolina P-E
Glipicano-3	Complemento C5	Fetuina-B	Supuesta proteína no caracterizada C10orf99
Proteína 1 secretada y transmembrana	Cadena de colágeno alfa-1 (VII)	Factor 6 de crecimiento de fibroblastos	Proteína no caracterizada C17orf77
Proteína 264 de secuencia expresada en testículos	Componente de complemento C7	Factor de crecimiento de queratinocitos	Arilacetamida desacetilasa de tipo 2
Glipicano-2	Cadena beta de componente de complemento C8	Factor 8 de crecimiento/diferenciación	Lipocalina-12 específico de epidídimo
Serina proteasa 23	Cadena gamma de componente de complemento C8	Polipéptido inhibidor gástrico	Antígeno 2 del melanoma B
Proteína L55 ribosómica 39S, mitocondrial	Cadena de colágeno alfa-1 (XV)	Hormona de glicoproteína beta-5	Antígeno 3 de melanoma B
Homólogo 3A de proteína NipSnap	Cadena de colágeno alfa-1 (XVI)	Granzima M	Homólogo 1 de proteína plasmática seminal bovina
Fibronectina	Cadena de colágeno alfa-1 (XVIII)	Péptido liberador de gastrina	Proteína 3 de tipo complemento C1q
Neudesina	Cadena de colágeno alfa-1 (XIX)	Serina proteasa HTRA1	Proteína UPF0565 C2orf69
Receptor 2 de factor de crecimiento de fibroblastos	Proteína de la matriz oligomérica del cartílago	Interferón alfa-4	Proteína UPF0669 C6orf120
Anhidrasa carbónica 6	Proteína reactiva C	Interferón alfa-5	Proteína de tipo colipasa C6orf127
Proteína 1 eliminada en tumores cerebrales malignos	Factor estimulante de colonias de granulocitos	Interferón alfa-7	Proteína no caracterizada C7orf69
Proteína 1 de unión a calcio modular relacionada con SPARC	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 7	Proteína de tipo receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas
Proteína beta A4 amiloide	Proteína CYR61	Miembro 10 de la superfamilia de inmunoglobulinas	Proteína de tipo condroadherina
Miembro 6 de la superfamilia de receptor de factor de necrosis tumoral	Proteína de tipo receptor 1 de componente de complemento	Proteína que contiene el dominio asociado a proteasa de 21 kDa	Supuesta proteína no caracterizada UNQ6490/PRO21339
Subunidad 1 del receptor de tipo B de ácido gamma-aminobutírico	Factor de crecimiento de células madre; lectina de tipo C secretada por linfocitos	Proteína que contiene el dominio abhidrolasa FAM108A1	Supuesta proteína no caracterizada UNQ6493/PRO21345
Pro-neuregulina-1, isoforma unida a membrana	CMP-N-acetilneuraminato-beta-galactosamida-alfa-2,3-sialiltransferasa	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 9	Supuesta proteína no caracterizada UNQ5815/PRO19632
Hormona de glicoproteína alfa-2	Dipeptidil peptidasa 4	Receptor de interleucina-9	Cistatina-A
Membrana metalo-endopeptidasa de tipo 1	Sialofosfoproteína dentina	Interleucina-9	Inhibidor de la peptidasa R3HDML
Receptor Fc de tipo A	Endotelina-1	Inhibina B de la cadena beta	Cistatina-9

ES 2 731 626 T3

Quimiocina de tipo 4 con motivo C-C	Efrina-B1	Inhibidor de serina proteasa Kazal-tipo 2	Miembro 5 de la familia de dominios DAN
Receptor 1 que contiene dominio de discoidina epitelial	Proteína de tipo serina proteasa específica de la epidermis	Proteína reguladora endotelial de unión a BMP	Proteína de tipo 1 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina
Mucina-1	EMILINA-1	Proteína 2 asociada a queratinocitos	Proteína 1 de unión a esperma de epidídimo
Factor A de crecimiento endotelial vascular	Endoplasmina	Subunidad de laminina alfa-1	Elafina
Fibulina-1	Receptor 3 de tipo efrina A	Quimotaxina-2 derivada de células leucocitarias	Proteína FAM55A
Receptor de prolactina	Receptor 6 de tipo efrina B	Triacilglicerol lipasa gástrica	Factor 6 de crecimiento/diferenciación
Proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 6	Proteína 1 que contiene dominio 1 de glicosiltransferasa	Proteína 3 que contiene dominio de homología de calponina y repetición rica en leucina	Proteína 1 que contiene el dominio de la glucosa-fructosa oxidoreductasa
Antígeno CD209	Factor de la coagulación X	Proteína 2 relacionada con la lipasa pancreática	Eritropoyetina
Cadena de colágeno alfa-2 (XI)	Factor de la coagulación VIII	alfa-manosidasa específica de epidídimo	Glutación peroxidasa 6
Subunidad alfa del receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	Proteína 7 relacionada con el factor de necrosis tumoral del complemento C1q	Proteína 7 que contiene dominio de fibronectina tipo III	Proteína no caracterizada UNQ511/PRO1026
Elastina	Fibrilina-2	Proteína 5 asociada a microfibrillas	Beta-defensina 128
Subunidad alfa de receptor de interleucina-15	Glicoproteína alfa-2-HS	Factor inhibidor de Mueller	Interleucina-31
Midkina	Factor 10 de crecimiento de fibroblastos	Metaloproteinasa-21 de matriz	Interleucina-34
Integrina alfa-7	Cadena alfa de fibrinógeno	Metaloproteinasa-17 de matriz	Proteína 4 de tipo calicreína plasmática
Mucina-4	Cadena beta de fibrinógeno	Metaloproteinasa-20 de matriz	Lipocalina-9 específica de epidídimo
Monooxigenasa alfa-amidante de peptidil-glicina	Proteína 1 asociada a carcinoma del epitelio nasal, pulmón y paladar largo	Subunidad gamma de N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa	ADNc FLJ60957, muy similar a la proteína 4 secretada relacionada con Frizzled
Apolipoproteína A-I	Gastrina	Multimerina-2	Miembro de la lipasa M
Proteoglicano 4	Cadena alfa de las hormonas glicoproteicas	Promotilina	CLECSF12
Miembro 25 de la superfamilia de receptor del factor de necrosis tumoral	Subunidades alfa/beta de N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa	Proteína 3 de la matriz extracelular relacionada con FRAS1	Supuesta fosfolipasa secretora A2 de grupo inactivo IIC
Atractina	Granzima A	Proteína de unión a proteína cinasa C NELL1	Serina proteasa MPN2
Microseminoproteína asociada a la próstata	Proteína de tipo factor de crecimiento de hepatocitos	Proteína de unión a proteína cinasa C NELL2	Netrina-5
Alfa-amilasa 1	Proteína 1 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina	Neurotripsina	Proteína 2 que contiene repetición de NHL
Factor neurotrófico derivado del cerebro	Proteína 2 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina	Neuroserpina	Proteína 2B de tipo olfactomedina

ES 2 731 626 T3

Miembro M de la familia 4 del dominio de lectina de tipo C	Proteína 4 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina	Nidógeno-2	Ovoquimasa-2
Receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos	Miembro 10D de la superfamilia de receptor de factor de necrosis tumoral	Proteína que contiene el dominio abhidrolasa FAM108B1	Supuesta proteína no caracterizada UNQ3029/PRO9830
Factor II de crecimiento de tipo insulina	Interferón alfa-1/13	Neurotrofina-4	Ovoquimasa-1
Molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario	Proteína 1 que contiene el dominio helicasa C inducida por interferón	Glutación peroxidasa secretora del epidídimo	Supuesta glicoproteína 7 beta-1 específica del embarazo
Miembro A de la familia 7 de dominio de lectina de tipo C	Interferón alfa-2	Fosfolipasa secretora A2 del grupo 10	Homologo de ovostatina 2
Molécula 1 de tipo CMRF35	Interferón beta	Fosfolipasa secretora A2 del grupo IID	Neuropéptido orexigénico QRFP
Proteína 4 de tipo transportador de colina	Interferón gamma	Lactoperoxidasa	Antígeno de linfocitos 6K
Proteína A1 asociada al surfactante pulmonar	Factor IB de crecimiento de tipo insulina	Efactor de apoptosis p53 relacionado con PMP-22	Proteína 1 expresada en próstata y testículos
Espermina oxidasa	Proteína Indian hedgehog	Proteína 1 específica de placenta	Supuesta fosfolipasa B de tipo 1
CMP-N-acetilneuraminato-beta-1,4-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa	Proteína de tipo molécula de adhesión de células neurales L1	Péptido tuberoinfundibular de 39 residuos	Supuesta proteína no caracterizada FLJ42147
Caliceína-8	Interleucina-13	Prolargina	Otogelina
Activador de plasminógeno de tipo tisular	Interleucina-2	Secretogranina-2	Ribonucleasa 8
N (1)-acetil-espermina/espermidina oxidasa peroxisomal	Miembro 2A de la familia de elastasa de tipo quimotripsina	Proteína 1 que contiene endonucleasa	Proteína de tipo 2 que interactúa con complejo de poros nucleares
Palmitoiltransferasa ZDHHC4 posible	Cadena A de inhibina beta	Semaforina-3B	Polipéptido de tipo 1 proactivador
Proteína de transferencia de éster de colesterilo	Inhibidor de la tripsina secretora pancreática	Somatostatina	Homólogo 2 de proteína Spinster
Antígeno de histocompatibilidad HLA clase I, cadena alfa A-2	Miembro 21 de la superfamilia de receptor del factor de necrosis tumoral	Miembro 4 de tipo 2 de la familia SDR deshidrogenasa/reductasa	Proteína de tipo 2 que contiene el dominio C de factor de von Willebrand
Cadena de colágeno alfa-1 (II)	Cadena pesada H1 de inter-alfa inhibidor de tripsina	Transcobalamina-1	Urotensina-2b
Pro-interleucina-16	Cadena pesada H2 de inter-alfa inhibidor de tripsina	Factor de trébol 2	Tetraspanina-18
Receptor de leptina	Cadena pesada H3 de inter-alfa inhibidor de tripsina	Testicano-1	Proteína de membrana UPF0514 FAM159A
Decorina	Antígeno específico de la próstata	Paraoxonasa/lactonasa 3 sérica	Laterina
Factor 1 derivado de células estromales	Caliceína-4	Proteína 2 de tipo toloide	Proteína 7B de tipo metiltransferasa
Tenascina	Caliceína plasmática	Tripsina-2	Proteína TEX261
Proteína 12 que contiene dominio de desintegrina y metaloproteinasas	Regulador 4 de canal de cloruro activado por calcio	Proteína 1 que contiene dominio de dedo RING y SPRY	Homólogo 7 de proteína de reparación de ADN alquilado alkB

ES 2 731 626 T3

Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 13	Proteína de tipo 1 que aumenta la permeabilidad/capacidad bactericida	Proteína 1 que contiene el dominio de bobina enrollada y de unión a calcio	Proteína 6 que contiene el dominio emp24 transmembrana
Cadena alfa de glicoproteína CD8 de superficie de células T	Leptina	Proteína Wnt-2	Proteína 5 relacionada con XK
Proteína co-amplificada y sobreexpresada de EGFR	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 4	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 8	Supuesta proteína 7 que contiene dominio de inmunoglobulina y V-set
Proteína 16-1 relacionada con la autofagia	Triacilglicerol lipasa hepática	Proteína Wnt-8b	Miembro 3 de la familia de tipo factor de crecimiento de insulina
Proteína 3 anti-resistencia de estrógeno de cáncer de mama	Proteína G6c del locus del complejo de antígeno 6 de linfocitos	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa 4	Proteína de tipo 1 que interactúa con complejo de poros nucleares
Cadherina-23	Eosinófilos lisosofolipasa	Proteína 1 que contiene el dominio EMI	Fosfoproteína secretada 1
Factor 1 estimulante de colonias de macrófagos	Subunidad beta de lutropina	Proteína no caracterizada C6orf15	Cadena de colágeno alfa-5 (VI)
Receptor de folato alfa	Proteína 1 asociada a microfibrillas	Colectina-10	Antígeno 5 de melanoma B
Proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad	Factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos	CoA ligasa de ácido graso de cadena larga ACSBG2	Proteína 10A de dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP
E3 ubiquitina-proteína ligasa LRSAM1	Proteína de matriz Gla	Proteína 3 de transcrito inducido por oncoproteína	Proteína UPF0369 C6orf57
Molécula 1 de adhesión celular neural	Colagenasa IV de tipo 72 KDa	Inhibidor 15 de la peptidasa	Supuesta proteína no caracterizada C10orf31
Neurologina-4, ligada a X	Estromelina-1	Proteína 1 ácida rica en prolina	Supuesta proteína no caracterizada C11orf45
Netrina-G1	Colagenasa de neutrófilos	Urocortina	Proteína no caracterizada C12orf28
Componente PIG-T de transamidasa GPI	Mesotelina	Tripsina-X3 (EC 3.4.21.4)	Proteína no caracterizada C17orf67
Ligando del kit	Mucina-5AC	Proteína 2 de tipo HHIP	Beta-defensina 121
Proteína 6 de tipo convulsión	Mucina-6	Fractalquina	Beta-defensina 130
Miembro 7 de la familia SLAM	Norrina	Proteína Wnt-11	Proteína 2 de unión a nucleótido de la tríada de histidina
Factor de necrosis tumoral	Oxitocina-neurofina 1	Proteína Wnt-7a	Apelina
Uromodulina	Factor de crecimiento nervioso beta	Proteína 1 de FCH y dominios SH3 dobles	Proteína 9 específica de placenta
Miembro 13 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral	Miembro 18 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral	Proteína 2 relacionada con factor de crecimiento derivado de hepatoma	Proteína TD26 asociada al carcinoma hepatocelular
Proteína CREG1	Neurotrofina-3	Subunidad alfa de interleucina-12	Persefina
Proteína 8 que contiene el dominio de tipo EGF	Subunidad A del factor de crecimiento derivado de plaquetas	Proteína UPF0577 KIAA1324	Proteína 18 específica regulada por el sistema endocrino
Proteína 1 multifuncional que interactúa con el complejo de aminoacil ARNt sintetasa	Fosfopantotenoilcisteína descarboxilasa	Proteína 9 relacionada con el factor de necrosis tumoral de complemento C1q	Proteína 8 relacionada con el factor de necrosis tumoral de complemento

ES 2 731 626 T3

			C1q
Proteína 4 de tipo ADAMTS	Inhibidor 1 del activador de plasminógeno	Mucina-17	Proteína 8A morfogenética del hueso
Factor de coagulación XI	Inhibidor 2 del activador de plasminógeno	Proteína lisosomal NCU-G1	Proteína WFDC13
Subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-22	Potenciador 1 de procolágeno endopeptidasa C-	Subunidad alfa-3 de prolil 4-hidroxilasa	Proteína Wnt-8a
Homólogo 1 de factor autoregulador epidérmico deformado	Proteína 2 que contiene dominio de tipo ubiquitina y transmembrana	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa SDCCAG10	Proteína que contiene el dominio de tipo Ig ENSP00000270642
D-isomerasa de prostaglandina-H2	Proteína disulfuro-isomerasa	Inhibidor 16 de la peptidasa	Proteína 15 que contiene el dominio de la abhidrolasa
Alfa-1-antitripsina	Factor derivado del epitelio del pigmento	Proteína 4 relacionada con el receptor de poliovirus	Proteína 9 de tipo ribonucleasa
Alfa-1-anticimotripsina	Pepsina A	Miembro 15 de la familia 22 de portador de soluto	Proteína no caracterizada C2orf66
Proteína de unión a acil-CoA	Gastricsina	GPI inositol-desacilasa	Proteína no caracterizada C17orf99
Factor de complemento B	Proteína Sonic hedgehog	Proteína transmembrana 43	Proteína FAM150A
Subunidad beta de coriognadotropina	Proteína I-alfa de reconocimiento peptidoglicano	Proteína 2 relacionada con la angiopoyetina	Proteína de tipo 1 específica de placenta
Proteína del núcleo de versicano	Biglicano	Proteína 6 relacionada con la angiopoyetina	Proteína no caracterizada C18orf20
Receptor del factor de crecimiento epidérmico	Proteína inducible por prolactina	Ariulfatasa K	Beta-defensina 110
Intercambiador 2 de disulfuro-tiol Ecto-NOX	Factor plaquetario 4	Augurina	Proteína de tipo neuritina
Hialuronidasa-1	Plasminógeno	Proteasa 4 de serina específica para el cerebro	Proteína 1 del extremo carboxilo rica en histidina
Proteína antagonista del receptor de interleucina-1	Paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica	Proteína 1 monooxigenasa tipo DBH	Miembro A de la familia 2 del dominio de lectina tipo C
Subunidad beta del receptor de interleucina-6	Fosfatasa alcalina, tipo placentario	Proteína no caracterizada C1orf56	Proteína 70 que contiene repeticiones ricas en leucina
Receptor de tipo 1 de interleucina-1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa B	Cerebelina-3	Serpina A13
Insulina	Proteoglicano de médula ósea	Cerebelina-4	Proteína 17 que contiene el dominio BTB/POZ
Glicodelina	Proteína 1 rica en prolina salival básica	Proteína de tipo colipasa C6orf126	Proteína no caracterizada C12orf53
Proteína relacionada con la hormona paratiroidea	Proteína C asociada al surfactante pulmonar	Proteína no caracterizada C11orf83	Miembro A de la familia 9 del dominio de lectina de tipo C
Nurima	Hormona paratiroidea	Proteína no caracterizada C16orf89	Proteína 4 de tipo complemento C1q
Subunidad alfa-2 de prolil 4-hidroxilasa	Componente P amiloide sérico	Proteína X2 de tipo carboxipeptidasa	Molécula 4 de tipo CMRF35
Antígeno CD276	Secretocranina-1	Similar a la cistatina-9	Proteína FAM151B
Proteína 1 rica en cisteína con dominio de tipo EGF	Proteína de núcleo de proteoglicano de heparán	Miembro 13 de la familia SDR	Proteína que contiene el dominio abhidrolasa

ES 2 731 626 T3

	sulfato específico de membrana basal	de deshidrogenasa/reductasa	FAM108A2/A3
Proteína 1 que contiene dominio CUB y sushi	Antileucoproteinasas	Beta-defensina 123	Osteocrina
Ficolina-2	Estabilina-1	Beta-defensina 132	Proteasa transmembrana, serina 11E2
Proteína 5 de tipo receptor de Fc	Superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn]	Proteína 1 de tipo citocina	Proteína transmembrana 14E
Proteína GPR89	Somatotropina	Proteína 2 relacionada con Dickkopf	Proteína transmembrana 207
Molécula de adhesión de unión A	Serpina B5	Proteína 1 de tipo Dickkopf	Proteína 1 de tipo TOMM20
Proteína 8A que contiene repeticiones ricas en leucina	Espondina-1	Proteína E3-beta secretora de epidídimo	Proteína no caracterizada C3orf41
Inositol polifosfato fosfatasa 1 múltiple	Mantenimiento estructural de proteína 3 de cromosomas	Proteína 3 que contiene dominio de tipo I discoidina y repetición de tipo EGF	Proteína 3A regulada por andrógenos de la glándula submaxilar
Neuropilina-1	Sintaxina-1a	Proteína FAM55D	Antígeno de melanoma B 1
Plexina-A4	Tetranectina	Factor de crecimiento de fibroblastos 17	Carboxilesterasa inactiva 4
Plexina-B1	Factor de crecimiento transformante beta-1	Factor de crecimiento de fibroblastos 22	Proteína de caja de cuatro articulaciones 1
Periostina	Tiroglobulina	Proteína 2 de unión al factor de crecimiento de fibroblastos	Proteína HSN2
Proteína RIC-3	Inhibidor de metaloproteinasas 1	Factor de crecimiento/diferenciación 3	Humanina
Proteína 2 de tipo SLIT y NTRK	Inhibidor de metaloproteinasas 2	Proteína 1 de tipo GLIPR1	Proteína de tipo quelina/cordina
Factor modificador de la sulfatasa 1	Inhibidor de metaloproteinasas 3	Inhibidor de serina proteasa Kazal de tipo 6	Proteína UPF0624 C6orf186
Factor modificador de la sulfatasa 2	Activador de plasminógeno de tipo urocinasa	Interleucina-17B	Supuesta proteína 4/6 de tipo neurofibromina 1
Proteasa transmembrana, serina 6	Lactotransferrina	Interleucina-17C	Proteína de tipo peroxidasa
Linfotoxina alfa	Tripsina-1	Interleucina-17D	SCO-espondina
Miembro 10B de la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral	Proteína 3B regulada por andrógenos de la glándula submaxilar	Proteína 3 de unión a hialuronano y proteoglicano	Supuesta proteína no caracterizada UNQ9165/PRO28630
Receptor de la superficie de activador de plasminógeno de urocinasa	Miembro 1A de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral	Homólogo 1 de la proteína de la capa externa de la membrana vitelina	Miembro 3 de la familia reguladora de canales de cloruro activados por calcio
Inhibidor 1 de activación de células T que contiene el dominio V-set	Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular	Variante 1 de subunidad beta de la coriagonadotropina	Serina proteasa posible UNQ9391/PRO34284
Glucagón	Proteína de unión a la vitamina D	Proteína de tipo lisozima 1	Proteína no caracterizada C4orf26
N-acetilmuramoi-L-alanina amidasa	Vitronectina	Metaloproteinasas-28 de matriz	Proteína no caracterizada C4orf40
Sulfhidril oxidasa 1	factor de von Willebrand	Nefronectina	Proteína no caracterizada C5orf55
Miembro 4 de la familia SDR	Proteína G5c de locus del	Proteína 12 de dominio del	Supuesta proteína

ES 2 731 626 T3

deshidrogenasa/reductasa	complejo 6 de antígeno de linfocitos	núcleo de cuatro disulfuros WAP	estimulante de macrófagos MSTP9
Proteína de unión a interleucina-18	Glicoproteína de zinc alfa-2	Proteína 1 de tipo olfactomedina	Proteína no caracterizada C15orf61
Kin de proteína 2 de tipo IRRE	Proteína no caracterizada C14orf93	Proteína 2A de tipo olfactomedina	Quimotripsinógeno B2
Marcador de diferenciación mielóide asociado	Retinoschisina	Serina proteasa 27	Beta-defensina 108A
Cordina	Alfa-1,3-manosil-transferasa ALG2	Miembro 2 de la familia 3A de secretoglobina	Beta-defensina 111
1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa gamma	Familia 11 de dominios de lectina tipo C, miembro A, isoforma CRA_b	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 2	Supuesta proteína 6 que contiene dominio V-set e inmunoglobulina
Receptor específico del producto final de glicosilación avanzada	Proteína 7 que contiene dominio de superfamilia facilitadora principal	Proteína 28 que contiene el dominio de desintegrina y metaloproteinasa	Inhibidor de la proteasa de serina tipo Kazal 5 de tipo 3
Proteína 4 que contiene el dominio CARD de la familia NLR	Proteína 1 neuronal transmembrana con repeticiones ricas en leucina	Proteína de aumento de la permeabilidad/capacidad bactericida de tipo 2	Supuesto inhibidor de la serina proteasa tipo Kazal 5 de tipo 2
Pro-neuregulin-2, isoforma unida a membrana	Subunidad 11 de subcomplejo beta 1 de NADH deshidrogenasa [ubiquinona], mitocondrial	Fosfodiesterasa 3b de tipoesfingomielinasa ácida	Miembro 7C de la familia SDR deshidrogenasa/reductasa
Antígeno 11A asociado a esperma	Proteína de membrana UPF0546 C1orf91	Inhibidor de serina proteasa Kazal de tipo 7	Beta-defensina 131
Homólogo 1 de proteína secretada por ovocitos	Proteína 10 relacionada con la anhidrasa carbónica	Neurexofilina-4	Beta-defensina 134
Albúmina de suero	Colecistocinina	Proteína Wnt-9b	Beta-defensina 136
Coclina	Codanina-1	Homólogo B de proteína 16 de gránulos de zimógeno	Beta-defensina 116
Inhibidor C1 de la proteasa plasmática	Proteína no caracterizada C6orf89	Semaforina-3D	Proteína FAM132A
Subunidad alfa de receptor de interleucina-7	Condroitín sulfato glucuroniltransferasa	Apolipoproteína L4	Proteína FAM132B
Cadena pesada H5 de inhibidor de inter-alfa tripsina	Proteína 1 que contiene el dominio citinasa	Proteasa transmembrana, serina 11D	Beta-defensina 115
Factor de crecimiento derivado de plaquetas D	Proteína transmembrana C9orf7	Proteína Scrapie-sensible 1	Beta-defensina 114
Proteína S100-A7	Molécula 9 de tipo CMRF35	Supuesta proteína de tipo anexina A2	Inhibidor de serina proteasa Kazal de tipo 9
Lectina 10 de tipo Ig que se une al ácido siálico	Citocromo P450 2S1	Proteína 10 morfogenética de hueso	Miembro de la lipasa N
Antígeno de tipo nefritis tubulointersticial	Homólogo 3 de proteína de migas	Secretogranina-3	Proteína 3 relacionada con la lipasa pancreática
Miembro 13B de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral	Miembro 7 de la familia SDR deshidrogenasa/reductasa	Proteína 4 relacionada con el factor de necrosis tumoral de complemento C1q	Proteína expresada en testículo, próstata y placenta
CoA ligasa 5 de ácidos grasos de cadena larga	Proteína ENED	Proteína no caracterizada C1orf54	Neuromedina-S
Claudina-14	Proteína 4 relacionada con factor H de complemento	Carboxipeptidasa A6	Neuropéptido S
Proteína 20 que contiene	Miembro 3 de la familia LGI	Quimiocina 19 con motivo	Proteína de tipo pentraxina

ES 2 731 626 T3

repeticiones ricas en leucina	con repeticiones ricas en leucina	C-C	neuronal C16orf38
Miembro 7 de la familia de interleucina-A	Gliomedina	Quimiocina 25 con motivo C-C	Otolina-1
Proteína G5b de locus del complejo de antígeno 6 de linfocitos	Proteína 5 que contiene el dominio glicerofosfodiéster fosfodiesterasa	Miembro 2B de la familia de elastasa de tipo quimotripsina	Proteína de tipo fosfatasa ácida de púrpura de hierro/zinc
Acetilcolinesterasa	Posible receptor 113 acoplado a proteína G	Proteína CEI	Homólogo 1 de ovostatina
Amelogenina, isoforma X	Posible receptor 114 acoplado de proteína G	Proteína no caracterizada C6orf1	Proteína A relacionada con el plasminógeno
Angiogenina	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa 4	Proteína no caracterizada C7orf34	Poliserasa-3
Receptor 2 de toxina del ántrax	Gremlina-1	Proteína 3 asociada a los queratinocitos	Supuesto péptido YY-2
Anexina A2	Miembro 17 de la subfamilia K del canal de potasio	Proteína no caracterizada C9orf47	Supuesto péptido YY-3
Apolipoproteína C-III	Proteína 2 que contiene el motivo KDEL	Cadena de colágeno alfa-1 (VIII)	Proteína 10 de tipo ribonucleasa
Apolipoproteína L1	Lailina	Proteína no caracterizada C18orf54	Proteína de tipo ribonucleasa 12
Subunidad A de subcomponente complemento C1q	Proteína 8B que contiene repeticiones ricas en leucina	Cistatina de tipo 1	Proteína 13 de tipo ribonucleasa
Subunidad C de subcomponente complemento C1q	Proteína 8D que contiene repeticiones ricas en leucina	Proteína 2 que contiene el dominio C2	Serpina A11
Calcitonina	Lectina 6 de tipo Ig que se une al ácido siálico	Proteína 1 que contiene el dominio DDRGK	Inhibidor de proteasa de tipo Kunitz 4
Nucleotidasa 1 activada por calcio soluble	Glicoproteína 2 beta-1 específica del embarazo	Proteína FAM55C	Proteína de tipo meteorina
Quimiocina 15 con motivo C-C	Proteína 1 que contiene el dominio Ly6/PLAUR	Cadena de colágeno alfa-1 (XXVI)	Supuesta proteasa 2 de serina de testículo
Antígeno CD97 (Proteína 5 que contiene dominio Ly6/PLAUR	Proteína FAM19A2	Beta-defensina 112
Contactina-4	Homólogo de dominio N-terminal MLN64	Proteína FAM5B	Proteína no caracterizada FLJ37543
Complemento C2	Factor inhibidor de la migración de macrófagos	Factor 5 de crecimiento de fibroblastos	Proteína FAM24A
Cadena de colágeno alfa-6 (IV)	2-acilglicerol O-aciltransferasa 3	Serina proteasa posible HTRA3	Proteína 4 secretada relacionada con Frizzled
Cadena de colágeno alfa-2 (VI)	Homólogo 1 de portador mitocondrial	Miembro 8 de la familia de interleucina-1	Proteína 2 de tipo complemento C1q
Cadena de colágeno alfa-1 (XI)	Apolipoproteína L6	Inhibidor de serina proteasa Kazal de tipo 4	Supuesta proteína no caracterizada C17orf69
Homólogo 1 de migas	Protocadherina alfa-6	Otospiralina	Supuesta cistatina-13
Cistatina C	Protocadherina gamma-A12	Péptido antimicrobiano expresado en el hígado 2	Beta-defensina 109
Defensina 1 de neutrófilos	Canal 1 de hidrógeno regulado por voltaje	Homólogo 1 de Lisil oxidasa	Beta-defensina 113
Endotelina-3	13,14-reductasa todo trans-retinol	Homólogo 2 de Lisil oxidasa	Beta-defensina 135

ES 2 731 626 T3

Receptor Fc épsilon de inmunoglobulina de baja afinidad	Regulador de la dinámica de los microtúbulos de proteína 2	Proteína 4 asociada a carcinoma de paladar largo, pulmón y epitelio nasal	Proteína que contiene el dominio S1 de peptidasa LOC136242
Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos	R-espondina-4	Proteína 2 de tipo lisozima g	Factor 7 de crecimiento/diferenciación
Receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos	Proteína 3 del transporte de ácidos grasos de cadena larga	Endomucina	Homólogo de la proteína inductora de IgA
Proteína 6 específica de detención del crecimiento	Proteína de tráfico de vesículas SEC22c	Neuropéptido B	Supuesta proteína 1 de tipo lipocalina-1
Receptor de hormona de crecimiento	Claudina-1	Proteína de tipo cinesina KIF7	Supuesta serina proteasa 29
UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa/N-acetilmanosamina cinasa bifuncional	Proteína 3 de dominios de tipo inmunoglobulina y repeticiones ricas en leucina	Receptor 2 de tipo inmunoglobulina asociado a leucocitos	Supuesta proteína que contiene dominio rica en cisteína de receptor eliminador LOC619207
Miembro 8 de la superfamilia de inmunoglobulinas	Miembro 9 de la familia SLAM	Fosfolipasa A2 dependiente de calcio	Proteína de tipo secretoglobina
Cadena alfa del receptor de interleucina-4	Transtiretina	Proteína adaptadora de caspasa proapoptótica	Supuesta proteína de tipo estereocilina
Calicreína-14	Proteína cinasa 32B de serina/treonina	Proteína 1 de tipo integrina beta	Miembro 2 de la familia de tipo factor de crecimiento de insulina
Calicreína-6	Subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas	Proteína de tipo toloide 1	KIR2DL4
Subunidad beta-3 de laminina	Nogina	Inhibidor 3 de proteasa de tipo Kunitz	Supuesta alfa-2-glicoproteína de tipo 1 de zinc
Leucil-cistinil aminopeptidasa	Triptasa alfa-1	Proteína TMEM155	Miembro 4 de la familia de tipo factor de crecimiento de insulina
Serina proteasa 1 de lectina de unión a manano	Proteína 14 con repeticiones tetratricopéptido	Prosalusina	Proteína no caracterizada C2orf72
Serina proteasa 2 de lectina de unión a manano	Proteína B de gen transactivado XTP3	Proteína sin amnios	Proteína de tipo inicio de la replicación
Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos	Palmitoiltransferasa ZDHHC15	Proteína WFDC10B	Proteína 3 expresada en próstata y testículos
Neuropéptido Y	Proteína 3 de unión a esperma de zona pelúcida	Proteína 8 del dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP	Antígeno 4 de melanoma B
Proteína núcleo de agregano	Proteína 39 que contiene repeticiones ricas en leucina	Proteína Wnt-5b	Supuesta proteína no caracterizada C1orf191
Proteína B asociada al surfactante pulmonar	Triacilglicerol lipasa pancreática	Proteína Wnt-7b	Beta-defensina de tipo 108B
Proteína 1 relacionada con el receptor de poliovirus	Proteína transmembrana 139	Proteína 2 de unión a la zona pelúcida	Proteína no caracterizada FLJ90687
Renina	Factor inhibidor de la leucemia	Proteína de tipo 5 de unión a dominio SH3	Proteína 2 secretada relacionada con Frizzled
Ribonucleasa pancreática	Galectina-1	Molécula de adhesión de adipocitos	Péptido básico rico en prolina IB-1
Semenogelina-1	Quimiocina 21 con motivo C-C	Proteína no caracterizada C12orf59	Factor 16 de crecimiento de fibroblastos

ES 2 731 626 T3

Molécula de activación linfocítica de señalización	Similar al antígeno CD5	Proteína de unión a alipolipoproteína A-I	Inhibidor de serina proteasa Kazal de tipo 8
Inhibidor de la ruta del factor tisular	Hidrato de carbono sulfotransferasa 9	Claudina-17	Proteína no caracterizada KIAA0495
Usherina	Proteína de unión a lipopolisacáridos	Caspasa inactiva-12	Proteína de tipo 2 básica de plaquetas
Factor 23 de crecimiento de fibroblastos	Proteína 1 de neurona motora rica en cisteína	Proteína no caracterizada C7orf58	Serpina E3
Subunidad alfa de interleucina-23	Factor de crecimiento del tejido conectivo	Cadena de colágeno alfa-1 (XXVIII)	Receptor CR1
Proteína E1 secretora del epidídimo	Homólogo de proteína ojos cerrados	Proteína 4 de matriz de dentina	Fosfoproteína 1 secretada
Proteína 1 de tipo ADAMTS	Proteína 1 de tipo mucina	Proteína no caracterizada C16orf48	Proteína 1 secretada inducida por estrés
Factor de tipo quimiocina	Factor 19 de crecimiento de fibroblastos	Carboxilesterasa 3	Proteínas Wnt
Proteína 7 que contiene un dominio de tipo EGF	Proteína 3 relacionada con la folistatina	Proteína FAM20B	Proteína Wnt (fragmento)
Tectónica-1	Proteína de interacción con Hedgehog	Bucle de GPN GTPasa 3	Supuesta serina proteasa LOC138652
Proteína transmembrana 25	Receptor B de interleucina-17	Proteína 1B que contiene el dominio GRAM	TOM1
UDP-GalNAc: beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa 1	Regulador 5 de transporte de iones que contiene el dominio FXYD	Proteína U de la clase de biosíntesis de anclaje de glicanos de fosfatidilinositol	Supuesta proteína no caracterizada FLJ46089
Interleucina-15 (IL-15)	Lipasa endotelial	Subunidad alfa de interleucina-27	Supuesta proteína no caracterizada C1orf134
Múltiples dominios 11 de tipo factor de crecimiento epidérmico	Proteína 2 de la matriz extracelular de tipo fibulina que contiene EGF	Pro-neuregulín-4, isoforma unida a membrana	UDP-GlcNAc: betaGal beta-1,3-N-acetilglucosaminil-transferasa 9
Proteína de tipo mucina y cadherina	Otoraplina	Proteína 3 neuronal con repeticiones ricas en leucina	Proteína no caracterizada C11orf44
Ribonucleasa 4	Fosfolipasa secretora A2 de grupo 3	Proteína 2 regulada por el receptor NMDA	Proteína no caracterizada C12orf73
Proteína 3C que contiene el dominio SH2	Fosfolipasa A2 de grupo XV	Reductasa 1 de NADH-citocromo b5	Supuesta cistatina-9 de tipo 2
CMP-N-acetolneuraminato-beta-galactosamida-alfa-2,3-sialiltransferasa	Miembro 14 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral	Proteína 1 que contiene 7 dominios de la enfermedad de Parkinson	Supuesta proteína que contiene el dominio abhidrolasa FAM108A5
Proteína transmembrana 9	Plexina-A2	Proteína 11 de unión a FK506	Beta-defensina 133
Proteína 2 del dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP	Papilina	Miembro B de familia 12 de dominio de lectina de tipo C	Fibrosina-1
Receptor de adenosina A3	Procinetina-1	Miembro F5 de familia 35 de portador de soluto	Posible receptor del folato delta
Subunidad de gamma-secretasa APH-1A	Ribonucleasa 7	Lectina 12 de tipo Ig que se une al ácido siálico	RPE-espondina
Basigina	Inhibidor 1 de la proteasa tipo Kunitz	Proteína FAM19A3	Proteína de tipo NPIP ENSP00000346774
Proteína 7 que contiene repeticiones IAP de baculovirus	Espondina-2	Proteína 82 que contiene repeticiones WD	Supuesta proteína priónica específica de testículo

ES 2 731 626 T3

Calumenina	Testicano-2	Proteína 1 de unión a potenciador de adipocitos	Proteína 1 rica en prolina
Alfa-S1-caseína	Serina proteasa inactiva PAMR1	Proteína 3 de tipo ADMTS	Supuesta proteína no caracterizada FP248
Ciclina-I1	Torsina-2A	Proteína 80 que contiene el dominio de bobina enrollada	Proteína UPF0670 C8orf55
Factor de complemento H	Vasohibina-1	Intercambiador 1 de tiol de ecto-NOX disulfuro	Supuesta alfa-2-glicoproteína de tipo 2 de zinc
Hormona somatomotropina coriónica	Vasorina	Regulador 1 del crecimiento neuronal	Proteína SPARC
Receptor de coxsackievirus y de adenovirus	Xilosiltransferasa 1	Proteoglicano 1 de matriz de interfotoreceptor	Otopetrina-1
Miembro 2 de la familia ectonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa	Miembro 6 de la familia ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa	ADNc FLJ36603 fis, clon TRACH2015180, muy similar a la proteína 2 secretada relacionada con Frizzled	ADNc FLJ55667, muy similar a la proteína ácida secretada y rica en cisteína
Proteína alfa de tipo ERO1	Oncostatina-m	Miembro de la lipasa H	Miembro de la lipasa K
Factor de coagulación IX	Derlina-1	Mucina-19 (MUC-19)	Miembro C de familia 18 de dominio de lectina de tipo C
Receptor III-B de región Fc de gamma inmunoglobulina de baja afinidad	HERV-FRD_6p24.1 provirus ancestral Env poliproteína	Proteína 2 de gen candidato 1 a susceptibilidad de psoriasis	Supuesta proteína no caracterizada UNQ6125/PRO20090
Ficolina-3	Prostasina	Proteína 2A de membrana integral	Complemento C3
Proteína 2 de tipo receptor de Fc	Proteasa transmembrana, serina 11E	Proteína de transporte de vesículas SFT2B	Cadena de colágeno alfa-2 (IV)
Proteína transmembrana de repetición rica en leucina FLRT3	Antígeno de histocompatibilidad HLA clase I, cadena alfa Cw-16	Proteína 3A que contiene dominio A de factor de von Willebrand	Proteína no caracterizada UNQ6126/PRO20091
Gelsolina	Factor 1 inhibitorio de Wnt	Homólogo de proteína shisa-2	Proteína HMSD de tipo serpina
Granulisina	Péptido natriurético tipo C	Subunidad 3 de complejo de peptidasa señal	Proteína 4 expresada en próstata y testículos
Glicoproteína transmembrana NMB	Angiopoyetina-2	Proteína 2 de tipo sialomucina CD164	Cadena de colágeno alfa-1 (XXII)
Granulinas	Desoxirribonucleasa gamma	Cadherina-16	Supuesta proteína no caracterizada C13orf28
Heparanasa	Carboxipeptidasa A5	Cadherina-19	Cistatina-S
Región C de cadena de Ig mu	Quimiocina 14 con motivo C-C	Cerebelina-2	R-espondina-1
Interleucina-1 alfa	Interleucina-5	Proteína transmembrana C3orf1	C8orf2
Receptor A de interleucina-31	Interleucina-10	Proteína 1 de segmento ecuatorial de esperma	Proteína de unión al odorizante 2a
Molécula B de adhesión de unión	Quimiocina 2 con motivo C-X-C	Proteína no caracterizada C6orf72	Oporfina
Lipocalina-1	Quimiocina 5 con motivo C-X-C	Proteína no caracterizada C11orf24	Proteína regulada por andrógenos del riñón
Receptor 6 acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina	Una desintegrina y metaloproteinasas con motivos	Miembro 2 de la familia de acil-CoA sintetasa, mitocondrial	Supuesta proteína no caracterizada UNQ5830/PRO19650/PR

ES 2 731 626 T3

	trombospondina 6		O19816
Proteína 1 de unión beta a factor de crecimiento transformante latente	N-acetilgalactosaminil-transferasa 1 de polipéptido	Posible proteína transportadora de azúcar UDP SLC35A5	Supuesta proteína no caracterizada UNQ6975/PRO21958
Matrilina-3	Fibulina-2	Miembro A de familia 1 de dominio de lectina de tipo C	Taquiquina-3
Proteína 1 de tipo proteína de la mielina cero	Ficolina-1	Miembro A de familia 3 de dominio de lectina de tipo C	Fosfoproteína secretada 1
Proteína 2 de tipo neurobeachina	Citocina SL	Miembro E de familia 4 de dominio de lectina de tipo C	Esclerostina
Nicastrina	Folistatina	Miembro G de familia 4 de dominio de lectina de tipo C	Proteína 2 de tipo ADAMTS
ADP-ribosa pirofosfatasa, mitocondrial	Proteína 1 de la matriz extracelular relacionada con FRAS1	ATPasa 13A4 que transporta cationes probables	Proteína que contiene dominio rico en cisteína de receptor eliminador LOC284297
Protocadherina-15	Enamielina	Proteína UPF0480 C15orf24	Triptasa beta-1
Factor de crecimiento de la placenta	Proteína 1 de unión a hialuronano y proteoglicano	Proteína 4 de unión a esperma de zona pelúcida	Triptasa delta
Beta 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa 1 de manosa unida en O de proteínas	Miembro 3 de la subfamilia A del receptor de tipo inmunoglobulina leucocitaria	Proteína residente de retículo endoplásmico ERp27	Supuesta proteína 9 de región crítica de síndrome de ojos de gato
Posible hidrolasa PNKD	Interleucina-17F	Proteína transmembrana C16orf54	Proteína 1 que contiene el dominio de plexina
Pleyotrofina	Proteína accesoria de receptor de interleucina-1	Citocromo P450 4F12	Homólogo MC51 L-53L-54L (fragmento)
Receptor de poliovirus	Inhibidor de serina proteasa Kazal de tipo 5	Citocromo P450 4X1	Proteína placentaria de tipo COBW (fragmento)
Receptor de reticulón-4	Caliceína-15	Citocromo P450 4Z1	Factor 2 de tipo receptor de citocinas
Proteína amiloide A sérica	Interferón alfa-14	Proteína CREG2	Beta-defensina 103
Globulina de unión a hormonas sexuales	Beta-1-glicoproteína específica del embarazo 4	Miembro 9 de la subfamilia B de homólogo DnaJ	Beta-defensina 106
Miembro 6 de la familia SLAM	Colagenasa 3	Dipeptidasa 3	Hialuronidasa-3
Proteína asociada a la membrana sarcolémica	Metaloproteínasa-16 de matriz	Proteína de membrana FAM174A	Cadena alfa de receptor de interleucina-28
Proteína 1 que contiene dominio de pentraxina, EGF, factor de von Willebrand tipo A y sushi	Polipéptido activador de adenilato ciclasa pituitario	Proteína 15 que contiene el dominio de tiorredoxina	Proteína que contiene el dominio 54 de glicosiltransferasa
Globulina de unión a tiroxina	Procinetina-2	Proteína FAM19A4	Proteína 1 de tipo cordina
Proteína 1 que contiene dominios transmembranales y de bobina enrollada	Proteína 3 de unión beta de factor de crecimiento transformante latente	Proteína transferasa adenosín monofosfato-FICD	Supuesta proteína no caracterizada UNQ9370/PRO34162
Proteasa transmembrana, serina 3	Somatolibarina	Similar a la prenilcisteína oxidasa	Receptor de netrina UNC5B
Miembro 10C de la superfamilia de receptor del factor de necrosis tumoral	Proteína 1 que contiene dominio de trombospondina tipo 1	Similar a proteína que interactúa con fitanoil-CoA hidroxilasa	Proteína de forma secretada del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos FGFR-1 (fragmento)

ES 2 731 626 T3

Miembro 11B de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral	Factor angiogénico con parche G y dominios FHA 1	Regulador 4 de transporte de iones que contiene el dominio FXVD	Proteína no caracterizada ENSP00000244321
Serotransferrina	Receptor de TGF-beta tipo III	Factor 11 de crecimiento/diferenciación	ECE2
Triptasa beta-2	Subunidad beta de tirotropina	Factor neurotrófico de la dopamina cerebral	EPA6
Proteína YIPF5	Proteína no caracterizada C19orf36	Bucle de GPN GTPasa 2	Supuesto receptor 1 de interleucina soluble 18
Proteína B/C asociada a la proteína de membrana asociada a la vesícula	Proteína 2 relacionada con factor de necrosis tumoral de complemento C1q	Proteína transmembrana inducible por la hormona del crecimiento	Supuesta proteína que contiene el dominio abhidrolasa FAM108A6
ADNc, FLJ96669, muy similar a la proteína secretada por <i>Homo sapiens</i> , ácida, rica en cisteína (osteonectina) (SPARC), ARNm	Miembro 5 de la familia ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa	Proteína 2 que contiene el dominio glicerofosfodiodéster fosfodiesterasa	Supuesta proteína que contiene el dominio V-set e inmunoglobulina ENSP00000303034
ADNc FLJ77519, muy similar al ARNm de la proteína secretada relacionada con Frizzled por <i>Homo sapiens</i>	Proteína 2 de tipo polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa	Proteína 1 que contiene dominio WAP, kazal, inmunoglobulina, kunitz y NTR	Variante 4 del transcrito del antígeno de maduración de células B (miembro 17 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral)
Antígeno de diferenciación de células T CD6	Proteína 1 homóloga de slit	Proteína 1 que contiene el motivo KDEL	Proteína UPF0672 C3orf58
Pikachurina	Variante de hormona de crecimiento	Adipofilina	Metiltioribosa-1-fosfato isomerasa
Proteína 1 de tipo fibrinógeno	Proteína 3 relacionada con la angiopoyetina	Proteína de tipo lactasa	17-beta hidroxisteroide deshidrogenasa 13
Interleucina-32	Proteína 7 relacionada con la angiopoyetina	Condromodulina-1	Aminopeptidasa B
Matrilina-4	Ecto-ADP-ribosiltransferasa 5	Cadena de colágeno alfa-6 (VI)	Dermidina
Antígeno asociado a esperma 11B	Proteína 11 relacionada con la anhidrasa carbónica	Proteína 33 que contiene repeticiones ricas en leucina	Meteorina
Factor de coagulación XII	Ribonucleasa 11 posible	Proteína 1 que contiene el dominio MANSC	Proteína 7A de tipo metiltransferasa
Hepcidina	Carboxipeptidasa X1 posible	Lipocalina-15	NL3
Klotho	Proteína FAM3D	Ariilsulfatasa I	N-acetiltransferasa 15
Serglicina	Quimiocina 14 de motivo C-X-C	Candidato 2 al desarrollo mesodermo	Efrina-A4
Tomorregulina-2	Beta-defensina 127	Proteína 1 relacionada con Dickkopf	Proteína Plunc
Proteína 2 de tipo cordina	Beta-defensina 129	Podocano	Caliceína-11
Miembro 6B de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral	Proteína 2 secretora rica en cisteína que contiene el dominio LCCL	Proteína 1 que contiene el dominio de fibronectina tipo III	Variante x de corte y empalme de proteína 1 secretada inducida por WNT1 (fragmento)
Proteína transmembrana UPF0414 C20orf30	Factor de crecimiento de fibroblastos 21	Neurotrimina	Miembro 10 de la familia de interleucina-1
Miembro C de familia 4 de dominio de lectina de tipo C	alfa-L-fucosidasa plasmática	Receptor olfativo 10W1	PLA2G2D
Proteína UPF0317 C14orf159,	Gastrocina-1	Proteína PARM-1	Proteoglicano 3

ES 2 731 626 T3

mitocondrial			
Netrina-G2	Gastrocina-2	Proteína 2 que contiene el dominio PDZ	Péptido de tipo insulina INSL5
Metaloreductasa STEAP2	Glutación peroxidasa 7	Proepiregulina	Proteína 3 de tipo olfactomedina
Proteína 4 que contiene dominios de sushi	Proteína 1 de tipo HHIP	Proteína 1 de tipo enfermedad de riñón poliquístico 1	Lacritina de glicoproteína extracelular
Proteína YIF1B	Interferón kappa	WLPL514	Retinol deshidrogenasa 13
Apolipoproteína M	Apolipoproteína C-I	Metaloproteinasa-26 de matriz	Defensina de neutrófilos 3
Cadena beta de la proteína de unión a C4b	Potenciador 2 de endopeptidasa C de prolágeno	Proteína de tipo RELT 2	GLGQ5807
Cadena beta de glicoproteínas de la superficie de células T CD8	Factor 1 de determinación izquierda-derecha	Miembro E3 de familia 35 de portador de soluto	TUFT1
Quimiocina 3 similar a 1 con motivo C-C	Miembro 4 de la familia LGI de repeticiones ricas en leucina	Transportador de zinc ZIP9	DRLV8200
Factor 8 de crecimiento de fibroblastos	Subunidad Abraxas de complejo BRCA1-A	Noelina-2	IDLW5808
Proteína 24 central de sialomucina	Proteína 2 de cremallera de leucina	Proteína 2 de tipo 6 de convulsión	UBAP2
Ligando 2 de muerte celular programada 1	Neurexofilina-3	Semaforina-3A	Proteína 8 relacionada con C1q/TNF
Secretado y transmembrana 1	Osteomodulina	Semaforina-4C	KIR2DL4 (fragmento)
Proteína 6 relacionada con factor de necrosis tumoral de complemento C1q	Proteína 1 que contiene el dominio del inhibidor de la serina proteasa tipo Kazal	Proteína 14A que contiene el dominio de la abhidrolasa	Variante 2 del transcrito de la superfamilia 2 del factor de tipo quimiocina
Receptor de tipo 3 de hormona de tipo mucina que contiene módulo de tipo EGF	Proteína 3 asociada a la membrana del acrosoma espermático	Proteína 36 que contiene dominio de repeticiones de anquirina	Proteína 1 transmembrana asociada a queratinocitos
Noelina-3	Miembro 1 de la familia 3A de secretoglobina	Proteína shisa-4	GKGM353
Proteína 2b de unión a odorizante	Tsukushina	Neuromedina-u	MATL2963
Urotensina-2	Claudina-2 (SP82)	Homólogo nodal	NINP6167
Vitrina	Proteína 2 relacionada con factor H de complemento	Sinaptogirina-2	Similar a POM121
Proteína 3 de la ruta de señalización inducible WNT1	Proteína de repetición rica en leucina que contiene la superfamilia de inmunoglobulinas	Proteína 2 de tipo 2 asociada a inhibidor 1 de la angiogénesis específica del cerebro	RTFV9368 (regulación ascendente dependiente de SLE 1)
ADNc FLJ75759, muy similar a folistatina de tipo 3 de <i>Homo sapiens</i> (glicoproteína secretada) (FSTL3), ARNm	Proteína 1 de interacción con receptor nogo que contiene dominio de tipo inmunoglobulina y repeticiones ricas en leucina	Proteína 104 que contiene el dominio de bobina enrollada	Proteína 4 de interacción con receptor nogo que contiene dominio de tipo inmunoglobulina y repeticiones ricas en leucina
Enzima 2 convertidora de angiotensina	Kin de proteína 3 de tipo IRRE	Miembro 20 de la familia transmembrana 4 L6	KCNQ2
Adiponectina	Transductor de señal de células hematopoyéticas	Proteína transmembrana 107	ELCV5929

ES 2 731 626 T3

Proteína 4 relacionada con la angiopoyetina	Subunidad beta de folitropina	Proteína transmembrana 143	KVVM3106
Apolipoproteína A-V	Proteína 2 de actividad inhibidora de melanoma	Proteína transmembrana 178	ISPF6484
Asporina	Proteína 4 que contiene repeticiones ricas en leucina	Proteína transmembrana 205	LKHP9428
Proteína que aumenta la permeabilidad bactericida	Transportador de zinc 5	Proteína transmembrana 41 ^a	VNFT9373
Proteína 1 que contiene el dominio CUB	Proteína 1 neuronal de repeticiones ricas en leucina	Proteína transmembrana 50 ^a	ACAH3104
Proteína 1 de la capa intermedia de cartilago	Glicoproteína endosomal apical	Proteína transmembrana 50B	RVLA1944
Beta-Ala-His dipeptidasa	Proteína amiloide A-4 sérica	Interleucina-28B	Wpep3002
Cadena de colágeno alfa-1 (V)	Probetacelulina	Pentraxina-2 neuronal	ZDHHC11
Cadena de colágeno alfa-1 (XXV)	Beta-1,4-galactosiltransferasa 7	Colectrina	AGLW2560
Estradiol 17-beta-deshidrogenasa 11	3-hidroxitirato deshidrogenasa tipo 2	Proteína transmembrana 92	TSSP3028
Miembro 10 de la subfamilia C de homólogo de DnaJ	C1GALT1-chaperona específica 1	Proteína transmembrana 95	RFVG5814
Proteína 6 que contiene un dominio similar a EGF	Beta-caseína	Proteína transmembrana 9B	SHSS3124
Cadena A de factor de coagulación XIII	Kappa-caseína	Carboxipeptidasa PM20D1 posible	MMP19
Glucosa-6-fosfato isomerasa	Proteína transmembrana C2orf18	Tetraspanina-12	GSQS6193
Hormona reguladora del apetito	Cadena catalítica de la carboxipeptidasa N	Tetraspanina-13	VGPW2523
Subunidad beta de interleucina-12	Antígeno CD320	Tetraspanina-15	LMNE6487
Interleucina-22	Condroitina sulfato sintasa 1	Proteína transmembrana UPF0513	ALLA2487
Intelectina-1	Condroitina sulfato sintasa 2	Proteína 4 de desacoplamiento mitocondrial	GALI1870
Proteína 1 inactivada por glioma rico en leucina	Molécula 7 de tipo CMRF35	Poliserasa-2	FRSS1829
Antígeno 96 linfocítico	Homólogo 3 de proteína Canopy	Palmitoiltransferasa ZDHHC24 posible	MRSS6228
Matrilisina	Deshidrogenasa de cadena corta/reductasa 3	Proteína 1 de unión a esperma de la zona pelúcida	GRPR5811
Mucina-20	Proteína 4 de tipo delta	Proteína 2 de unión a esperma de la zona pelúcida	AVLL5809
Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9	Receptor relacionado con el factor de crecimiento epidérmico tipo Delta y Notch	Subunidad 7 de complejo Golgi oligomérica conservada	receptor CR1 C3b/C4b SCR9 (o 16) término C. SCR de exón = repetición de consenso corta
Proteína de reconocimiento de peptidoglicano	Dolicol cinasa	Proteína 2 del receptor de adiponectina	PIKR2786

ES 2 731 626 T3

Proteína de 17 kDa inducida por interferón	Enzima convertidora de endotelina de tipo 1	Cadena C beta inhibina	Proteína A7 de unión a calcio S10 de tipo 3
Proteína Wnt-4	Proteína 2B de membrana integral	Brorina	GTWW5826 (proteína LP5085)
Factor inflamatorio aloinjerto de tipo 1	Proteína 5 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina	Semaforina-3C	KTIS8219 (HCG2020043)
Proteína 3 unida a la repetición de armadillo que contiene X	Molécula de adhesión selectiva de células endoteliales	Heparán sulfato glucosamina 3-O-sulfotransferasa 2	Proteína 4 de unión a hialuronano y proteoglicano
Sulfato N-acetilgalactosaminiltransferasa 1 de ondroitina	Proteína 1 que contiene dominio de tipo péptido señal, CUB y EGF	Transcrito de tipo 1 que se solapa con el receptor de leptina	Micronivel
Quitotriosidasa-1	Proteína 3 relacionada con factor H del complemento	Proteína 1 de tipo SPARC	SAMK3000
Proteína 1 que contiene el dominio Claudina	Prorelaxina H1	Fibulina-7	VFLL3057
Erlina-2	Proteína 1 relacionada con folistatina	Homólogo 1 de proteína HEG	CVWG5837
Proteína 1 que contiene el dominio glicosiltransferasa 8	Globósido alfa-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa 1	Proteína 1 que contiene el dominio fibrinógeno C	VGSA5840
Proteína de membrana de Golgi 1	Gamma-glutamil hidrolasa	Miembro A de fosfolipasa A1	GHPS3125
Posible receptor 125 acoplado a proteína G	Cadherina-24	Proteína 2 rica en prolina salival básica	GRTR3118
Cadena alfa de receptor de interleucina-20	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa 3	Proteína 6 asociada a espermatogénesis	PAMP6501
Galectina-7	Receptor 56 acoplado a proteína G	Proteína SRPX2 que contiene repeticiones de sushi	LTLL9335
Ligando 4 NKG2D	Proteína 2 de unión a hialuronano	Homólogo 1 de proteína de gastrulación torcida	VCEW9374
L-amino-ácido oxidasa	Factor de crecimiento de tipo EGF que se une a la proheparina	Torsina-1 B	AHPA9419
Prolil 3-hidroxilasa 1	Glicoproteína rica en histidina	Proteína Wnt-5a	MDHV1887
GPI etanolamina fosfato transferasa 2	Hidrato de carbono sulfotransferasa 14	Proteína de unión a la acrosina	HSAL5836
GPI etanolamina fosfato transferasa 3	Cadena beta de receptor de interleucina-20	Miembro B de la familia 18 de dominio de lectina de tipo C	LHLC1946
Proteína SCaMC-2 portadora mitocondrial de unión a calcio (proteína 2 portadora mitocondrial de unión a calcio pequeña)	Miembro 3 de la familia ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa	Proteína transmembrana asociada a lisosoma 4A	Proteína 3 asociada a carcinoma de paladar largo, pulmón y epitelio nasal (proteína de unión a ligando RYA3)
Proteína A2 asociada al surfactante pulmonar	Proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina 7	Semaforina-3E	LPPA601
Factor de corte y empalme, rico en arginina/serina 16	Calistatina	Ameloblastina	PINK1
Alfa-N-acetilgalactosaminida alfa-2,6-sialiltransferasa 6	Proteína 3B que contiene dominio tipo III de	Proteína 5 que contiene dominio de la superfamilia	SERH2790

ES 2 731 626 T3

	fibronectina	facilitadora principal	
Receptor relacionado con Ig-1 de Ig individual	Receptor del factor inhibidor de la leucemia	Angiopoyetina-1	FLFF9364
Tectónica-3	Homólogo B de Lin-7	Angiopoyetina-4	APELINA
Miembro 11 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral	Proteína 1 transmembrana relacionada con la tiorredoxina	Múltiples dominios 9 de tipo factor de crecimiento epidérmico	GLSH6409
Miembro 19 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral	Proteína 32 que contiene dominio de desintegrina y metaloproteínasa	Fosfodiesterasa 3a de tipo esfingomielinasa ácida	SFVP2550
Palmitoiltransferasa ZDHHC9	Proteína 3 que contiene dominio Ly6/PLAUR	Proteína 5 de tipo ADAMTS	RRLF9220
Fibulina-5	Miembro A de la familia 14 de dominio de lectina de tipo C	Espexina	PTML5838
Inhibidor de la proteasa dependiente de proteína Z	Homólogo de proteína comichon	Supuesta tripsina-6	VLGN1945
Alfa-2-macroglobulina	Proteína FAM151A	Proteína protooncogén Wnt-1	AVPC1948
Proteína relacionada con el agutí	Proteína 14 de unión a FK506	Proteína 3b morfogenética de hueso	AWQG2491
Alfa-amilasa pancreática	Proteína 2 de tipo toloide y neuropilina	Proteína 5 morfogenética de hueso	PSVL6168
Péptidos natriuréticos B	Protocaderina beta-13	Proteína 8B morfogenética de hueso	LCII3035
Factor natriurético auricular	Prenilcisteína oxidasa 1	Proteína FAM26D	PPRR6495
Ceramidasa neutral	Peflina	Factor relacionado con C1q	RLSC6348
Beta-2-microglobulina	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa tipo 1	Proteína 1 del dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP	CSRP2BP
Proteína 4 morfogenética de hueso	Antígeno de células madre de próstata	Cerebelina-1	GLLV3061
Biotinidasa	Homólogo 2 de proteína en parche	Carboxipeptidasa O	GWSI6489
Proteína M130 de tipo 1 rica en cisteína de receptor eliminador	Quitobiosildifosfodolico beta-manosiltransferasa	Proteína 2 de tipo proteína de la mielina cero (antígeno 1 epitelial tipo V)	ADNc FLJ53955, muy similar a la proteína 4 secretada relacionada con Frizzled
Carboxipeptidasa B2	Homólogo 1 de proteína sel-1	Proteína 1 de tipo serina proteasa 1	PPIF
Carboxipeptidasa Z	ProSAAS	Proteína 70 que contiene el dominio de bobina enrollada	VSSW1971
Quimiocina 5 con motivo C-C	Lectina 9 de tipo Ig que se une a ácido siálico	Quimiocina 28 con motivo C-C	KLIA6249
Quimiocina 7 con motivo C-C	Proteína 1 de tipo SLIT y NRTK	Proteína no caracterizada C4orf29	ALLW1950
Quimiocina C-C 8	Estaterina	Proteína 2 que contiene el dominio CUB	GVEI466
Glicoproteína CD59	Testisina	Proteína 4 de transcrito de tipo Trem	ESFI5812
Factor de complemento I	Proteína 5 de tipo canal transmembrana	Proteína no caracterizada C6orf58	GNNC2999
Clusterina	Proteasa transmembrana,	Condroadherina	AAGG6488

ES 2 731 626 T3

	serina 4		
Cadena de colágeno alfa-2 (I)	Supresor de metástasis KiSS-1	Proteína 2 de capa intermedia de cartilago	HHSL751
Cadena de colágeno alfa-1 (III)	Polipéptido amiloide de los islotes	Proteína no caracterizada C10orf25	Beta-defensina 108B
Cadena de colágeno alfa-1 (IV)	Proteína 2 de transcrito de tipo Trem	Istmina-1	Beta-defensina 118
Cadena de colágeno alfa-3 (IV)	Proteína 12 que contiene el dominio tiorredoxina	Cistatina-8	Beta-defensina 124
Cadena de colágeno alfa-5 (IV)	Factor de crecimiento endotelial vascular B	Cardiotrofina-1 (CT-1)	Beta-defensina 125
Cadena de colágeno alfa-3 (VI)	Factor de crecimiento endotelial vascular C	Quimotripsinógeno B	Beta-defensina 126
Componente de complemento C6	Reticulocalbin-3	Quimiocina 9 con motivo C-X-C	Desoxirribonucleasa-1 de tipo 2
Cadena de colágeno alfa-1 (IX)	Fibrilina-1	Quimiocina 13 con motivo C-X-C	Estaniocalcina-2
Cadena de colágeno alfa-1 (X)	Proteína FAM3A	EMILIN-3	Molécula 1 específica de células endoteliales
Cadena de colágeno alfa-1 (XVII)	Proteína G7c	Secretagogina	Carboxilesterasa 7
Cadena de colágeno alfa-1 (XXI)	Proteína 1 de tipo toloide y neuropilina	Proteína secretora de epidídimo E3-alfa	Homólogo de proteína NOV
Subunidad alfa de coatómero	Glicoproteína 11 beta-1 específica del embarazo	Epificano	Proteína UPF0528 FAM172A
Receptor de complemento tipo 1	Serpina B4	Proteína FAM5C	Subunidad beta de interleucina-27
Cistatina-SN	ADAM DEC1	Factor 20 de crecimiento de fibroblastos	Proteína FAM3C
Desoxirribonucleasa-1	Glucocinasa dependiente de ADP	Proteína 3 de unión al factor de crecimiento de fibroblastos	Proteína 1 de tipo factor 2 derivado de células estromales
Proteína 1 de matriz extracelular	Alfa-amilasa 2B	Proteína transmembrana 204	Miembro A1 de la subfamilia 1 de butirofilina
Receptor III-A de región Fc de gamma inmunoglobulina de baja afinidad	UDP-GlcNAc: betaGal beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa 3	Proteína 4 de unión a fosfatidiletanolamina	Proteína 2 transmembrana asociada a queratinocitos
Alfa-fetoproteína	Péptido 2 relacionado con el gen de calcitonina	Factor de coagulación V	Receptor Fc de inmunoglobulina alfa
Factor 2 de crecimiento de unión a heparina	Carboxipeptidasa E	Factor de coagulación VII	EMILINA-2
Cadena gamma de fibrinógeno	Factor 1 de citocina tipo cardiotrofina	Pro-MCH	Receptor 10 de efrina tipo A
Factor 5 de crecimiento/diferenciación	Cadena de colágeno alfa-2 (VIII)	Receptor de folato gamma	Exostosina tipo 2
Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial	Homólogo 2 de migas	Mucina-7	Proteína 4 relacionada con la folistatina
Proteína 3 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina	Fosfoproteína 1 ácida de la matriz de dentina	Péptido de tipo galanina	Proteína 5 relacionada con la folistatina
Factor IA de crecimiento de tipo insulina	Molécula de adhesión celular de síndrome de Down	Hemicentina-1	Proteína transmembrana 66

ES 2 731 626 T3

Región C de la cadena de Ig gamma-1	Miembro 1 de la superfamilia inmunoglobulinas	Interleucina-6	Factor 2 de crecimiento/diferenciación
Región C de la cadena de Ig gamma-2	Interleucina-4	Factor 1 de diferenciación/crecimiento embrionario	Receptor de la familia GDNF alfa-4
Región C de la cadena de Ig gamma-3	Subunidad alfa de interleucina-6	Interleucina-8	Región C de la cadena de Ig gamma-4
Insulina tipo 3	Interleucina-24	Gremlina-2	Antígeno linfocítico 86
Cadena pesada de inhibidor inter-alfa-tripsina	Ladinina-1	Estromelina-2	Cadena E beta inhibina
Proteína UPF0378 KIAA0100	Miembro de la lipasa I	Posible receptor 171 acoplado a proteína G	Proteína 1C que contiene el dominio GRAM
Cinínogeno-1	Proteína 1 relacionada con la lipasa pancreática	Papalisina-2	Interferón alfa-10
Subunidad alfa-2 de laminina	Alfa-2-glicoproteína rica en leucina	Glicoproteína asociada a microfibrillas 4	Interferón alfa-16
Subunidad alfa-4 de laminina	Proteína 5 asociada a remodelación de matriz	Neuromedina-B	Interferón alfa-6
Subunidad beta-1 de laminina	Netrina-4	Mimecán	Miembro 21 de la superfamilia inmunoglobulinas
Proteína-lisina 6-oxidasa	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos	Metaloproteinasa-19 de matriz	Agrina
Multimerina-1	Quimiocina 22 con motivo C-C	Interleucina-11	Prolactina
Copeptina 2 de vasopresina-neurofina	Nictalopina	Interleucina-17A	Proteína 11 de tipo Kelch
Nidógeno-1	Osteocalcina	Interleucina-18	Proteína Wnt-16
Fosfolipasa A2,	Proteína 3 rica en prolina salival básica	Interleucina-26	Properdina
Perforina-1	Glicoproteína 10 beta-1 específica del embarazo	Interleucina-28A	Caliceína-13
Fosfatidilinositol-glicano-fosfolipasa D específica	Proteína transmembrana de repetición rica en leucina FLRT2	Proteína 3 que contiene dominio emp24 transmembrana	1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa delta
Fibrocistina	R-espondina-3	Interleucina-29	Caliceína-9
Proteína de transferencia de fosfolípidos	Sialoadhesina	Péptido de tipo insulina INSL6	Proteína S dependiente de la vitamina K
Fosfatasa ácida prostática	Tripsina-3	Proteína Wnt-2b	Proteína 8 de tipo butirofilina
Proteína Z dependiente de la vitamina K	Dipeptidasa 2	Glicoproteína 1 beta-1 específica del embarazo	Subunidad beta-4 de laminina
Fosfoproteína 1/2 rica en prolina salival ácida	Proteína 1 que contiene dominio de EGF de unión a calcio y colágeno	Proteína 4 asociada a la membrana del acrosoma espermático	Receptor 1 endotelial de vasos linfáticos del ácido hialurónico
Proteína de la zona de embarazo	Proteína de tipo gen 1 específico de células germinales	Subunidad gamma-3 de laminina	Cistatina-SA
Prorelaxina H2	Proteína 31 que contiene repeticiones ricas en leucina	Homólogo 3 de lisil oxidasa	Proteína transmembrana 59
Semaforina-4D	Apolipoproteína o	Neurotensina/neuromedina N	Proteína 2 de tipo apolipoproteína(a)

ES 2 731 626 T3

Proteína 2 de homólogo Slit	Distroglicano	Proteína 2 que contiene el dominio MAM	Proteína de tipo lisozima 2
Alfa-tectorina	Defensina de neutrófilos 4	Proteína 2 asociada a microfibrillas	Proteína 4 de tipo lisozima
Tenascina-X	Proteína 3 inducida por anfoterina	Proteína 2 de actividad inhibidora del melanoma	Reelina
Factor de trébol 3	Subunidad de gamma-secretasa APH-1 B	Metaloproteinasa-24 de matriz	Proteína 4 de unión a retinol
Proteína 1 del receptor de transferrina	Apolipoproteína C-IV	Metaloproteinasa-25 de matriz	Anhidrasa carbónica 14
Factor de crecimiento protransformante alfa	Arilsulfatasa G	Netrina-1	Antígeno de nefritis tubulointersticial
Factor de crecimiento transformante beta-2	Factor activador de la glia	Netrina-3	Neuropéptido W
Miembro 6 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral	Proteína 18 que contiene el dominio de reclutamiento de caspasa	Alfa-N-acetilgalactosaminida alfa-2,6-sialiltransferasa 1	Alfa-1,3-manosil-glicoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa B
Miembro 1B de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral	Heparán sulfato glucosamina 3-O-sulfotransferasa 3A1	Alfa-N-acetilgalactosaminida alfa-2,6-sialiltransferasa 3	Proteína 5 que contiene dominio emp24 transmembrana
Miembro 5 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral	Ectoenzima de degradación de la hormona liberadora de tirotrópina	Proteína reguladora del crecimiento derivada del melanoma	Proteína 3 relacionada con el factor de necrosis tumoral de complemento C1q
Trombopoyetina	Guanilina	Péptidos relacionados con FMRFamida	Proteína 1 de tipo podocan
Péptidos VIP	Proteína 3 de tipo transportador de colina	Otoconina-90	Glicoproteína 5 beta-1 específica del embarazo
Citinasas ácidas de mamíferos	17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa 14	Neurturina	Queratocano
Proteína 2 secretora rica en cisteína	Polipéptido 1 de tipo inmunoglobulina lambda	Neurexofilina-1	Fosfolipasa secretora A2 del grupo IIE
Proteína relacionada con la haptoglobina	Miembro 14 de la subfamilia B homólogo DnaJ	Neurexofilina-2	Factor 2 de determinación de izquierda-derecha
Quimiocina 26 con motivo C-C	Proteína 8 sólo con caja F	Variante 4 de factor plaquetario	Ligando NKG2D 2
Colectina-11	Fibroleucina	Nociceptina	Metalooelastasa de macrófagos
Proteína 2 rica en cisteína con dominio tipo EGF	Metionina-R-sulfóxido reductasa B3, mitocondrial	Proteína 1 que contiene dominio transmembrana y V-set	Receptor de activación expresado en células mieloides 1
Quimiocina 16 con motivo C-X-C	Miembro 2 de la familia LGI con repeticiones ricas en leucina	Proteína rica en prolina 4	Factor 1 de tipo receptor de citoquinas
Proteína 1 de unión a factor de crecimiento de fibroblastos	Proteína de transporte de vesículas GOT1B	Péptido liberador de prolactina	Secretina
Miembro 5 de la familia de interleucina-1	Proteína de membrana integral GPR177	Serina proteasa 33	Factor 2 derivado de células estromales
Miembro 9 de la familia de interleucina-1	Posible receptor 78 acoplado a proteína G	Glicoproteína 8 beta-1 específica del embarazo	Proteína 6 de tipo lisozima
Caliceína-5	Miembro 2 de la familia HEPACAM	Retbindina	Serpina A9

ES 2 731 626 T3

Matrilina-2	Subunidad alfa de receptor de interleucina-27	Péptidos relacionados con FMRFamida	Proteína 1 que contiene dominio de esclerostina
Receptor 1 de glicoproteína CD200 de superficie celular	Proencefalina-A	Ribonucleasa K6	Lisocardiolipin aciltransferasa 1
Fosfatasa ácida lisofosfatídica tipo 6	Integrina alfa-10	Ribonucleasa T2	Glutamato carboxipeptidasa plasmática
Factor de intercambio de nucleótidos SIL1	Proteína 1 que contiene el motivo KTEL	Repetina	Proteína 3 de homólogo Slit
Proteína 4 que contiene el dominio de trombospondina tipo 1	Miembro 5 de la subfamilia A del receptor de tipo inmunoglobulina leucocitaria	Proteína de tipo de subcomponente complemento C1r	Proteína 8 que contiene el dominio alfa-2-macroglobulina de tipo C3 y PZP
Proteína 2 de la ruta de señalización inducible por WNT1	Proteína 3 que contiene el dominio de fibronectina tipo III y repeticiones ricas en leucina	Glicosiltransferasa AER61 no caracterizada	Proteína 2 que responde al receptor del ácido retinoico
Proteína 9 que contiene bromodominio	Uteroglobina	Semaforina-3G	Proteína 1 ácida del cartílago
Proteína 2 de tipo antígeno CD99	Ligando de netrina-G1	Miembro 1 de la familia 1C de secretoglobina	Estaniocalcina-1
Proteína no caracterizada C1orf159	Panexina-1	Miembro 1 de la familia 1D de secretoglobina	Beta-tectorina
Hidrato de carbono sulfotransferasa 12	Protocadherina-12	Miembro 2 de la familia 1D de secretoglobina	Fijación post-GPI a factor 3 de proteínas
Posible serina carboxipeptidasa CPVL	Protocadherina alfa-10	Serpina A12	Proteína de gen 1 específica de células germinales
Mucina-3A	Protocadherina beta-10	Serpina I2	Receptor de interleucina-21
Proteína 1 que contiene dominio de tipo zona pelúcida y CUB	Proteína 1 transmembrana asociada a osteopetrosis	Proteína que contiene dominio EGF y factor C de von Willebrand	Proteína 4 que contiene dominio de inmunoglobulina y V-set
Polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 14	Beta-galactósido alfa-2,6-sialiltransferasa 1	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 15.	Proteína del grupo B que contiene dominio rico en cisteína de receptor eliminador
Galectina-9	Componente de GPI transamidasa PIG-S	Subunidad del canal de sodio beta-2	Protiroliberina
Proteína 17 que contiene repeticiones ricas en leucina	Proteína transmembrana rica en prolina 3	Inhibidor de metaloproteinasa 4	Semaforina-4A
Proteína neuronal 2 rica en leucina	Sulfhidril oxidasa 2	Proteína inmunomoduladora de células T	
Sulfato de heparano bifuncional N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 3	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 16	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 10	Miembro 27 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral
Tuftelina	Proteína 3A que contiene el dominio SH2	Linfopoyetina del estroma tímico	Receptor 7 de tipo Toll
Proteína portadora mitocondrial del cerebro	Proteína 4 transformadora de SHC	Proteína transmembrana 130	
Proteína 3 que contiene dominio de tipo EGF, CUB y péptido señal	Proteína 23 que contiene dominios de desintegrina y metaloproteinasa	Única proteína asociada a la matriz del cartílago	Proteína 16 que contiene el dominio tioredoxina
14-3-3 proteína sigma	Proteína 2 de tipo	Urocortina-2	Alfa-2-antiplasmina

	transducina beta		
Glicoproteína alfa-1-ácida 1	Proteína 10 que contiene el dominio Tudor	Urocortina-3 (Proteína 3 del dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP
Glicoproteína alfa-1-ácida 2	Miembro 3 de la superfamilia 9 transmembrana	Proteína AMBP	Proteína WFDC9
Proteína 1 que contiene dominio de factor A de von Willebrand	Proteína que contiene dominio EGF y de factor D de von Willebrand	Proteína de tipo 9 relacionada con el factor de necrosis tumoral de complemento C1q	Una desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 14
Proteína 9 que contiene dominios de desintegrina y metaloproteinasas	Una desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 17	Proteína 88 relacionada con la diferenciación e inhibición del crecimiento	Proteína asociada a la membrana plasmática del adipocito
Angiotensinógeno	Proteína 2 de tipo canal transmembrana	Proteína Wnt-10a	Homólogo de peroxidasa
Apolipoproteína A-II (ApoA-II)	Glicoproteína 3 beta-1 específica del embarazo	Proteína Wnt-3a	Homólogo de la proteína de anquilosis progresiva
Apolipoproteína A-IV (ApoA-IV)	Tenomodulina	Proteína protooncogén Wnt-3	Proteína 1 de tipo quitinasa-3
Apolipoproteína C-II (ApoC-II)	Tetraspanina-6	Proteína Wnt-6	Proteína UPF0672 CXorf36
Beta-2-glicoproteína 1	Proteína 5 que contiene el dominio tiorredoxina	Proteína Wnt-9a	Ariulfatasa J
Proteína 3 relacionada con la apoptosis	Factor D de crecimiento endotelial vascular	Citocina SCM-1 beta	Cortistatina
Beta-secretasa 2	Glicoproteína 9 beta-1 específica del embarazo	Proteína 16 de la membrana de gránulos de zimógeno	Ceruloplasmina
Transferasa del sistema de grupos sanguíneos ABO histo	Semaforina-3F	Proteína 1 de unión a la zona pelúcida	Proteína 5 relacionada con la angiopoyetina
Catepsina L2	Proteína 2 de tipo fosfatasa ácida	Homólogo 3 de proteína de gradiente anterior	Proteína 126 que contiene el dominio de bobina enrollada
Quimiocina 3 con motivo C-C	Similar a apolipoproteína O	Amelotina	Antígeno CD177
Miembro B de familia 1 de dominio de lectina de tipo C	Beta-defensina 119	Proteína no caracterizada C5orf46	Homólogo 4 de proteína Canopy
Regulador 1 de canal de cloruro regulado por calcio	Una desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 12	Proteína cinasa 1 que contiene el dominio aarF no caracterizada	Proteína C4orf31 que contiene dominio de fibronectina de tipo III
Cimasa	Proteína FAM131A	Draxina	Proteína FAM180A
Cadena de colágeno alfa-1 (VI)	Proteína FAM3B	Factor 18 de crecimiento de fibroblastos	Proteína básica plaquetaria
Cadena alfa de componente de complemento C8	Proteína de tipo beta-galactosidasa-1	Quimiocina 11 con motivo C-X-C	Interferón épsilon
Componente de complemento C9	Proteína 1 de tipo lisozima g	Proteína 6 que contiene dominio Ly6/PLAUR	Intelectina-2
Proteína 2 que contiene el dominio de glucosa-fructosa oxidoreductasa	Proteína de tipo H5 de cadena pesada del inhibidor de inter-alfa-tripsina	Miembro 1 de la familia de elastasa de tipo quimotripsina	Alfa-1,3-manosil-glicoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa A
Miembro 11 de la subfamilia B de homólogo DnaJ	Proteína 5 asociada a acrosoma de esperma	Receptor de eritropoyetina	Fosfoglicoproteína de matriz extracelular

ES 2 731 626 T3

Miembro 7 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa	Proteína 2 que interactúa con receptor nogo que contiene dominio de tipo inmunoglobulina y repeticiones ricas en leucina	Proteína 2 de anclaje del glicosilfosfaridilinositol que contiene el dominio MAM	ADNc FLJ77863, muy similar a <i>Homo sapiens</i> secretado y transmembrana 1 (SECTM1), ARNm
Retículo endoplásmico aminopeptidasa 1	Proteína 2 asociada al surfactante	Metaloproteinasa-27 de matriz	Lipocalina-6 específica de epidídimo
Receptor tirosina-proteína cinasa erbB-3	Proteína 1 del receptor de adiponectina	Serina proteasa inactiva 35	Afamina
Proteína residente de retículo endoplásmico ERp44	Múltiples dominios similares al factor de crecimiento epidérmico 6	Proteína 134 que contiene el dominio de bobina enrollada	ATPasa 13A5 posible que transporta cationes
Proteína de unión a IgGfc	Proteína neuroendocrina 7B2	Suprabasina	Glutatión peroxidasa 3
Proteína 1 relacionada con el factor H de complemento	Alfa-1 B-glicoproteína	Miembro 4 de la familia 1D de secretoglobina	Claudina-18
Polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 2	Proteína 2 que contiene dominios WAP, kazal, inmunoglobulina, kunitz y NTR	Proteína 2A que contiene dominios transmembrana y V-set	Supuesta proteína de tipo receptor de inmunoglobulina de células citolíticas KIR3DP1
Hemopexina	Acetilacetamida desacetilasa tipo 1	ADM	Receptor A2 de fosfolipasa secretora
Activador del factor de crecimiento de hepatocitos	Histatina-3	Proteína no caracterizada C2orf82	Haptoglobina
Proteína génica relacionada con la clase I del complejo de histocompatibilidad principal	Pro-neuregulina-3, isoforma unida a membrana	Miembro 1 de la familia de tipo factor de crecimiento de insulina	Molécula 20 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario
Proteína 6 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina	Proteína de señalización de agutí	Proteína 29 de tipo cadherina	Proteína 3 morfogénica de hueso
Región C de la cadena de Ig delta	Claudina-8	Proteína 15 morfogénica de hueso	Antígeno 2 estromal de médula ósea
Interleucina-1 beta	Proteína UPF0454 C12orf49	Inhibidor de la serina proteasa plasmática	Citocromo P450 20A1
Proteína 10 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad	Proteína 5B1 que contiene dominio de factor A de von Willebrand	Molécula 21 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario	Proteína de tipo 3 que aumenta la permeabilidad/capacidad bactericida
Molécula C de adhesión de unión	Cadherina-6	Alfa-lactalbúmina	Homólogo 2 de proteína dpy-19
Proteína no caracterizada KIAA0319	Péptido antimicrobiano de catelicidina	Proteína de cohesión de la cromátida hermana DCC1	Fosfolipasa secretora A2 del grupo IIF
Subunidad alfa-5 de laminina	Subunidad gamma-1 de laminina	Proteína de unión a la galectina-3	Carboxipeptidasa B
Proteína 4 que contiene el dominio de fibronectina tipo III	Miembro 7B de la familia SDR deshidrogenasa/reductasa	Proteína 1 que contiene el dominio de la cadena pesada de dineína	Proteína 2 que contiene el dominio glicosiltransferasa 8
Lipoproteína lipasa	Quimiocina 16 con motivo C-C	Quimiocina 17 con motivo C-C	Proteína FAM19A1
Colagenasa intersticial	Quimiocina 24 con motivo C-C	Acil-CoA reductasa grasa 1	Receptor de la familia GDNF tipo alfa
Metaloproteinasa-9 de matriz	Proteína que contiene repeticiones HEAT C7orf27	Homólogo de factor de iniciación fin bud	Posible glutatión peroxidasa 8
Mucina-16	Cadena de colágeno alfa-2	Receptor de	Cistatina-D

ES 2 731 626 T3

	(IX)	inmunoglobulina polimérica	
Mucina-2	Cadena de colágeno alfa-3 (IX)	Proteína de tipo priónico doppel	Cistatina-F
Mucina-5B	Colipasa	Quimioquina 6 con motivo C-X-C	Factor de activación plaquetaria acetilhidrolasa
Miocilina	Cadena de colágeno alfa-1 (XXVII)	Quimiocina 10 con motivo C-X-C	Papalisina-1
Receptor 1 de lipoproteínas oxidadas de baja densidad	Subunidad 2 de carboxipeptidasa N	Beta-defensina 1	Miembro 12 de familia 22 de portador de soluto
Proteína de gen 1 sobreexpresado en tumor protáctico	Proteína 4 neuronal transmembrana con repeticiones ricas en leucina	Proteína 2 de unión a hialuronano y proteoglicano	Hormona tipo 1 de somatomotropina coriónica
Proteína cinasa 2 de serina/treonina que interactúa con el receptor	Proteína 1 que contiene repetición de triple hélice de colágeno	Proteína 30 que contiene dominio de desintegrina y metaloproteinasa	Regulador de la dinámica de microtúbulos de proteína 3
Transportador de nucleósidos equilibrante 3	Endotelina-2	Supresor de homólogo fusionado	Retinol deshidrogenasa 14
Selenoproteína P	Fibromodulina	Receptor de folato beta	Galanina
Proteína D asociada a surfactante pulmonar	Receptor Fc de tipo B	Sulfatasa extracelular Sulf-2	Transcobalamina-2
Estimulado por homólogo de la proteína de gen 6 de ácido retinoico	Proteína que contiene dominio de RAD18 de dedo de zinc C1orf124	Miembro 14 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral	Proteína 1 que contiene el dominio catecol-O-metiltransferasa
Factor de trébol 1	Factor 15 de crecimiento/diferenciación	Artemina	Tripeptidil-peptidasa 1
Inhibidor 2 de la ruta del factor tisular	Nexina derivada de la glia	Cadena de colágeno alfa-1 (XII)	Proteína 1 de transcrito de tipo Trem
Protrombina	Progonadoliberina-1	Cadena de colágeno alfa-1 (XIV)	Activador 2B de guanilato ciclasa
Receptor 9 de tipo Toll	Granzima k	Beta-defensina 2	Coestimulador de células T inducible
Molécula 4 de adhesión intercelular	Interferón alfa-17	Interleucina-21	
Interleucina-19	Interferón alfa-21	Interleucina-3	
Istmina-2	Interferón alfa-8	Interleucina-7	Proteína de tipo homólogo 2 N-terminal de muesca
Kin de proteína 1 de tipo IRRE 1	Interferón omega-1	Cadena alfa de inhibina	Subunidad beta-2 de laminina
Caliceína-10	Péptido de tipo insulina de placenta temprano	Subunidad alfa-3 de laminina	Neuropilina-2
Proteína 4 de unión a factor beta de crecimiento transformante latente	Proteína 1 que contiene siete dominios transmembrana, latrofilina y EGF	Miembro de la familia SDR deshidrogenasa/reductasa en el cromosoma X	Proteína 1 de la matriz extracelular de tipo fibulina que contiene EGF
Par de receptores de inmunoglobulina tipo 2 alfa	Proteína 1 de dominios con repeticiones de anquirina y fibronectina tipo 3	Regulador 6 de transporte de iones que contiene el dominio FXYD	Receptor de tipo tirosina-proteína fosfatasa kappa
Proteína 3 alfa derivada de la regeneración de islotes	Homólogo 4 de lisil oxidasa	Incorporador 2 de serina	Proteína 4 derivada de la regeneración de islotes
E3 ubiquitina-proteína ligasa RNF5	Lumicano	Estromelisina-3	Taquiquinina-4
Protaquicinina-1	Adropina	Fosfoproteína secretada 1	Metaloproteinasa-23 de matriz

ES 2 731 626 T3

Proteína 1 secretada relacionada con Frizzled, isoforma CRA_a	Proteína transmembrana con repeticiones ricas en leucina FLRT1	Proteína de tipo serina beta-lactamasa LACTB, mitocondrial	Proteína 5 relacionada con el factor de necrosis tumoral de complemento C1q
Proteína B relacionada con el plasminógeno	Nucleobindina-2	Galectina-3	Opticina
Posible palmitoiltransferasa ZDHHC16	Fosfolipasa A2	Prohormona pancreática	Glicoproteína pre-secretada/pequeña
Proteína 1 relacionada con angiopoyetina	Proencefalina-B	Glicoproteína 6 beta-1 específica del embarazo	Proteína relacionada con pentraxina PTX3
Proteína UPF0510 C19orf63	Proteína I-beta de reconocimiento de peptidoglicano	Proteína 3 relacionada con Dickkopf	Carboxilesterasa 8
Proteína tipo 1 rica en cisteína de receptor eliminador M160	Proteína 2 con repeticiones ricas en leucina que contiene la superfamilia de inmunoglobulinas	Miembro 11 de la familia SDR deshidrogenasa/reductasa	Proteína 4 transmembrana relacionada con la tiorredoxina
Alfa-manosidasa de tipo 2 que potencia la degradación ER	Proteína 2 que contiene el dominio de inmunoglobulinas y V-set	Proteína 3 gamma derivada de la regeneración de islotes	Proteína 2 que contiene el dominio de la superfamilia facilitadora principal
Proteína 2 de tipo beta-galactosidada-1	Péptido YY	Proteína 43 de dedo RING	Caliceína-12
Receptor E de interleucina-17	Proteína 3 de unión a retinol	Semenogelina-2	Proteína del núcleo de brevicano
Interleucina-20	Aterina	Mucina-15	Porimina
Interleucina-25	Homólogo SEC63 de proteína de translocación	Sialoproteína 2 de hueso	Torsina-1A
Proteína 11 que contiene el dominio PDZ	Factor de crecimiento transformante beta-3	Linfotactina	Quimiocina 23 con motivo C-C
Relaxina-3	Proteína Wnt-10b	Proteína alfa regulada por el crecimiento	Testicano-3
Serina carboxipeptidasa inducible por retinoides	Renalasa	R-espondina-2	Proteína 4 salivaria básica rica en prolina
Proteína 2 asociada a carcinoma de paladar corto, pulmón y epitelio nasal	Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 4	Proteína 3 que contiene dominios transmembrana y de bobina enrollada	Miembro 18 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral
Proteína 5 del dominio de núcleo de cuatro disulfuros WAP	Carboxipeptidasa A4	Quimiocina 1 co-regulada VEGF	Hermano de CDO
Factor C de crecimiento derivado de plaquetas	Olfactomedina-4	ADM2	Beta-1,4-galactosiltransferasa 4
Proteína 33 que contiene dominios de desintegrina y metaloproteinasas	Cadena lábil ácida del complejo de proteínas de unión al factor de crecimiento de tipo insulina	Proteína hidroxisteroide 11-beta-deshidrogenasa de tipo 1	Miembro 9 de la familia SDR deshidrogenasa/reductasa
Proteína 1 que contiene el dominio BSD	Amelogenina, isoforma Y	Proteína 1 tipo delta	Epina
Molécula 3 de adhesión celular	Ariulfatasa F	Efrina-A1	Otoancorina
Proteína relacionada con CDC45	Variante 2 beta de subunidad de coriagonadotropina	Receptor de factor de crecimiento de fibroblastos de tipo 1	Tenascina-R
Condrolectina	Beta-defensina 104	Receptor de la familia GDNF alfa-3	Factor de crecimiento
Diacilglicerol O-actansferasa 2	Beta-defensina 105	Receptor plaquetario Gi24	Proteína TSPEAR

ES 2 731 626 T3

3-ceto-esteroide reductasa	Beta-defensina 107	Progonadoliberina-2	Hefaestina
Receptor C de interleucina-17	Proteína WFDC11	Caliceína-7	Proteína 3 de tipo butirofilina
Receptor D de interleucina-17	Proteína 6 del dominio de núcleo de cuatro disulfuros WAP	Apolipoproteína F	Proteína 9 de tipo butirofilina
Subunidad 1 de complejo integrador	Epígeno	Proteína CASC4	Subunidad gamma-2 de laminina
Molécula de tipo adhesión de unión	Proteína FAM19A5	Proteína de tipo VIP36	Proteína LMBR1L
E3 ubiquitina-proteína ligasa LNX	Claudina-6	Proteína 1 transportadora de magnesio	Mucina-21
Proteína 3 neuronal transmembrana con repeticiones ricas en leucina	Molécula 19 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario	Amina oxidasa sensible a amilorida [que contiene cobre]	Manosil-oligosacárido 1,2-alfa-manosidasa de retículo endoplásmico
Subunidad beta de metionina adenosiltransferasa 2	Una desintegrina y metaloproteínasa con motivos trombospondina 1	Proteína 2 de modulador de la autofagia regulada por daño al ADN	Glicoproteína GP2 principal de la membrana granular secretora pancreática
Proteína 2 de tipo podocalixina	Proteína COQ10 A, mitocondrial	Proteína transmembrana C17orf87	Semaforina-4B
Prominina-2	Proteína no caracterizada C19orf41	Proteína 5 relacionada con el factor H del complemento	Semaforina-5B
Proteína 2 que contiene el dominio de plexina	Proteína no caracterizada C21orf63	Proteína 7 de unión a FK506	Épsilon-sarcoglicano
Homólogo 4 de rotonda	Homólogo 2 de proteína delta	Incorporador 1 de serina	Proteína 5 de unión a guanilato
Lactosilceramida alfa-2,3-sialiltransferasa	Proteína de transcrito regulada por cocaína y anfetamina	Proteína 1 que contiene dominios transmembrana y de tipo ubiquitina	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 6
Miembro 2 de la familia transmembrana SID1	Proteína de pareja de fusión HMGIC de lipoma de tipo 1	Similar a proteína ERGIC-53	Serpina B3
Proteína 1 que contiene dominios de sushi	Proteína 18 que contiene repeticiones ricas en leucina	Receptor 10 de tipo Toll	Homólogo B de proteína RMD5
Serina/treonina-proteína cinasa TAO2	Proteína 25 que contiene repeticiones ricas en leucina	Receptor 8 de tipo Toll	Miembro 5 de la clase A de receptor eliminador
Proteasa transmembrana, serina 2	Proteína 3B que contiene repeticiones ricas en leucina	Selenoproteína T	Semaforina-6B
UDP-ácido glucurónico descarboxilasa 1	Proteína 3 que contiene repeticiones ricas en leucina	Lectina 11 de tipo Ig de unión a ácido siálico	Proteína transmembrana 108
Proteína no caracterizada C10orf58	Proteína 4 que contiene el dominio Ly6/PLAUR	Nexina-24 de clasificación	Proteína 3 que contiene el dominio de sushi
Proteína 2 transmembrana relacionada con tiorredoxina	Subunidad 1 del complejo reductasa de epóxido de vitamina K	Proteína 1 relacionada con el factor de necrosis tumoral de complemento C1q	Proteína 2 de unión a factor beta de crecimiento transformante latente
CMP-N-acetilneuraminato-beta-galactosamida-alfa-2,3-sialiltransferasa	Una desintegrina y metaloproteínasa con motivos trombospondina 20	Supuesta proteína no caracterizada UNQ6494/PRO21346	Supuesta proteína no caracterizada UNQ6190/PRO20217

Supuesta proteína no caracterizada ENSP00000380674	Supuesta proteína no caracterizada ENSP00000381830	Variante precursora 1 secretada y transmembrana	Variante precursora 1 secretada y transmembrana
Proteína transmembrana 119	Proteína 1 de la región crítica de síndrome de ojo de gato	Miembro A de la familia 18 de dominios de lectina de tipo C	Cadena de colágeno alfa-1 (XX)
Proteína transmembrana 98	Proteína 101 expresada en testículo	Proteína 3 secretora rica en cisteína	Receptor de netrina UNC5D
Proteína 3 de linfocitos pre-B	Xilosiltransferasa 2	Complemento C4-A	Mucina-13
Supuesta proteína no caracterizada C14orf144	Proteína FAM20A	Supuesta proteína no caracterizada PR02829	Metaloproteasa dependiente de ATP YME1L1
Proteasa 1 del sitio de factor de la transcripción unido a membrana	Proteína 1 que contiene dominios transmembrana e inmunoglobulina	Regulador 2 del canal de cloruro activado por calcio	Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 5
Ficolina (que contiene el dominio colágeno/fibrinógeno) 3 (antígeno Hakata) (NL3) (ficolina (que contiene el dominio colágeno/fibrinógeno) 3 (antígeno Hakata), isoforma CRA_b)	Supuesta proteína de tipo receptor de tipo inmunoglobulina de células citolíticas KIR3DX1 (miembro 12 del grupo de receptores de leucocitos)	Neuroblastoma supresor de tumorigenicidad 1	

5 Las proteínas terapéuticas proporcionadas en el presente documento no deben considerarse exclusivas. Más bien, puesto que es evidente a partir de la divulgación proporcionada en el presente documento, los métodos de la invención pueden aplicarse a cualquier proteína en la que la unión de un polímero soluble en agua se desea según la invención. Por ejemplo, se describen proteínas terapéuticas en el documento US 2007/0026485.

Proteínas de la coagulación sanguínea

10 En un aspecto, el material de partida de la presente invención es una proteína de la coagulación sanguínea, que puede derivar de plasma humano, o producirse mediante técnicas de ingeniería genética recombinante, tal como se describe en las patentes: patente estadounidense n.º 4.757.006; patente estadounidense n.º 5.733.873; patente estadounidense n.º 5.198.349; patente estadounidense n.º 5.250.421; patente estadounidense n.º 5.919.766; y EP 306 968.

15 Los polipéptidos terapéuticos tales como proteínas de la coagulación sanguínea que incluyen el factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de Von Willebrand (VWF), factor V (FV), factor X (FX), factor XI (FXI), factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (TF) y proteasa ADAMTS13 se degradan rápidamente mediante enzimas proteolíticas y se neutralizan mediante anticuerpos. Esto reduce su semivida y tiempo de circulación, limitando de ese modo su eficacia terapéutica. Son necesarias dosis relativamente altas y administración frecuente para alcanzar y mantener el efecto terapéutico o profiláctico deseado de estas proteínas de la coagulación. Como consecuencia, es difícil de obtener una regulación de la dosis adecuada y la necesidad de administraciones intravenosas frecuentes impone restricciones sobre el modo de vida del paciente.

25 Tal como se describe en el presente documento, la invención contempla proteínas de la coagulación sanguínea que incluyen, pero no se limitan a, factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de Von Willebrand (VWF), factor V (FV), factor X (FX), factor XI, factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (TF) y proteasa ADAMTS13. Tal como se usa en el presente documento, el término "proteína de la coagulación sanguínea" se refiere a cualquier factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de Von Willebrand (VWF), factor V (FV), factor X (FX), factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (TF) y proteasa ADAMTS13 que presenta actividad biológica que está asociada con esa proteína de la coagulación sanguínea nativa particular.

35 La cascada de la coagulación sanguínea se divide en tres segmentos distintos: las rutas intrínsecas, extrínsecas y comunes (Schenone *et al.*, *Curr Opin Hematol.* 2004;11:272-7). La cascada implica una serie de enzimas de serina proteasa (zimógenos) y cofactores de proteína. Cuando se requiere, un precursor de zimógeno inactivo se convierte en la forma activa, que por consiguiente convierte la siguiente enzima en la cascada.

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

La ruta extrínseca se inicia cuando la luz vascular de los vasos sanguíneos se daña. El factor tisular de glicoproteína de membrana se expone y luego se une al factor de la circulación VII (FVII) y a pequeñas cantidades preexistentes de su forma activada FVIIa. Esta unión facilita la conversión completa de FVII en FVIIa y posteriormente, en presencia de calcio y fosfolípidos, la conversión del factor IX (FIX) en factor IXa (FIXa) y factor X (FX) en factor Xa (FXa). La asociación de FVIIa con factor tisular potencia la actividad proteolítica aproximando los sitios de unión de FVII para el sustrato (FIX y FX) e induciendo un cambio conformacional, que potencia la actividad enzimática de FVIIa.

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

La conversión de FVII en FVIIa también está catalizada por varias proteasas, incluyendo trombina, FIXa, FXa, factor XIa (FXIa), y factor XIIa (FXIIa). Para la inhibición de la fase temprana de la cascada, el inhibidor de la ruta del factor tisular se dirige al complejo de producto de FXa/factor tisular/FVIIa.

Factor VIIa

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

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

La proporción principal de FVII circula en el plasma en forma de zimógeno, y la activación de esta forma da como resultado la escisión del enlace peptídico entre arginina 152 e isoleucina 153. El FVIIa activado resultante consiste en una cadena ligera derivada de NH₂ (20 kD) y una cadena pesada derivada de COOH terminal (30 kD) unidas por medio de un enlace disulfuro sencillo (Cys 135 a Cys 262). La cadena ligera contiene el dominio de Gla de unión a membrana, mientras que la cadena pesada contiene el dominio catalítico.

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

La deficiencia de FVII hereditaria es un trastorno hemorrágico recesivo autosómico poco común con una prevalencia estimada de 1 caso por 500.000 personas en la población general (Acharya *et al.*, *J Thromb Haemost.* 2004;2248-56). La deficiencia de FVII adquirida de inhibidores también es muy poco común. Se han notificado casos en los que la deficiencia se produce en asociación con fármacos tales como cefalosporinas, penicilinas y anticoagulantes orales. Además, se ha notificado que la deficiencia de FVII adquirida se produce de manera espontánea o con otros estados, tales como mieloma, septicemia, anemia aplásica, con terapia de globulinas antitímocitos e interleucina-2.

La referencia a secuencias de polipéptido y polinucleótido incluyen, por ejemplo, los n.^{os} de registro de GenBank J02933 para la secuencia genómica, M13232 para el ADNc (Hagen *et al.* *PNAS* 1986; 83: 2412-6), y P08709 para la secuencia de polipéptido. Se ha descrito una variedad de polimorfismos de FVII, por ejemplo, véase Sabater-Lleal *et al.* (*Hum Genet.* 2006; 118:741-51).

Factor IX

FIX es una proteína plasmática dependiente de vitamina K que participa en la ruta intrínseca de la coagulación sanguínea convirtiendo FX en su forma activa en presencia de iones de calcio, fosfolípidos y FVIIIa. La capacidad catalítica predominante de FIX es como una serina proteasa con especificidad para un enlace arginina-isoleucina particular dentro de FX. La activación de FIX se produce mediante FXIa que provoca la escisión del péptido de activación de FIX para producir una molécula de FIX activada que comprende dos cadenas sostenidas por uno o

más enlaces disulfuro. Los defectos en FIX son la causa de hemofilia B recesiva ligada al cromosoma X.

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

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

Pueden encontrarse secuencias de polipéptido y polinucleótido de FIX, por ejemplo, en el n.º de registro de UniProtKB/Swiss-Prot P00740, patente estadounidense n.º 6.531.298 y en la figura 1 (SEQ ID NO: 1).

Factor VIII

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

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

FVIII también se sintetiza como proteína recombinante para uso terapéutico en trastornos hemorrágicos. Se han elaborado diversos ensayos *in vitro* para determinar la posible eficacia de FVIII recombinante (rFVIII) como medicamento terapéutico. Estos ensayos imitan los efectos *in vivo* de FVIII endógeno. El tratamiento con trombina *in vitro* de FVIII da como resultado un rápido aumento y posterior disminución en su actividad procoagulante, tal como se mide mediante ensayos *in vitro*. Esta activación e inactivación coincide con la proteólisis limitada específica en las cadenas tanto ligera como pesada, lo que altera la disponibilidad de diferentes epítomos de unión en FVIII, por ejemplo, permitiendo que FVIII se disocie de VWF y se unan a una superficie de fosfolípidos o alterando la capacidad de unión a determinados anticuerpos monoclonales.

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

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

Factor de von Willebrand

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

Se sintetiza VWF mediante células endoteliales y megacariocitos como prepro-VWF que consiste, hasta cierto punto, en dominios repetidos. Tras la escisión del péptido señal, pro-VWF se dimeriza a través de enlaces disulfuro en su región C-terminal. Los dímeros actúan como promotores para multimerización, que está regida por enlaces disulfuro entre los extremos terminales libres. El ensamblaje a multímeros se continúa con la eliminación proteolítica

de la secuencia propeptídica (Leyte *et al.*, Biochem. J. 274 (1991), 257-261).

El producto de traducción primario predicho del ADNc clonado de VWF es un polipéptido precursor de 2813 residuos (prepro-VWF). El prepro-VWF consiste en un péptido señal de 22 aminoácidos y un propéptido de 741 aminoácidos, comprendiendo el VWF maduro 2050 aminoácidos (Ruggeri Z.A., y Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993).

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

Las secuencias de aminoácidos y polinucleótido de prepro-VWF están disponibles en los n.^{os} de GenBank NM_000552 y NP_000543, respectivamente.

En la técnica se describen otras proteínas de la coagulación sanguínea según la presente invención, por ejemplo Mann KG, Thromb Haemost, 1999;82:165-74.

A. Polipéptidos

En un aspecto, el material de partida de la presente invención es una proteína o polipéptido. Tal como se describe en el presente documento, el término proteína terapéutica se refiere a cualquier molécula de proteína terapéutica que presenta actividad biológica que está asociada con la proteína terapéutica. En una realización de la invención, la molécula de proteína terapéutica es una proteína de longitud completa.

Las moléculas de proteína terapéutica contempladas incluyen proteínas de longitud completa, precursores de proteínas de longitud completa, subunidades biológicamente activas o fragmentos de proteínas de longitud completa, así como derivados biológicamente activos y variantes de cualquiera de estas formas de proteínas terapéuticas. Por tanto, la proteína terapéutica incluye aquellas que (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos, a lo largo de una región de al menos aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, o más aminoácidos, con respecto a un polipéptido codificado por un ácido nucleico de referencia o una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento; y/o (2) se unen específicamente a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales, generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de referencia tal como se describe en el presente documento, un fragmento inmunogénico del mismo, y/o una variante modificada de manera conservadora del mismo.

Según la presente invención, el término "proteína recombinante terapéutica" incluye cualquier proteína terapéutica obtenida por medio de tecnología de ADN recombinante. En determinadas realizaciones, el término abarca proteínas tal como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, "proteína terapéutica endógena" incluye una proteína terapéutica que se origina del mamífero que se prevé que reciba tratamiento. El término también incluye proteína terapéutica transcrita de un transgén o cualquier otro ADN foráneo presente en dicho mamífero. Tal como se usa en el presente documento, "proteína terapéutica exógena" incluye una proteína de la coagulación sanguínea que no se origina del mamífero que se prevé que reciba tratamiento.

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

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

Un "análogo," tal como una "variante" o un "derivado," es un compuesto sustancialmente similar en estructura y que tiene la misma actividad biológica, si bien en determinados caso en distintos grados, que una molécula que se produce de manera natural. Por ejemplo, una variante de polipéptido se refiere a un polipéptido que comparte

estructura sustancialmente similar y que tiene la misma actividad biológica que un polipéptido de referencia. Las variantes o análogos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos en comparación con el polipéptido que se produce de manera natural del que se deriva el análogo, basándose en una o más mutaciones que implican (i) deleción de uno o más residuos de aminoácido en uno o más extremos terminales del polipéptido y/o una o más regiones internas de la secuencia de polipéptido que se produce de manera natural (por ejemplo, fragmentos), (ii) inserción o adición de uno o más aminoácidos en uno o más extremos terminales (normalmente una "adición" o "fusión") del polipéptido y/o una o más regiones internas (normalmente una "inserción") de la secuencia de polipéptido que se produce de manera natural o (iii) sustitución de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos en la secuencia de polipéptido que se produce de manera natural. A modo de ejemplo, un "derivado" es un tipo de análogo y se refiere a un polipéptido que comparte la misma o una estructura sustancialmente similar que un polipéptido de referencia que se ha modificado, por ejemplo, químicamente.

Un polipéptido variante es un tipo de polipéptido análogo e incluye variantes de inserción, en donde uno o más residuos de aminoácido se añaden a una secuencia de aminoácidos de proteína terapéutica de la invención. Las inserciones pueden ubicarse en o bien uno o bien ambos de los extremos terminales de la proteína, y/o pueden situarse dentro de regiones internas de la secuencia de aminoácidos de proteína terapéutica. Las variantes de inserción, con residuos adicionales en o bien uno o bien ambos extremos terminales, incluyen por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen etiquetas de aminoácido u otros marcadores de aminoácido. En un aspecto, la molécula de proteína de la coagulación sanguínea contiene opcionalmente un Met N-terminal, especialmente cuando la molécula se expresa de manera recombinante en una célula bacteriana tal como *E. coli*.

En variantes de deleción, se eliminan uno o más residuos de aminoácido en un polipéptido de proteína terapéutica tal como se describe en el presente documento. Pueden efectuarse deleciones en uno o ambos extremos terminales del polipéptido de proteína terapéutica, y/o con eliminación de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos de proteína terapéutica. Las variantes de deleción, por tanto, incluyen fragmentos de una secuencia de polipéptido de proteína terapéutica.

En variantes de sustitución, uno o más residuos de aminoácido de un polipéptido de proteína terapéutica se eliminan y se reemplazan con residuos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son de naturaleza conservadora y las sustituciones conservadoras de este tipo se conocen bien en la técnica. Alternativamente, la invención abarca sustituciones que tampoco son conservadoras. Sustituciones conservadoras a modo de ejemplo se describen en Lehninger, [Biochemistry, 2ª edición; Worth Publishers, Inc., Nueva York (1975), págs. 71-77] y se exponen inmediatamente a continuación.

35 Sustituciones conservadoras

CARACTERISTICA DE LA CADENA LATERAL	AMINOÁCIDO
No polar (hidrófoba):	
A. Alifática	A L I V P
B. Aromática	F W
C. Que contiene azufre	M
D. Límite	G
No cargada-polar	
A. Hidroxilo	S T Y
B. Amidas	N Q
C. Sulfhidrilo	C
D. Límite	G
Cargada positivamente (básica)	K R H
Cargada negativamente (ácida)	D E

Alternativamente, se exponen inmediatamente a continuación sustituciones conservadoras a modo de ejemplo.

40 Sustituciones conservadoras II

RESIDUO ORIGINAL	SUSTITUCIÓN A MODO DE EJEMPLO
Ala (a)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn

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

B. Polinucleótidos

5 Los ácidos nucleicos que codifican para una proteína terapéutica de la invención incluyen, por ejemplo y sin limitación, genes, pre-ARNm, ARNm, ADNc, variantes polimórficas, alelos, mutantes sintéticos y que se producen de manera natural.

10 Los polinucleótidos que codifican para una proteína terapéutica de la invención también incluyen, sin limitación, aquellos que (1) se hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos de referencia tal como se describe en el presente documento, y variantes modificadas de manera conservadora de los mismos; (2) tienen una secuencia de ácido nucleico que tiene más de aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, o más de identidad de secuencia de nucleótidos, a lo largo de una región de al menos aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 500, aproximadamente 1000, o más nucleótidos (hasta la secuencia de longitud completa de 1218 nucleótidos de la proteína madura), en comparación con una secuencia de referencia de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento. Las condiciones de "hibridación rigurosas" a modo de ejemplo incluyen hibridación a 42°C en formamida al 50%, 5X SSC, Na•PO₄ 20 mM, pH 6,8; y lavando en 1X SSC a 55°C durante 30 minutos. Se entiende que la variación en estas condiciones a modo de ejemplo puede realizarse basándose en la longitud y contenido de nucleótidos GC de las secuencias que van a hibridarse. Las fórmulas convencionales en la técnica son apropiadas para determinar condiciones de hibridación apropiadas. Véase Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (segunda ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) §§ 9.47-9.51.

25 Una secuencia de polipéptido o polinucleótido "que se produce de manera natural" deriva normalmente de un mamífero que incluye, pero no se limita a, primate, por ejemplo, humano; roedor, por ejemplo, rata, ratón, hámster; vaca, cerdo, caballo, oveja o cualquier mamífero. Los ácidos nucleicos y proteínas de la invención pueden ser moléculas recombinantes (por ejemplo, heterólogas y que codifican para la secuencia de tipo natural o una variante de la misma, o que no se producen de manera natural).

C. Producción de proteínas terapéuticas

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

40 En otros aspectos, la proteína terapéutica se produce mediante expresión en un sistema de huésped procariota o eucariota adecuado caracterizado por producir una molécula de proteína de la coagulación sanguínea

farmacológicamente aceptable. Ejemplos de células eucariotas son células de mamífero, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2.

Se usa una amplia variedad de vectores para la preparación de la proteína terapéutica y se seleccionan de vectores de expresión eucariotas y procariotas. Los ejemplos de vectores para expresión procariota incluyen plásmidos tales como, y sin limitación, pRSET, pET y pBAD, en donde los promotores usados en vectores de expresión procariota incluyen uno o más de, y sin limitación, lac, trc, trp, recA o araBAD. Los ejemplos de vectores para expresión eucariota incluyen: (i) para expresión en levadura, vectores tales como, y sin limitación, pAO, pPIC, pYES o pMET, usando promotores tales como, y sin limitación, AOX1, GAP, GAL1 o AUG1; (ii) para expresión en células de insecto, vectores tales como y sin limitación, pMT, pAc5, pIB, pMIB o pBAC, usando promotores tales como y sin limitación PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64 o polh, y (iii) para expresión en células de mamífero, vectores tales como y sin limitación pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3 o pBPV, y vectores derivados, en un aspecto, sistemas virales tales como y sin limitación virus vaccinia, virus adenoasociados, virus del herpes o retrovirus, usando promotores tales como y sin limitación CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y β -actina.

D. Administración

En una realización, una proteína terapéutica conjugada de la presente invención puede administrarse mediante inyección, tal como inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.

Para administrar composiciones que comprenden una proteína terapéutica conjugada de la presente invención a humanos o animales de prueba, en un aspecto, las composiciones comprenden uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Los términos "farmacéuticamente" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas tal como agregación y productos de escisión, y además no producen reacciones alérgicas u otras adversas cuando se administran usando vías bien conocidas en la técnica, tal como se describe a continuación. Los "portadores farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquiera y todos los disolventes útiles clínicamente, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares, incluyendo los agentes divulgados a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" incluye una dosis adecuada para tratar una enfermedad o trastorno o mejorar un síntoma de una enfermedad o trastorno. En una realización, "cantidad eficaz" incluye una dosis adecuada para tratar un mamífero que tiene un trastorno hemorrágico tal como se describe en el presente documento.

Las composiciones pueden administrarse por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, mediante pulverización por inhalación, por vía vaginal, rectal o por inyección intracraneal. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intracisternal o técnicas de infusión. También se contempla la administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar o implantación quirúrgica en un sitio particular. En general, las composiciones están esencialmente libres de pirógenos, así como otras impurezas que podrían ser perjudiciales para el receptor.

Pueden llevarse a cabo administraciones individuales o múltiples de las composiciones seleccionando el médico tratante el patrón y niveles de dosis. Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, tal como se describió anteriormente, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, ya se administre el fármaco con fines de prevención o terapéuticos, el tratamiento previo, la historia clínica del paciente y respuesta al fármaco, y el juicio del médico responsable.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína terapéutica conjugada tal como se define en el presente documento. La composición farmacéutica puede comprender además un portador, diluyente, sal, tampón o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede usarse para tratar los trastornos hemorrágicos mencionados anteriormente. La composición farmacéutica de la invención puede ser una disolución o un producto liofilizado. Las disoluciones de la composición farmacéutica pueden someterse a cualquier proceso de liofilización adecuado.

Como a aspecto adicional, la invención incluye kits que comprenden una composición de la invención acondicionada de manera que facilita su uso para la administración a sujetos. En una realización, un kit de este tipo incluye un compuesto o composición descrita en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende una proteína terapéutica conjugada), acondicionada en un envase tal como un recipiente o frasco sellado, con una etiqueta fijada al envase o incluida en el acondicionamiento que describe el uso del compuesto o composición en la práctica del método. En una realización, el kit contiene un primer envase que tiene una composición que comprende una proteína terapéutica conjugada y un segundo envase que tiene una disolución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición en el primer envase. En un aspecto, el compuesto o composición se acondiciona en una forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir además un dispositivo adecuado para administrar la composición según una vía de administración específica. Preferiblemente, el kit contiene una etiqueta que describe

el uso de la composición peptídica o proteína terapéutica.

Polímeros solubles en agua

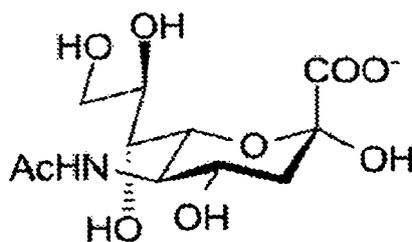
5 En un aspecto, una molécula de derivado de proteína terapéutica (es decir, una proteína terapéutica conjugada) proporcionada se une a un polímero soluble en agua que incluye, pero no se limita a, polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, ácido polisialico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, dextrano, carboximetil-dextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG) polioxazolina, poli acrililmorfolina, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico, poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal) (PHF). En una realización de la invención, el polímero soluble en agua consiste en una molécula de ácido siálico que tiene un intervalo de peso molecular de 350 a 120.000, de 500 a 100.000, de 1000 a 80.000, de 1500 a 60.000, de 2.000 a 45.000 Da, de 3.000 a 35.000 Da y de 5.000 a 25.000 Da. El acoplamiento del polímero soluble en agua puede llevarse a cabo mediante acoplamiento directo a la proteína o por medio de moléculas ligadoras. Un ejemplo de un ligador químico es MBPH (hidrazida de ácido 4-[4-N-maleimidofenil]butírico) que contiene una hidrazida selectiva de hidrato de carbono y un grupo maleimida reactivo a sulfhidrilo (Chamow *et al.*, J Biol Chem 1992;267:15916-22). A continuación se describen otros ligadores preferidos y a modo de ejemplo.

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

A. Ácido siálico y PSA

35 Los PSA consisten en polímeros (generalmente homopolímeros) de ácido N-acetilneuramínico. El grupo amino secundario normalmente porta un grupo acetilo, pero puede portar en su lugar un grupo glicolilo. Los posibles sustituyentes de los grupos hidroxilo incluyen grupos acetilo, lactilo, etilo, sulfato y fosfato.

40



Ácido N-acetilneuramínico
Neu5Ac

45 Estructura de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico)

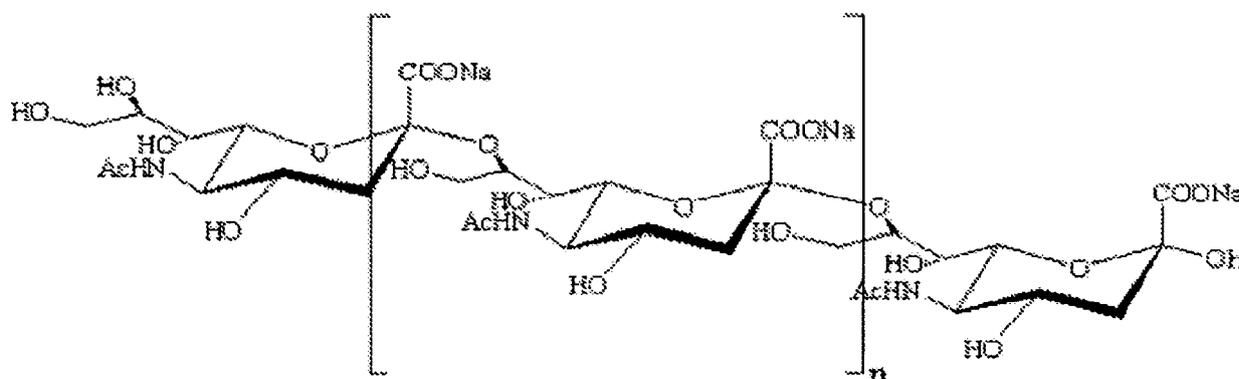
Los PSA y mPSA comprenden generalmente polímeros lineales que consisten esencialmente en restos de ácido N-acetilneuramínico unidos por enlaces 2,8- o 2,9-glicosídicos o combinaciones de estas (por ejemplo, alternando enlaces 2,8- y 2,9-). En PSA y mPSA particularmente preferidos, los enlaces glicosídicos son α -2,8. Tales PSA y mPSA derivan convenientemente de ácidos colomínicos, y se denominan en el presente documento "CA" y "mCA". Los PSA y mPSA típicos comprenden al menos 2, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10 y lo más preferiblemente al menos 20 restos de ácido N-acetilneuramínico. Por tanto, pueden comprender desde 2 hasta 300 restos de ácido N-acetilneuramínico, preferiblemente desde 5 hasta 200 restos de ácido N-acetilneuramínico, o lo más preferiblemente desde 10 hasta 100 restos de ácido N-acetilneuramínico. Los PSA y CA están preferiblemente libres esencialmente de restos de azúcar distintos de ácido N-acetilneuramínico. Por tanto, PSA y CA comprenden preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% y lo más preferiblemente al menos el 98% de restos de ácido N-acetilneuramínico.

55

5 Cuando los PSA y CA comprenden restos distintos de ácido N-acetilneuramínico (como, por ejemplo en mPSA y mCA) estos se sitúan preferiblemente en uno o ambos de los extremos de la cadena de polímero. Estos "otros" restos pueden, por ejemplo, ser restos derivados de restos de ácido N-acetilneuramínico terminal mediante oxidación o reducción.

10 Por ejemplo, el documento WO-A-0187922 describe tales mPSA y mCA en los que la unidad de ácido N-acetilneuramínico terminal no reductora se convierte en un grupo aldehído mediante reacción con peryodato de sodio. Además, el documento WO 2005/016974 describe tales mPSA y mCA en los que la unidad de N-acetilneuramínico terminal reductora se somete a reducción para abrir de manera reductora el anillo en la unidad de ácido N-acetilneuramínico terminal reductora, mediante lo cual se forma un grupo diol vecinal, seguido por oxidación para convertir el grupo diol vecinal en un grupo aldehído.

15 Las glicoproteínas ricas en ácido siálico se unen a la selectina en humanos y otros organismos. Desempeñan un papel importante en las infecciones de gripe humana. Por ejemplo, el ácido siálico puede ocultar los antígenos de la manosa en la superficie de células huésped o bacterias de la lectina de unión a manosa. Esto evita la activación del complemento. Los ácidos siálicos también ocultan el penúltimo residuo de galactosa, lo que evita el rápido aclaramiento de la glicoproteína por el receptor de galactosa en las células del parénquima hepático.



20 Estructura de ácido colomínico (homopolímero de ácido N-acetilneuramínico)

25 Los ácidos colomínicos (una subclase de PSA) son homopolímeros de ácido N-acetilneuramínico (NANA) con enlace α (2 \rightarrow 8) cetosídico, y se producen, entre otros, por cepas particulares de *Escherichia coli* que presentan el antígeno K1. Los ácidos colomínicos tienen muchas funciones fisiológicas. Son importantes como materia prima para fármacos y cosméticos.

30 Los estudios comparativos *in vivo* con asparaginasa polisialilada y no modificada revelaron que la polisialilación aumentó la semivida de la enzima (Fernandes y Gregoriadis, *Biochimica Biophysica Acta* 1341: 26-34, 1997).

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

40 En una realización de la invención, la porción de ácido siálico del compuesto de polisacárido es altamente hidrófila, y en otra realización, todo el compuesto es altamente hidrófilo. La hidrofiliidad se confiere principalmente mediante los grupos carboxilo colgantes de las unidades de ácido siálico, así como los grupos hidroxilo. La unidad de sacárido puede contener otros grupos funcionales, tales como, grupos amina, hidroxilo o sulfato, o combinaciones de los mismos. Estos grupos pueden estar presentes en compuestos de sacárido que se producen de manera natural, o introducirse en compuestos de polisacárido derivados.

45 El PSA de polímero que se produce de manera natural está disponible como una preparación polidispersa que muestra una distribución de tamaño amplia (por ejemplo Sigma C-5762) y alta polidispersidad (PD). Debido a que los polisacáridos se producen habitualmente en bacterias que llevan el riesgo inherente de copurificar endotoxinas, la purificación de cadenas poliméricas de ácido siálico largas puede elevar la probabilidad de contenido de endotoxinas aumentado. Moléculas de PSA cortas con 1-4 unidades de ácido siálico también pueden prepararse de manera sintética (Kang SH *et al.*, *Chem Commun.* 2000;227-8; Ress DK y Linhardt RJ, *Current Organic Synthesis.* 2004;1:31-46), minimizando por tanto el riesgo de altos niveles de endotoxina. Sin embargo, ahora pueden fabricarse preparaciones de PSA con una distribución de tamaño estrecha y baja polidispersidad, que también están

libres de endotoxinas. Compuestos de polisacárido de uso particular para la invención son, en un aspecto, aquellos producidos por bacterias. Algunos de estos polisacáridos que se producen de manera natural se conocen como glicolípidos. En una realización, los compuestos de polisacárido están sustancialmente libres de unidades de galactosa terminal.

5

B. Polietilenglicol (PEG) y pegilación

En determinados aspectos, las proteínas terapéuticas se conjugan con un polímero soluble en agua mediante cualquiera de una variedad de métodos químicos (Roberts JM *et al.*, *Advan Drug Delivery Rev* 2002;54:459-76). Por ejemplo, en una realización una proteína terapéutica se modifica mediante la conjugación de PEG a grupos amino libres de la proteína usando ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS). En otra realización el polímero soluble en agua, por ejemplo PEG, se acopla a grupos SH libres usando química de maleimida o el acoplamiento de PEG hidrazidas o PEG aminas con restos de hidrato de carbono de la proteína terapéutica después de la oxidación previa.

10

La conjugación se realiza en un aspecto mediante acoplamiento directo (o acoplamiento por medio de sistemas de ligador) del polímero soluble en agua con una proteína terapéutica bajo la formación de enlaces estables. Además, se usan sistemas de ligador degradables, liberables o hidrolizables en determinados aspectos la presente invención (Tsubery *et al.* *J Biol Chem* 2004;279:38118-24 / Greenwald *et al.*, *J Med Chem* 1999;42:3657-67 / Zhao *et al.*, *Bioconj Chem* 2006;17:341-51 / WO2006/138572A2 / US7259224B2 / US7060259B2).

15

En una realización de la invención, se modifica una proteína terapéutica por medio de residuos de lisina mediante el uso de derivados de polietilenglicol que contienen un éster de N-hidroxisuccinimida activa (NHS) tal como succinato de succinimidilo, glutarato de succinimidilo o propionato de succinimidilo. Estos derivados reaccionan con los residuos de lisina de la proteína terapéutica en condiciones suaves formando un enlace amida estable. En una realización de la invención, la longitud de cadena del derivado de PEG es de 5.000 Da. Otros derivados de PEG con longitudes de cadena de 500 a 2.000 Da, de 2.000 a 5.000 Da, de más de 5.000 hasta 10.000 Da o de más de 10.000 hasta 20.000 Da, o de más de 20.000 hasta 150.000 Da se usan en diversas realizaciones, incluyendo estructuras lineales y ramificadas.

20

Métodos alternativos para la pegilación de grupos amino son, sin limitación, la conjugación química con carbonatos de PEG formando enlaces uretano, o la reacción con aldehídos o cetonas mediante aminación reductora que forma enlaces amina secundaria.

30

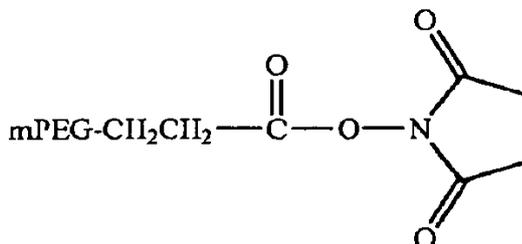
En una realización de la presente invención, una molécula de proteína terapéutica se modifica químicamente usando derivados de PEG que están disponibles comercialmente. Estos derivados de PEG en aspectos alternativos tienen estructuras lineales o ramificadas. Ejemplos de derivados de PEG que contienen grupos NHS se enumeran a continuación.

35

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

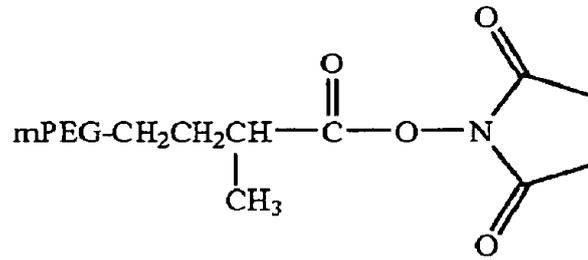
40

propionato de mPEG-succinimidilo (mPEG-SPA)

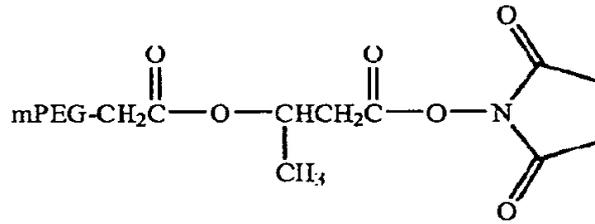


45

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



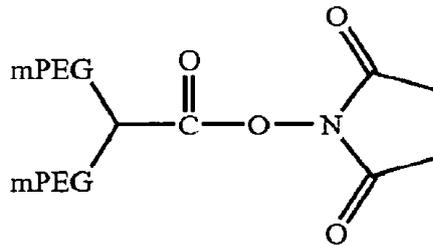
mPEG-CM-NHS (CM=carboximetilo; HBA=ácido hidroxibutírico)



5

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

N-hidroxisuccinimida de PEG ramificado (mPEG2-NHS)



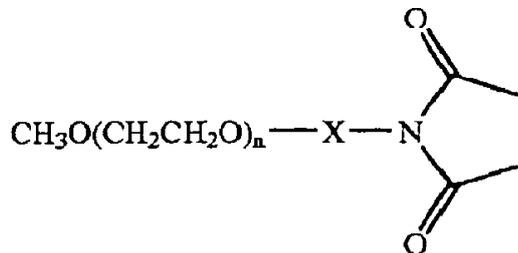
10

Este reactivo con estructura ramificada se describe en más detalle por Kozlowski *et al.* (BioDrugs 2001;5:419-29).

Otros ejemplos no limitativos de derivados de PEG están disponibles comercialmente de NOF Corporation (Tokio, Japón; véase www.nof.co.jp/english: Catalogue 2005).

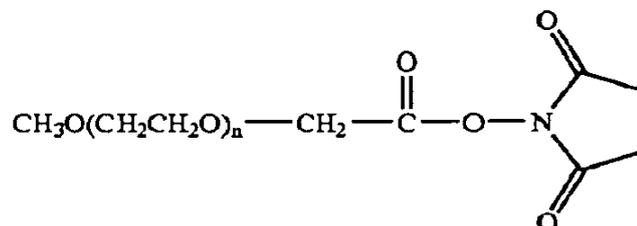
15

Estructura general de derivados lineales de PEG (NOF Corp.):

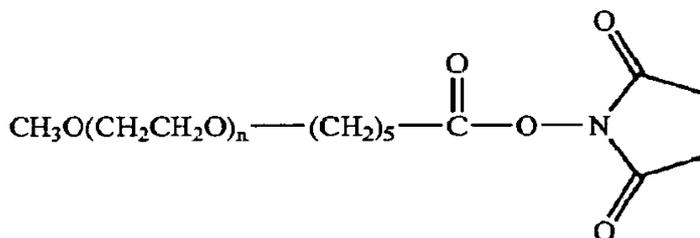


20

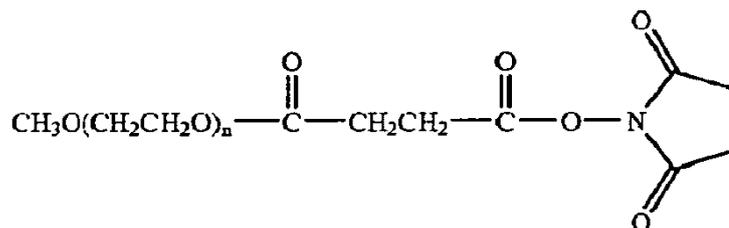
X=carboximetilo



X=carboxipentilo



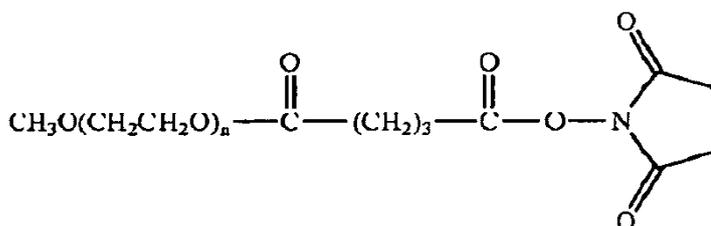
X=succinato



5

succinato de mPEG-succinimidilo

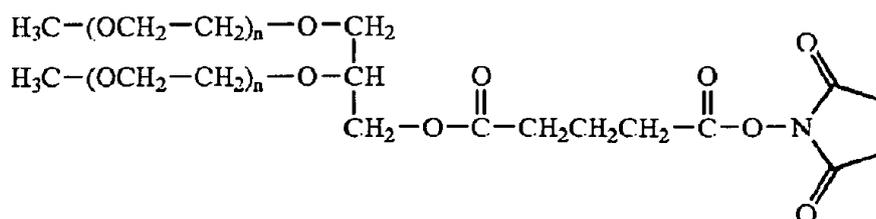
X=glutarato



10

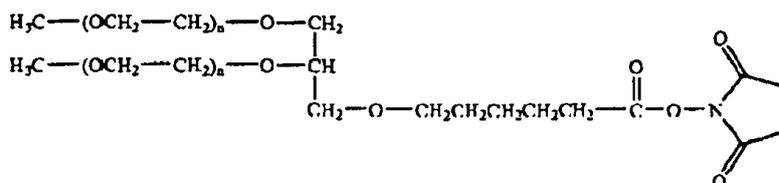
glutarato de mPEG-succinimidilo

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



15

2,3-Bis(metilpolioxi-etileno-oxi)-1-(succinimidil carboxipentiloxi)propano



20

Estos derivados de propano muestran una estructura principal de glicerol con un patrón de sustitución 1,2. En la presente invención, también se contemplan derivados de PEG ramificado basados en estructuras de glicerol con sustitución 1,3 u otras estructuras ramificadas descritas en el documento US2003/0143596A1.

25 También se contemplan derivados de PEG con ligadores degradables (por ejemplo, hidrolizables) tal como describen Tsubery *et al.* (J Biol Chem 2004;279:38118-24) y Shechter *et al.* (documento WO04089280A3).

Sorprendentemente, la proteína terapéutica pegilada de esta invención presenta actividad funcional, en combinación con una semivida prolongada *in vivo*. Además, el rFVIII, FVIIa, FIX pegilado u otro factor de la coagulación sanguínea parece ser más resistente contra la inactivación de trombina.

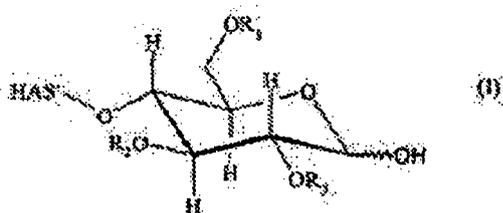
5 C. Almidón de hidroxialquilo (HAS) y almidón de hidroxietilo (HES)

En diversas realizaciones de la presente divulgación, una molécula de proteína terapéutica se modifica químicamente usando almidón de hidroxialquilo (HAS) o almidón de hidroxietilo (HES) o derivados de los mismos.

10 HES es un derivado de amilopectina que se produce de manera natural y se degrada mediante alfa-amilasa en el cuerpo. HES es un derivado sustituido del polímero de hidrato de carbono amilopectina, que está presente en almidón de maíz a una concentración de hasta el 95% en peso. HES presenta propiedades biológicas ventajosas y se usa como agente de reemplazo de volumen sanguíneo y en terapia de hemodilución en la clínica (Sommermeyer *et al.*, 1987, Krankenhauspharmazie, 8 (8), 271-278; y Weidler *et al.*, 1991, Arzneim.-Forschung/Drug Res. g 419 15 494-498).

La amilopectina consiste en restos de glucosa, en los que en la cadena principal están presentes enlaces alfa-1,4-glicosídicos y en los sitios de ramificación se encuentran enlaces alfa-1,6-glicosídicos. Las propiedades fisicoquímicas de esta molécula se determinan principalmente por el tipo de enlaces glicosídicos. Debido al enlace 20 alfa-1,4-glicosídico mellado, se producen estructuras helicoidales con aproximadamente seis monómeros de glucosa por vuelta. Las propiedades fisicoquímicas así como las bioquímicas del polímero pueden modificarse por medio de sustitución. La introducción de un grupo hidroxietilo puede lograrse por medio de hidroxietilación alcalina. Al adaptar las condiciones de reacción es posible explotar la diferente reactividad del respectivo grupo hidroxilo en el monómero de glucosa no sustituido con respecto a una hidroxietilación. Debido a este hecho, el experto es capaz de 25 influir en el patrón de sustitución hasta cierto punto.

HAS se refiere a un derivado de almidón que se ha sustituido en al menos un grupo hidroxialquilo. Por tanto, el término almidón de hidroxialquilo no se limita a compuestos en los que el resto de hidrato de carbono terminal comprende grupos hidroxialquilo R1, R2 y/o R3, sino que también se refiere a compuestos en los que al menos un 30 grupo hidroxilo presente en cualquier parte, o bien en el resto de hidrato de carbono terminal y/o bien en la parte restante de la molécula de almidón, HAS', se sustituye por un grupo hidroxialquilo R1, R2 o R3.



35 El grupo alquilo puede ser un grupo alquilo lineal o ramificado que puede sustituirse de manera adecuada. Preferiblemente, el grupo hidroxiloalquilo contiene de 1 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente desde 1 hasta 6 átomos de carbono, más preferiblemente desde 1 hasta 4 átomos de carbono, e incluso más preferiblemente 2-4 átomos de carbono. Por tanto, "almidón de hidroxialquilo" comprende preferiblemente almidón de hidroxietilo, 40 almidón de hidroxipropilo y almidón de hidroxibutilo, en los que se prefieren particularmente almidón de hidroxietilo y almidón de hidroxipropilo.

Almidón de hidroxialquilo que comprende dos o más grupos hidroxialquilo diferentes también está comprendido en la presente divulgación. El al menos un grupo hidroxialquilo comprendido en HAS puede contener dos o más grupos 45 hidroxilo. Según una realización, el al menos un grupo hidroxialquilo que comprende HAS contiene un grupo hidroxilo.

El término HAS también incluye derivados en los que el grupo alquilo está mono-o polisustituido. En una realización, el grupo alquilo se sustituye con un halógeno, especialmente flúor, o con un grupo arilo, siempre que el HAS permanezca soluble en agua. Además, el grupo hidroxilo terminal de un grupo hidroxialquilo puede esterificarse o 50 esterificarse. Se describen derivados de HAS en el documento WO/2004/024776.

D. Métodos de unión

Una proteína terapéutica puede unirse de manera covalente a los compuestos de polisacárido por cualquiera de las 55 diversas técnicas conocidas por los expertos en la técnica. En diversos aspectos de la invención, se unen restos de ácido siálico a una proteína terapéutica, por ejemplo, FIX, FVIII, FVIIa o VWF, por ejemplo mediante el método descrito en la patente estadounidense n.º 4.356.170.

En la invención también se conocen y se contemplan otras técnicas para acoplar PSA a polipéptidos. Por ejemplo, la

publicación estadounidense n.º 2007/0282096 describe la conjugación de un derivado de hidrazida o amina de, por ejemplo, PSA, a proteínas. Además, la publicación estadounidense n.º 2007/0191597 describe derivados de PSA que contienen un grupo aldehído para reacción con sustratos (por ejemplo, proteínas) en el extremo reductor.

5 Se divulgan diversos métodos en la columna 7, línea 15, a columna 8, línea 5 de la patente estadounidense n.º 5.846.951. Las técnicas a modo de ejemplo incluyen unión a través de un enlace peptídico entre un grupo carboxilo en una de la proteína de la coagulación sanguínea o polisacárido y un grupo amina de la proteína de la coagulación sanguínea o polisacárido, o un enlace éster entre un grupo carboxilo de la proteína de la coagulación sanguínea o polisacárido y un grupo hidroxilo de la proteína terapéutica o polisacárido. Otro enlace por el cual la proteína terapéutica se une de manera covalente al compuesto de polisacárido es por medio de una base de Schiff, entre un grupo amino libre en la proteína de la coagulación sanguínea que reacciona con un grupo aldehído formado en el extremo no reductor del polisacárido mediante oxidación de peryodato (Jennings HJ y Lugowski C, J Immunol. 1981;127:1011-8; Fernandes AI y Gregoriadis G, Biochim Biophys Acta. 1997;1341:26-34). La base de Schiff generada se estabiliza en un aspecto mediante reducción específica con NaCNBH₃ para formar una amina secundaria. Un enfoque alternativo es la generación de grupos amino libres terminales en el PSA mediante aminación reductora con NH₄Cl después de la oxidación previa. Pueden usarse reactivos bifuncionales para unir dos grupos amino o dos grupos hidroxilo. Por ejemplo, se acopla PSA que contiene un grupo amino a grupos amino de la proteína con reactivos como BS3 (Bis(sulfosuccinimidil)suberato / Pierce, Rockford, IL). Además, se usan reactivos de reticulación heterobifuncionales como sulfo-EMCS éster de (N-ε-maleimidocaproyloxi)sulfosuccinimida / Pierce) por ejemplo, para unir grupos amina y tiol.

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

25 Tal como se describió anteriormente, un grupo amina libre de la proteína terapéutica reacciona con el grupo 1-carboxilo del residuo de ácido siálico para formar un enlace peptídico o se forma un enlace éster entre el grupo ácido 1-carboxílico y un grupo hidroxilo u otro grupo activo adecuado en una proteína de la coagulación sanguínea. Alternativamente, un grupo carboxilo forma un enlace peptídico con grupo 5-amino desacetilado, o un grupo aldehído de una molécula de una proteína terapéutica forma una base de Schiff con el grupo 5-amino N-desacetilado de un residuo de ácido siálico.

Alternativamente, el compuesto de polisacárido se asocia de manera no covalente con una proteína terapéutica. Por ejemplo, el compuesto de polisacárido y el compuesto farmacéuticamente activo están, en un aspecto, unidos por medio de interacciones hidrófobas. Otras asociaciones no covalentes incluyen interacciones electrostáticas, con iones de carga opuesta que se atraen entre sí.

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

En diversas realizaciones, la proteína terapéutica se modifica para introducir sitios de glicosilación (es decir, sitios distintos a los sitios nativos de glicosilación). Tal modificación puede lograrse usando técnicas de biología molecular convencionales conocidas en la técnica. Además, la proteína terapéutica, antes de la conjugación con un polímero soluble en agua por medio de uno o más restos de hidrato de carbono, puede glicosilarse *in vivo* o *in vitro*. Estos sitios glicosilados pueden actuar como dianas para la conjugación de las proteínas con polímeros solubles en agua (solicitud de patente estadounidense n.º 20090028822, solicitud de patente estadounidense n.º 2009/0093399, solicitud de patente estadounidense n.º 2009/0081188, solicitud de patente estadounidense n.º 2007/0254836, solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0111279, y DeFrees S. *et al.*, Glycobiology, 2006, 16, 9, 833-43). Por ejemplo, una proteína que no se glicosila de manera natural *in vivo* (por ejemplo, una proteína que no es una glicoproteína) puede modificarse tal como se describió anteriormente.

E. Enlace aminooxilo

55 En una realización de la invención, la reacción de derivados de hidroxilamina o hidroxilamina con aldehídos (por ejemplo, en un resto de hidrato de carbono tras oxidación por peryodato de sodio) para formar un grupo oxima se aplica a la preparación de conjugados de proteína de la coagulación sanguínea. Por ejemplo, una glicoproteína (por ejemplo, una proteína terapéutica según la presente invención) se oxida en primer lugar con un agente oxidante tal como peryodato de sodio (NaIO₄) (Rothfus JA et Smith EL., J Biol Chem 1963, 238, 1402-10; y Van Lenten L y Ashwell G., J Biol Chem 1971, 246, 1889-94). La oxidación de peryodato de glicoproteínas se basa en la reacción de Malaprade clásica descrita en 1928, la oxidación de dioles vecinales con peryodato para formar un grupo aldehído activo (Malaprade L., Analytical application, Bull Soc Chim France, 1928, 43, 683-96). Ejemplos adicionales para un agente oxidante de este tipo son tetraacetato de plomo (Pb(OAc)₄), acetato de manganeso (MnO(Ac)₃), acetato de cobalto (Co(OAc)₂), acetato de talio (TlOAc), sulfato de cerio (Ce(SO₄)₂) (documento US 4.367.309) o perrutenato de potasio (KRuO₄) (Marko *et al.*, J Am Chem Soc 1997,119, 12661-2). Por "agente oxidante", quiere decirse un

compuesto oxidante suave que es capaz de oxidar dioles vecinales en hidratos de carbono, generando de ese modo grupos aldehído activos en condiciones de reacción fisiológicas.

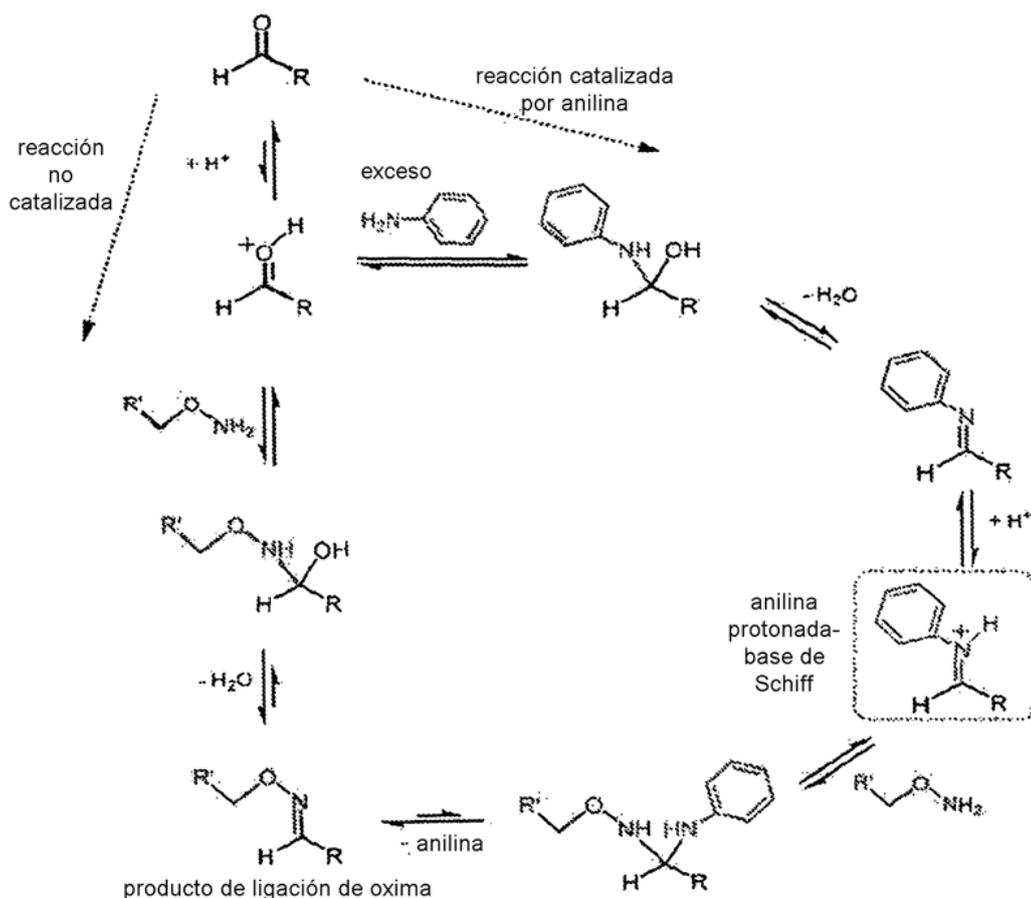
5 La segunda etapa es el acoplamiento del polímero que contiene un grupo aminoóxilo con el resto de hidrato de carbono oxidado para formar un enlace oxima. En una realización de la invención, esta etapa puede llevarse a cabo en presencia de cantidades catalíticas del catalizador nucleofílico anilina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

Puede encontrarse información adicional sobre la tecnología de aminoóxilo en las siguientes referencias: documento EP 1681303A1 (eritropoyetina HASilada); documento WO 2005/014024 (conjugados de un polímero y una proteína unidos por un grupo de unión de oxima); documento WO96/40662 (compuestos ligadores que contienen aminoóxilo y su aplicación en conjugados); documento WO 2008/025856 (proteínas modificadas); Peri F *et al.*, Tetrahedron 1998, 54, 12269-78; Kubler-Kielb J et. Pozsgay V., J Org Chem 2005, 70, 6887-90; Lees A *et al.*, Vaccine 2006, 24(6), 716-29; y Heredia KL *et al.*, Macromolecules 2007, 40(14), 4772-9.
15

En diversas realizaciones de la invención, el polímero soluble en agua que se une según la tecnología de aminoóxilo descrita en el presente documento a un resto de hidrato de carbono oxidado de una proteína terapéutica (por ejemplo, FVIII, FVIIa, o FIX) incluye, pero no se limita a polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, ácido polisiálico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, dextrano, carboximetil-dextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG) polioxazolona, poli acrililmorfolina, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolona, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico, poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal) (PHF).
20
25

Catalizadores nucleofílicos

30 Tal como se describe en el presente documento, la conjugación de polímeros solubles en agua con proteínas terapéuticas puede catalizarse mediante anilina. La anilina cataliza fuertemente reacciones acuosas de aldehídos y cetonas con aminas para formar iminas estables tales como hidrazonas y oximas. El siguiente diagrama compara una reacción de ligación de oxima no catalizada frente a catalizada por anilina (Kohler JJ, ChemBioChem 2009;10:2147-50):
35



Sin embargo, considerando los numerosos riesgos para la salud asociados con anilina, son deseables catalizadores alternativos. La presente invención proporciona el derivado de anilina m-toluidina, un catalizador de oxidación de oxima alternativo.

En la invención, se usa m-toluidina (también conocida como meta-toluidina, m-metilaniлина, 3-metilaniлина, o 3-amino-1-metilbenceno) para catalizar las reacciones de conjugación descritas en el presente documento. La m-toluidina y anilina tienen propiedades físicas similares y esencialmente el mismo valor de pKa (m-toluidina: pKa 4,73, anilina: pKa 4,63).

El catalizador nucleofílico de la invención es útil para la ligación de oximas (por ejemplo, usando enlace aminooxilo) o formación de hidrazona (por ejemplo, usando química de hidrazida). En diversas realizaciones de la invención, el catalizador nucleofílico se proporciona en la reacción de conjugación a una concentración de 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 mM. En una realización, el catalizador nucleofílico se proporciona entre 1 y 10 mM. En diversas realizaciones de la invención, el intervalo de pH de la reacción de conjugación es de 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 y 7,5. En una realización, el pH está entre 5,5 y 6,5.

Purificación de proteínas conjugadas

En diversas realizaciones, se desea la purificación de una proteína que se ha incubado con un agente oxidante y/o una proteína terapéutica que se ha conjugado con un polímero soluble en agua según la presente divulgación. En la técnica se conocen numerosas técnicas de purificación e incluyen, sin limitación, métodos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad o combinaciones de las mismas, métodos de filtración y métodos de precipitación (Guide to Protein Purification, Met. Enzymology vol. 463 (editado por Burgess RR y Deutscher MP), 2ª edición, Academic Press 2009).

Los siguientes ejemplos son a modo de ejemplo de realizaciones específicas de la invención.

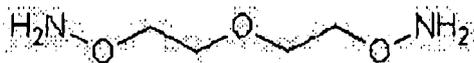
Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación del ligador homobifuncional $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$

El ligador homobifuncional $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$

5



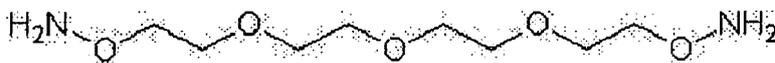
Se sintetizó (3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina) que contiene dos grupos aminoóxilo activos según Boturny *et al.* (Tetrahedron 1997;53:5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas que emplea una síntesis de Gabriel modificada de aminas primarias (figura 3). En la primera etapa, se hace reaccionar una molécula de 2,2-clorodietiléter con dos moléculas de endo-N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida en dimetilformamida (DMF). Se preparó el producto homobifuncional deseado a partir del producto intermedio resultante mediante hidrazinólisis en etanol.

15 Ejemplo 2

Preparación del ligador homobifuncional $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$

El ligador homobifuncional $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$

20



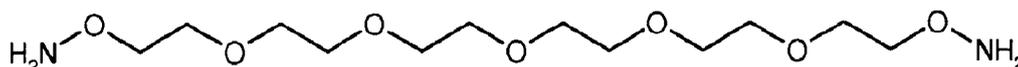
Se sintetizó (3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina) que contiene dos grupos aminoóxilo activos según Boturny *et al.* (Tetrahedron 1997;53:5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas que emplea una síntesis de Gabriel modificada de aminas primarias (figura 3). En la primera etapa, se hace reaccionar una molécula de bis-(2-(2-cloroetoxi)-etil)-éter con dos moléculas de endo-N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida en DMF. Se preparó el producto homobifuncional deseado a partir del producto intermedio resultante mediante hidrazinólisis en etanol.

30 Ejemplo 3

Preparación del ligador homobifuncional $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_6\text{ONH}_2$

El ligador homobifuncional $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_6\text{ONH}_2$

35



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

45 Ejemplo 4

45 Síntesis detallada del reactivo aminoóxi-PSA

Se sintetizó 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina según Boturny *et al.* (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) en una síntesis orgánica de dos etapas tal como se explicó resumidamente en el ejemplo 1.

50 Etapa 1:

A una disolución de endo-N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida (59,0 g; 1,00 eq.) en 700 ml de N,N-dimetilformamida anhidra, se le añadieron K_2CO_3 anhidro (45,51 g; 1,00 eq.) y 2,2-diclorodietiléter (15,84 ml; 0,41 eq.). Se agitó la mezcla de reacción durante 22 h a 50°C. Se evaporó la mezcla hasta sequedad a presión reducida. Se suspendió el residuo en 2 l de diclorometano y se extrajo dos veces con disolución acuosa saturada de NaCl (cada una de 1 l). Se secó la fase de diclorometano sobre Na_2SO_4 y luego se evaporó hasta sequedad a presión reducida y se secó en alto vacío para dar 64,5 g de 3-oxapentano-1,5-dioxi-endo-2',3'-dicarboxidiimidenorboneno como un sólido blanco-amarillo (producto intermedio 1).

60 Etapa 2:

A una disolución de producto intermedio 1 (64,25 g; 1,00 eq.) en 800 ml de etanol anhidro, se le añadieron 31,0 ml de hidrato de hidrazina (4,26 eq.). Luego se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 2 h. Se concentró la mezcla hasta la mitad del volumen de partida evaporando el disolvente a presión reducida. Se separó por filtración el precipitado que se produjo. Se evaporó la fase de etanol restante hasta sequedad a presión reducida. Se secó el residuo que contenía el producto bruto 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina a vacío para proporcionar 46,3 g. Se purificó adicionalmente el producto bruto mediante cromatografía en columna (Silicagel 60; elución isocrática con mezcla de diclorometano/metanol, 9/1) para proporcionar 11,7 g del producto final puro 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina.

Ejemplo 5

Preparación de aminooxi-PSA

Se disolvieron 1000 mg de PSA oxidado (PM = 20 kD) obtenido del Serum Institute of India (Pune, India) en 16 ml de tampón fosfato 50 mM pH 6,0. Luego se proporcionaron 170 mg de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina a la mezcla de reacción. Tras agitar durante 2 h a TA, se añadieron 78,5 mg de cianoborohidruro de sodio y se realizó la reacción durante 18 horas a lo largo de la noche. Luego se sometió la mezcla de reacción a un procedimiento de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) usando una membrana con un punto de corte de 5 kD hecha de celulosa regenerada (50 cm², Millipore).

Ejemplo 6

Preparación de aminooxi-PSA empleando una etapa de purificación cromatográfica

Se disolvieron 1290 mg de PSA oxidado (PM = 20 kD) obtenido del Serum Institute of India (Pune, India) en 25 ml en tampón fosfato 50 mM pH 6,0 (tampón A). Luego se proporcionaron 209 mg de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina a la mezcla de reacción. Tras agitar durante 1 h a TA, se añadieron 101 mg de cianoborohidruro de sodio y se realizó la reacción durante 3 horas. Luego se sometió la mezcla a una etapa de cromatografía de intercambio aniónico débil empleando un gel de cromatografía Fractogel EMD DEAE 650-M (dimensión de columna: XK26/135). Se diluyó la mezcla de reacción con 110 ml de tampón A y se cargó en la columna DEAE preequilibrada con tampón A a una velocidad de flujo de 1 cm/min. Luego se lavó la columna con 20 VC de tampón B (Hepes 20 mM, pH 6,0) para retirar 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina y cianuro libres a una velocidad de flujo de 2 cm/min. Luego se eluyó el reactivo aminooxi-PSA con un gradiente escalonado que consistía en el 67% de tampón B y el 43% de tampón C (Hepes 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5). Se concentró el eluato mediante UF/DF usando una membrana de 5 kD hecha de polietersulfona (50 cm², Millipore). Se realizó la etapa de diafiltración final contra tampón D (Hepes 20 mM, NaCl 90 mM, pH 7,4). Se caracterizó analíticamente la preparación midiendo el PSA total (ensayo de resorcinol) y los grupos aminooxilo totales (ensayo de TNBS) para determinar el grado de modificación. Además se determinó la polidispersidad así como 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina y cianuro libres.

Ejemplo 7

Preparación de aminooxi-PSA sin una etapa de reducción

Se disolvieron 573 mg de PSA oxidado (PM = 20 kD) obtenido del Serum Institute of India (Pune, India) en 11,3 ml de tampón fosfato 50 mM pH 6,0 (tampón A). Luego se proporcionaron 94 mg de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina a la mezcla de reacción. Tras agitar durante 5 h a TA, luego se sometió la mezcla a una etapa de cromatografía de intercambio aniónico débil empleando un gel de cromatografía Fractogel EMD DEAE 650-M (dimensión de columna: XK16/105). Se diluyó la mezcla de reacción con 50 ml de tampón A y se cargó en la columna DEAE preequilibrada con tampón A a una velocidad de flujo de 1 cm/min. Luego se lavó la columna con 20 VC de tampón B (Hepes 20 mM, pH 6,0) para retirar 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina y cianuro libres a una velocidad de flujo de 2 cm/min. Luego se eluyó el reactivo aminooxi-PSA con un gradiente escalonado que consistía en el 67% de tampón B y el 43% de tampón C (Hepes 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5). Se concentró el eluato mediante UF/DF usando una membrana de 5 kD hecha de polietersulfona (50 cm², Millipore). Se realizó la etapa de diafiltración final contra tampón D (Hepes 20 mM, 90 mM NaCl, pH 7,4). Se caracterizó analíticamente la preparación midiendo el PSA total (ensayo de resorcinol) y los grupos aminooxilo totales (ensayo de TNBS) para determinar el grado de modificación. Además se determinó la polidispersidad así como 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina libre.

Ejemplo 8

Preparación de aminooxi-PSA sin una etapa de reducción en presencia del catalizador nucleófilo m-toluidina

Se disuelven 573 mg de PSA oxidado (PM = 20 kD) obtenido del Serum Institute of India (Pune, India) en 9 ml de tampón fosfato 50 mM pH 6,0 (tampón A). Luego se proporcionan 94 mg de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina a esta disolución. Posteriormente se añaden 2,3 ml de una disolución madre de m-toluidina 50 mM a esta mezcla de reacción. Tras agitar durante 2 h a TA, luego se somete la mezcla a una etapa de cromatografía de intercambio aniónico débil empleando un gel de cromatografía Fractogel EMD DEAE 650-M (dimensión de columna: XK16/105). Se diluye la mezcla de reacción con 50 ml de tampón A y se carga en la columna DEAE preequilibrada con tampón

A a una velocidad de flujo de 1 cm/min. Luego se lava la columna con 20 VC de tampón B (Hepes 20 mM, pH 6,0) para retirar 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina y cianuro libres a una velocidad de flujo de 2 cm/min. Luego se eluye el reactivo aminooxi-PSA con un gradiente escalonado que consiste en el 67% de tampón B y el 43% de tampón C (Hepes 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5). Se concentra el eluato mediante UF/DF usando una membrana de 5 kD hecha de polietersulfona (50 cm², Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón D (Hepes 20 mM, NaCl 90 mM, pH 7,4). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo el PSA total (ensayo de resorcinol) y los grupos aminooxilo totales (ensayo de TNBS) para determinar el grado de modificación. Además se determina la polidispersidad así como 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina libre.

10 Ejemplo 9

Preparación de reactivo aminooxi-PSA

15 Se preparó el reactivo aminooxi-PSA según los ejemplos 4-8. Tras la diafiltración, se congeló el producto a -80°C y se liofilizó. Tras la liofilización, se disolvió el reactivo en el volumen apropiado de agua y se usó para la preparación de conjugados de PSA-proteína a través de la modificación de hidratos de carbono.

Ejemplo 10

20 Evaluación de la eficacia de diferentes catalizadores nucleófilos alternativos

25 Se incubó rFIX con peryodato de sodio, reactivo aminooxi-PSA en condiciones normalizadas (1 mg/ml de rFIX en L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,0, exceso molar de reactivo aminooxi-PSA de 5 veces, NaIO₄ 100 μM) usando diferentes catalizadores nucleófilos (anilina, m-toluidina, o-anisidina, m-anisidina, ácido o-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, p-aminobenzamida, ácido sulfanílico / concentración convencional: 10 mM). Se llevó a cabo la reacción durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extinguió durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de disolución acuosa de cisteína con una concentración final de 1 mM.

30 Se determinó la eficiencia de acoplamiento mediante SDS-PAGE usando un sistema X-cell mini de Invitrogen. Se realizaron adiciones conocidas de las muestras con tampón dodecilsulfato de litio (LDS) y se desnaturalizaron durante 10 min a 70°C. Luego se aplicaron las muestras sobre geles de TRIS-acetato al 3-8% y se ejecutó a 150 V durante 60 min. Posteriormente se tñeron los geles con Coomassie.

35 Además, se caracterizaron las muestras mediante el uso de un sistema SEC-HPLC usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77).

40 Se inyectaron sin diluir 50 μl de muestras y se eluyeron de manera isocrática con una disolución filtrada de 0,22 μM de NaH₂PO₄ 20 mM, Na₂SO₄ 50 mM, pH 6,1 a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se registró el patrón de elución a 280 nm.

45 Los resultados se resumen en las figuras 5A-C y 6 (SDS PAGE) y en la tabla 2 (resultados de SEC-HPLC). Se demuestra el efecto catalítico de las diferentes preparaciones. Se muestra que el uso de m-toluidina conduce a resultados equivalentes a los obtenidos con anilina.

Tabla 2

Catalizadores nucleófilos	rFIX di-PSAilado	rFIX mono-PSAilado	rFIX libre
Sin catalizador	4,5%	24,9%	70,6%
Anilina 10 mM	47,7%	33,6%	18,7%
m-Toluidina 10 mM	31,4%	40,8%	27,8%
Ácido o-aminobenzoico 10 mM	30,9%	38,5%	30,6%
Ácido m-aminobenzoico 10 mM	27,6%	38,0%	34,4%
Ácido p-aminobenzoico 10 mM	18,1%	39,3%	42,6%
o-Aminobenzamida 10 mM	15,9%	38,4%	45,7%
Ácido sulfanílico 10 mM	11,8%	35,8%	52,4%

50 Ejemplo 11

Polisialilación de rFIX usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

55 Se disolvieron 12,3 mg de rFIX en 6,1 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂

5 mM). Luego se añadieron 254 μ l de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incubó la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extinguió durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 6,5 μ l de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se sometió posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín 15R de 10 kD para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se mezcló el retenido (8,8 ml), que contenía rFIX oxidado con 2,46 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añadió el reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incubó la mezcla durante 2,5 h a TA a oscuras con agitación suave.

Se retiró el rFIX libre por medio de cromatografía de intercambio aniónico (AEC). Se diluyó la mezcla de reacción con 15 ml de tampón A (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5) y se cargó en una columna HiPrep QFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluyó la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5). El rFIX libre eluye a una conductividad de entre 12-25 mS/cm y el conjugado de entre 27-45 mS/cm. Se elevó posteriormente la conductividad de las fracciones que contenían conjugado hasta 190 mS/cm con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9) y se carga en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9). Se enjuagó reactivo aminooxi-PSA libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente se eluye el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4). Se concentraron las fracciones que contenían conjugado mediante UF/DF usando un filtrador centrífugo Vivaspín 15R de 10 kD. Se realizó la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 7,2 que contiene NaCl 150 mM y CaCl₂ 5 mM. Se caracterizó analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad cromogénica de FIX. Se determina el conjugado de PSA-rFIX que mostró una actividad específica de >50% en comparación con rFIX nativo.

Método 2

Se disuelven 12,3 mg de rFIX en tampón L-histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM) para obtener una concentración final de proteína de 1 mg de rFIX/ml. Se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM para obtener una concentración final de 100 μ M y se incuba la mezcla de reacción durante 1 hora a oscuras a 4°C con agitación suave a pH 6,0 y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína 1 M (u otros reactivos de extinción) para obtener una concentración final de 10 mM. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín 15R de 10 kD para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se mezcla el retenido obtenido (8,8 ml), que contiene rFIX oxidado, con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) para dar una concentración final de 10 mM y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incubó la mezcla a pH 6,0 durante 2,5 horas a temperatura ambiente; de 0,5 horas a 18 horas a +4°C) a oscuras con agitación suave.

Se retira el rFIX libre por medio de cromatografía de intercambio aniónico (AEC). Se diluye la mezcla de reacción con cantidades apropiadas de tampón A (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5) para corregir la conductividad de las disoluciones y el pH antes de cargarlas en una columna HiPrep QFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5). Se eluye rFIX libre mediante un gradiente escalonado usando el 25% de tampón B, lo que da como resultado una conductividad entre 12-25 mS/cm en la fracción y el conjugado obtenidos usando un gradiente escalonado del 50% de tampón B, lo que da como resultado una conductividad de entre 27-45 mS/cm en la fracción de conjugado. Se eleva posteriormente la conductividad de la fracción que contiene conjugado hasta 190 mS/cm con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9 o mediante el uso de sales anticaotrópicas por ejemplo sulfato de amonio, acetato de amonio etc.) y se carga en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT o medio de HIC comparable) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9). Se enjuaga aminooxi-PSA libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4). Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD, Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón L-histidina, pH 7,2 que contiene NaCl 150 mM y CaCl₂ 5 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad de coagulación y cromogénica de FIX. Para el conjugado de PSA-rFIX se determina una actividad específica de >50% en comparación con rFIX nativo.

Método 3:

Se disolvieron 25,4 mg de rFIX en 18,7 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añadieron 531 μ l de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y 5,07 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente, se añadió el reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incubó la mezcla durante 2 h a

oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extinguió durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 25 μ l de disolución acuosa de cisteína 1 M.

5 Se retiró el rFIX libre por medio de cromatografía de intercambio aniónico (AEC). Se diluyó la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,5) y se cargó en una columna HiPrep QFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluyó la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, CaCl_2 5 mM, pH 7,5). El rFIX libre eluyó a una conductividad de entre 12-25 mS/cm y el conjugado de entre 27-45 mS/cm. Se elevó posteriormente la conductividad de las fracciones que contenían conjugado hasta 190 mS/cm con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, CaCl_2 5 mM, pH 6,9) y se cargaron en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, CaCl_2 5 mM, pH 6,9). Se enjuagó reactivo aminooxi-PSA libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente, se eluyó el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,4). Se concentraron las fracciones que contenían conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm^2 , punto de punto de corte de 10 kD, Millipore). Se realizó la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 7,2 que contiene NaCl 150 mM y CaCl_2 5 mM. Se caracterizó analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad cromogénica de FIX. Para el conjugado de PSA-rFIX se determinó una actividad específica de >50% en comparación con rFIX nativo. Se caracterizó analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demostró que la preparación no contenía FIX libre. El conjugado consistió en el 57% de producto monopolisialilado y el 31% de dipolisialilado y el 12% de tripolisialilado.

Método 4:

25 Se disolvieron 25,4 mg de rFIX en tampón L-histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 5 mM) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de rFIX/ml. Posteriormente se añadió una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 μ M, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añadió el reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incubó la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extinguió durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína para dar una concentración final de 10 mM.

35 Se retiró el rFIX libre por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se diluyó la mezcla de reacción con cantidades apropiadas de tampón A (Hepes 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,5) para corregir la conductividad de las disoluciones y el valor de pH antes de cargarlo en una columna HiPrep QFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluyó la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, CaCl_2 5 mM, pH 7,5). Se eluyó rFIX libre mediante un gradiente escalonado usando el 25% de tampón B, lo que dio como resultado una conductividad entre 12-25 mS/cm en la fracción y el conjugado obtenidos usando un gradiente escalonado del 50% de tampón B, lo que da como resultado una conductividad entre 27-45 mS/cm en la fracción de conjugado. Se elevó posteriormente la conductividad de la fracción que contenía conjugado hasta 190 mS/cm con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, CaCl_2 5 mM, pH 6,9; mediante el uso de sales anticaotrópicas por ejemplo acetato de amonio) y se cargó en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT; o medio de HIC comparable) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, CaCl_2 5 mM, pH 6,9). Se enjuagó reactivo aminooxi-PSA libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente se eluyó el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,4). Se concentraron las fracciones que contenían conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm^2 , punto de punto de corte de 10 kD, Millipore). Se realizó la etapa de diafiltración final contra tampón L-histidina, pH 7,2 que contiene NaCl 150 mM y CaCl_2 5 mM. Se caracterizó analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad de coagulación y cromogénica de FIX. Para el conjugado de PSA-rFIX se determinó una actividad específica de >50% en comparación con rFIX nativo. Se caracterizó analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demostró que la preparación no contenía FIX libre. El conjugado consistió en el 57% de producto monopolisialilado y el 31% de dipolisialilado y el 12% de tripolisialilado.

Ejemplo 12

60 Polisialilación de rFVIII usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

65 Se transfirieron 50 mg de rFVIII a tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluyeron para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añadió NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μ M. Se llevó a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con

agitación suave. Luego se extinguió la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA. Se sometió la disolución a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibró con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,0). Se equilibró la columna con 5 VC de tampón A. Luego se eluyó el rFVIII oxidado con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogieron las fracciones que contenían rFVIII. Se determinó el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajustó a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajustó hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de HCl 0,5 M. Luego se añadió un exceso molar de 50 veces de un reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realizó la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de reactivo aminooxi-PSA por medio de HIC. Se elevó la conductividad de la mezcla de reacción hasta 130 mS/cm añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se cargó en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente, se eluyó el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl₂ 5 mM. Finalmente, se recogieron las fracciones que contenían PSA-rFVIII y se sometieron a UF/DF mediante el uso de una membrana de 30 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², Millipore). Se caracterizó analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad cromogénica de FVIII. Se determinó el conjugado de PSA-rFVIII que mostró una actividad específica de >70% en comparación con rFVIII nativo.

20 Método 2:

Se disuelven 58 mg de factor recombinante VIII (rFVIII) derivado del procedimiento ADVATE en tampón Hepes (Hepes 50 mM, ~cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, polisorbato 80 al 0,1%, pH 7,4) en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente el rFVIII oxidado mediante cromatografía de intercambio aniónico en EMD TMAE (M) (Merck). Se diluye la mezcla con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,5) para dar una conductividad de 5 ms/cm. Esta disolución se carga en la columna de IEX (altura de lecho: 5,4 cm) con un volumen de columna de 10 ml usando una velocidad de flujo de 1,5 cm/min. Se lava posteriormente esta columna (velocidad de flujo: 1,5 cm/min) con 5 VC de una mezcla 92:8 (p/p) de tampón A y tampón B (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0). Luego se eluye el rFVIII oxidado con una mezcla 50:50 (p/p) de tampón A y tampón B seguido por una etapa posterior de elución con 5 VC de tampón B. Se llevan a cabo las etapas de elución mediante el uso de una velocidad de flujo de 1,0 cm/min.

Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el rFVIII oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

Se purifica el conjugado de PSA-rFVIII obtenido mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina Phenyl-Sepharose FF low sub (GE Healthcare) empaquetada en una columna fabricada por GE Healthcare con una altura de lecho (h) de 15 cm y un volumen de columna resultante (VC) de 81 ml.

Se realizan adiciones conocidas de la mezcla de reacción con acetato de amonio mediante adición de tampón Hepes 50 mM, que contiene cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 8 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Se mezclan dos volúmenes de la mezcla de reacción con 1 volumen del sistema tampón que contiene acetato de amonio y se corrige el valor de pH hasta pH 6,9 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de NaOH 0,5 N. Se carga esta mezcla en la columna de HIC a una velocidad de flujo de 1 cm/min seguido por una etapa de lavado usando >3 VC de tampón de equilibrado (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9).

Para la retirada de subproductos y sales anticaotrópicas se realiza una segunda etapa de lavado con >5 VC de tampón de lavado 1 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) en modo de flujo ascendente a una velocidad de flujo de 2 cm/min. Luego se realiza la elución de conjugado de PSA-rFVIII purificado en modo de flujo descendente usando un gradiente escalonado del 40% de tampón de lavado 2 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 1,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) y el 60% de tampón de elución (Hepes 20 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 1 cm/min. Se monitoriza la elución del conjugado de PSA-rFVIII a 280 nm de UV y se recoge el eluato que contiene el conjugado en <4 VC. Se realiza etapa posterior de elución con >3 VC de tampón de elución en las mismas condiciones para separar rFVIII secundario y/o no modificado del

producto principal.

Finalmente se concentra el conjugado purificado mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular de 30kD (88 cm², Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad cromogénica de FVIII y determinación del grado de polisialiación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol). Para el conjugado obtenido se calcula una actividad específica >50% y un grado de PSA >5,0.

Método 3:

Se transfirieron 50 mg de rFVIII a tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluyeron para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añadió un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 μM). Se realizó la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extinguió la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración final: 10 mM). Luego se elevó la conductividad de la mezcla de reacción hasta 130 mS/cm añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente, se eluyó el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente, se recogieron las fracciones que contenían el PSA-rFVIII y se sometieron a UF/DF mediante el uso de una membrana de 30 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², Millipore). Se caracterizó analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad cromogénica de FVIII. Para el conjugado de PSA-rFVIII se determinó una actividad específica de ≥70% en comparación con rFVIII nativo.

Método 4:

Se disolvieron 50 mg de factor recombinante VIII (rFVIII) derivado del procedimiento ADVATE en tampón Hepes 50 mM (Hepes 50 mM, cloruro de sodio ~350 mM, cloruro de calcio 5 mM, polisorbato 80 al 0,1%, pH 7,4) en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrigió el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

Posteriormente, se añadió el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de rFVIII dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añadió una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente, se añadió una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 μM.

Se incubó la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave. Luego se detuvo la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purificó el conjugado de PSA-rFVIII obtenido mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina Phenyl-Sepharose FF low sub (GE Healthcare) empaquetada en una columna fabricada por GE Healthcare con una altura de lecho (h) de 15 cm y un volumen de columna resultante (VC) de 81 ml.

Se realizó adición conocida de la mezcla de reacción con acetato de amonio mediante adición de tampón Hepes 50 mM, que contiene cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 8 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Se mezclaron dos volúmenes de la mezcla de reacción con 1 volumen del sistema tampón que contiene acetato de amonio y se corrigió el valor de pH hasta pH 6,9 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de NaOH 0,5 N. Se cargó esta mezcla en la columna de HIC usando una velocidad de flujo de 1 cm/min seguido por una etapa de lavado usando >3CV de tampón de equilibrado (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9).

Para la retirada de subproductos y sales anticaotrópicas se realizó una segunda etapa de lavado con >5 VC de tampón de lavado 1 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) en modo de flujo ascendente a una velocidad de flujo de 2 cm/min. Luego se realizó la elución de conjugado de rFVIII purificado en modo de flujo descendente usando un gradiente escalonado del 40% de tampón de lavado 2 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 1,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) y el 60% de tampón de elución (Hepes 20 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 1 cm/min. Se monitorizó la elución del conjugado de PSA-rFVIII a 280 nm de UV y se recogió el eluato que contenía el conjugado en <4 VC. Se realizó la etapa posterior de elución con >3 VC de tampón de elución en las mismas condiciones para separar rFVIII secundario y/o no modificado del producto

principal.

Finalmente, se concentró el conjugado purificado mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular 30kD (88 cm², Millipore).

5 Se caracterizaron analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad cromogénica de FVIII y determinación del grado de polisialiación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

10 Datos analíticos (media de 6 lotes consecutivos):

Rendimiento del procedimiento (Bradford): 58,9%

Rendimiento del procedimiento (FVIII): 46,4%

15 Actividad específica: (crom. FVIII/mg de proteína): 4148 UI/mg

Actividad específica (% de material de partida): 79,9%

20 Grado de PSA (mol/mol): 8,1

Ejemplo 13

Pegilación de rFVIII usando un reactivo aminooxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

25 Método 1:

Se pegila rFVIII mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelven 14,7 mg de rFVIII en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añaden 296 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin 15R de 10 kD para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se mezcla el retenido (10,9 ml), que contiene rFVIII oxidado, con 2,94 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade el reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incubó la mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-rFVIII mediante cromatografía de intercambio iónico en Q Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de 30 kD (50 cm², Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad cromogénica de FVIII. Se determinó que se espera que el conjugado de PEG-rFVIII demostrará una actividad específica de >70% en comparación con rFVIII nativo.

50 Método 2:

Se pegila rFVIII mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción un peso o una concentración de partida de rFVIII (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente el rFVIII oxidado mediante cromatografía de intercambio aniónico en EMD TMAE (M) (Merck). Se diluye la mezcla con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,5) para dar una conductividad de 5 ms/cm. Se carga esta disolución en la columna de IEX (altura de lecho: 5,4 cm) con un volumen de columna de 10 ml usando una velocidad de flujo de 1,5 cm/min. Se lava posteriormente esta columna (velocidad de flujo:

1,5 cm/min) con 5 VC de una mezcla 92:8 (p/p) de tampón A y tampón B (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0). Luego se eluye el rFVIII oxidado con una mezcla 50:50 (p/p) de tampón A y tampón B seguido por una etapa posterior de elución con 5 VC de tampón B. Se llevan a cabo las etapas de elución mediante el uso de una velocidad de flujo de 1,0 cm/min.

5 Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el rFVIII oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

10 Se purifica el conjugado de PEG-rFVIII obtenido mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina Phenyl-Sepharose FF low sub (GE Healthcare) empaquetada en una columna fabricada por GE Healthcare con una altura de lecho (h) de 15 cm y un volumen de columna resultante (VC) de 81 ml.

15 Se realizan adiciones conocidas de la mezcla de reacción con acetato de amonio mediante adición de tampón Hepes 50 mM, que contiene cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 8 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Se mezclan dos volúmenes de la mezcla de reacción con 1 volumen del sistema tampón que contiene acetato de amonio y se corrige el valor de pH hasta pH 6,9 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de NaOH 0,5 N. Esta mezcla se carga en la columna de HIC usando una velocidad de flujo de 1 cm/min seguido por una etapa de lavado usando >3 VC de tampón de equilibrado (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9).

20 Para la retirada de subproductos y sales antiaotrópicas, se realiza una segunda etapa de lavado con >5 VC de tampón de lavado 1 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) en modo de flujo ascendente a una velocidad de flujo de 2 cm/min. Luego se realiza la elución de conjugado de rFVIII purificado en modo de flujo descendente usando un gradiente escalonado del 40% de tampón de lavado 2 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 1,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) y el 60% de tampón de elución (Hepes 20 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 1cm/min. Se monitoriza la elución del conjugado de PEG-rFVIII a 280 nm de UV y se recoge el eluato que contiene el conjugado en <4 VC. Se realiza la etapa posterior de elución con >3 VC de tampón de elución en las mismas condiciones para separar rFVIII secundario y/o no modificado del producto principal.

25 Finalmente, se concentra el conjugado purificado mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular de 30kD (Millipore).

30 Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

35 Método 3:

40 Se pegila rFVIII mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se mezclan 7,84 mg de rFVIII, disuelto en 6 ml de tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) con 314 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM), y 1,57 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminooxilo para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

45 Finalmente se purifica el conjugado de PEG-rFVIII mediante cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de 30 kD (88 cm², Millipore). La caracterización analítica del conjugado mediante ensayo cromogénico de FVIII y determinación de proteína total (Bradford) muestra una actividad específica de >60% en comparación con el material de partida de rFVIII.

50 Método 4:

55 Se pegila rFVIII mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de rFVIII en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de rFVIII/ml. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de 20 veces. Tras la

corrección del pH hasta 6,0 se incubaba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína para dar una concentración final de 10 mM.

5 Se retira el rFVIII libre por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se diluyó la mezcla de reacción con cantidades apropiadas de tampón A (Hepes 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,5) para corregir la conductividad de las disoluciones y el valor de pH antes de cargarlas en una columna HiPrep QFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluyó la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, CaCl_2 5 mM, pH 7,5). Se eluyó rFVIII libre mediante un gradiente escalonado usando el 25% de tampón B, lo que da como resultado una conductividad entre 12-25 mS/cm en la fracción y el conjugado obtenidos usando un gradiente escalonado del 50% de tampón B, lo que da como resultado una conductividad de entre 27-45 mS/cm en la fracción de conjugado. Se eleva posteriormente la conductividad de la fracción que contiene el conjugado con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, CaCl_2 5 mM, pH 6,9; mediante el uso de sales anticaotrópicas por ejemplo acetato de amonio, sulfato de amonio etc.) y se carga en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT; o medio de HIC comparable) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, CaCl_2 5 mM, pH 6,9). Se enjuagó reactivo PEG libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente, se eluyó el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,4). Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm^2 , punto de punto de corte de 10 kD, Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,5).

20 Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

Ejemplo 14

25 Polisialilación de rFVIIa usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

30 Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso de partida de factor recombinante VIIa (rFVIIa) en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de NaOH 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 50 μM . Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

40 Se purifica adicionalmente el rFVIIa oxidado mediante cromatografía de intercambio aniónico en EMD TMAE (M) (Merck). Se diluye la mezcla con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, pH 6,5) para dar una conductividad de 5 ms/cm. Se carga esta disolución en la columna de IEX (altura de lecho: 5,4 cm) con un volumen de columna de 10 ml usando una velocidad de flujo de 1,5 cm/min. Se lava posteriormente esta columna (velocidad de flujo: 1,5 cm/min) con 5 VC de una mezcla 92:8 (p/p) de tampón A y tampón B (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0). Luego se eluye el rFVIIa oxidado con una mezcla 50:50 (p/p) de tampón A y tampón B seguido por una etapa posterior de elución con 5 VC de tampón B. Se llevan a cabo las etapas de elución mediante el uso de una velocidad de flujo de 1,0 cm/min.

50 Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA- ONH_2) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el rFVIIa oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incubaba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación suave.

55 Se purifica el conjugado de PSA-rFVIIa obtenido mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina Phenyl-Sepharose FF low sub (GE Healthcare) empaquetada en una columna fabricada por GE Healthcare con una altura de lecho (h) de 15 cm y un volumen de columna resultante (VC) de 81 ml.

60 Se realizan adiciones conocidas de la mezcla de reacción con acetato de amonio mediante adición de tampón Hepes 50 mM, que contiene cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 8 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Se mezclan dos volúmenes de la mezcla de reacción con 1 volumen del sistema tampón que contiene acetato de amonio y se corrige el valor de pH hasta pH 6,9 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de NaOH 0,5 N. Esta mezcla se carga en la columna de HIC usando una velocidad de flujo de 1 cm/min seguido por una etapa de lavado usando >3 VC de tampón de equilibrado (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9).

65 Para la retirada de subproductos y sales anticaotrópicas se realiza una segunda etapa de lavado con >5 VC de

5 tampón de lavado 1 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) en modo de flujo ascendente a una velocidad de flujo de 2 cm/min. Luego se realiza la elución de conjugado de rFVIIa purificado en modo de flujo descendente usando un gradiente escalonado del 40% de tampón de lavado 2 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 1,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) y el 60% de tampón de elución (Hepes 20 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 1 cm/min. Se monitoriza la elución del conjugado de PSA-rFVIIa a 280 nm de UV y se recoge el eluato que contiene el conjugado en <4 VC. Se realiza la etapa posterior de elución con >3 VC de tampón de elución en las mismas condiciones para separar rFVIIa secundario y/o no modificado del producto principal.

10 Finalmente, se concentra el conjugado purificado mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (por ejemplo 10 kD MWCO, 88 cm², Millipore).

15 Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica y determinación del grado de polisialiación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Método 2:

20 Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción un peso o una concentración de partida de rFVIIa (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de NaOH 0,5 N.

25 Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de rFVIIa dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 150 μM.

30 Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

35 Se purifica el conjugado de PSA-rFVIIa obtenido mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina Phenyl-Sepharose FF low sub (GE Healthcare) empaquetada en una columna fabricada por GE Healthcare con una altura de lecho (h) de 15 cm y un volumen de columna resultante (VC) de 81 ml.

40 Se realizan adiciones conocidas de la mezcla de reacción con acetato de amonio mediante adición de tampón Hepes 50 mM, que contiene cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 8 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Se mezclan dos volúmenes de la mezcla de reacción con 1 volumen del sistema tampón que contiene acetato de amonio y se corrige el valor de pH hasta pH 6,9 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de NaOH 0,5 N. Esta mezcla se carga en la columna de HIC usando una velocidad de flujo de 1 cm/min seguido por una etapa de lavado usando >3 VC de tampón de equilibrado (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9).

50 Para la retirada de subproductos y sales anticaotrópicas, se realiza una segunda etapa de lavado con >5 VC de tampón de lavado 1 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) en modo de flujo ascendente a una velocidad de flujo de 2 cm/min. Luego se realiza la elución de conjugado de rFVIIa purificado en modo de flujo descendente usando un gradiente escalonado del 40% de tampón de lavado 2 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 1,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) y el 60% de tampón de elución (Hepes 20 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 1 cm/min. Se monitoriza la elución del conjugado de PSA-rFVIIa 280 nm de UV y se recogió el eluato que contenía el conjugado en <4 VC. Se realiza la etapa posterior de elución con >3 VC de tampón de elución en las mismas condiciones para separar rFVIII secundario y/o no modificado del producto principal.

55 Finalmente, se concentra el conjugado purificado mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

60 Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica y determinación del grado de polisialiación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Ejemplo 15

65 Pegilación de rFIX usando un reactivo aminooxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

5 Se pegila rFIX mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción un peso o una concentración de partida de rFIX (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T = +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

15 Se purifica adicionalmente el rFVIII oxidado mediante cromatografía de intercambio aniónico en EMD TMAE (M) (Merck). Se diluye la mezcla con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,5) para dar una conductividad de 5 mS/cm. Se carga esta disolución en la columna de IEX (altura de lecho: 5,4 cm) con un volumen de columna de 10 ml usando una velocidad de flujo de 1,5 cm/min. Se lava posteriormente esta columna (velocidad de flujo: 1,5 cm/min) con 5 VC de una mezcla 92:8 (p/p) de tampón A y tampón B (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0). Luego se eluye el rFIX oxidado con una mezcla 50:50 (p/p) de tampón A y tampón B seguido por una etapa posterior de elución con 5 VC de tampón B. Se llevan a cabo las etapas de elución mediante el uso de una velocidad de flujo de 1,0 cm/min.

25 Posteriormente, se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el rFIX oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

30 Se purifica el conjugado de PEG-rFIX obtenido mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina Phenyl-Sepharose FF low sub (GE Healthcare) empaquetada en una columna fabricada por GE Healthcare con una altura de lecho (h) de 15 cm y un volumen de columna resultante (VC) de 81 ml.

35 Se realizan adiciones conocidas de la mezcla de reacción con acetato de amonio mediante adición de tampón Hepes 50 mM, que contiene cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 8 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Se mezclan dos volúmenes de la mezcla de reacción con 1 volumen del sistema tampón que contiene acetato de amonio y se corrige el valor de pH hasta pH 6,9 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de NaOH 0,5 N. Esta mezcla se carga en la columna de HIC usando una velocidad de flujo de 1 cm/min seguido por una etapa de lavado usando >3 VC de tampón de equilibrado (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9).

45 Para la retirada de subproductos y sales anticaotrópicas se realiza una segunda etapa de lavado con >5 VC de tampón de lavado 1 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) en modo de flujo ascendente a una velocidad de flujo de 2 cm/min. Luego se realiza la elución del conjugado de rFIX purificado en modo de flujo descendente usando un gradiente escalonado del 40% de tampón de lavado 2 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 1,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) y el 60% de tampón de elución (Hepes 20 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 1 cm/min. Se monitoriza la elución del conjugado de PEG-rFIX a 280 nm de UV y se recoge el eluato que contiene el conjugado en <4 VC. Se realiza la etapa posterior de elución con >3 VC de tampón de elución en las mismas condiciones para separar rFIX secundario y/o no modificado del producto principal.

50 Finalmente, se concentra el conjugado purificado mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular de 10 kD (88 cm², Millipore).

55 Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

60 Se pegila rFIX mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de rFIX en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de rFIX/ml. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el

reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína para dar una concentración final de 10 mM.

5 Se retira el rFIX libre por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se diluyó la mezcla de reacción con cantidades apropiadas de tampón A (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5) para corregir las conductividad de las disoluciones y el valor de pH antes de cargarlas en una columna HiPrep QFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluyó la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5). Se eluyó rFIX libre mediante un gradiente escalonado usando el 25% de tampón B, lo que da como resultado una conductividad de entre 12- 25 mS/cm en la fracción y el conjugado obtenidos usando un gradiente escalonado del 50% de tampón B, lo que da como resultado una conductividad de entre 27-45 mS/cm en la fracción de conjugado. Se eleva posteriormente la conductividad de la fracción que contiene el conjugado con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9; mediante el uso de sales anticatólicas por ejemplo acetato de amonio, etc) y se carga en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT; o medio de HIC comparable) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9). Se enjuagó reactivo aminooxi-PEG libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente, se eluyó el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4). Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD, Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).

Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

25 Ejemplo 16

Pegilación de rFVIIa usando un reactivo aminooxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

30 Se pegila rFVIIa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción un peso o una concentración de partida de rFVIIa (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de NaOH 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 50 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

45 Se purifica adicionalmente el rFVIIa oxidado mediante cromatografía de intercambio aniónico en EMD TMAE (M) (Merck). Se diluye la mezcla con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,5) para dar una conductividad de 5 mS/cm. Se carga esta disolución en la columna de IEX (altura de lecho: 5,4 cm) con un volumen de columna de 10 ml usando una velocidad de flujo de 1,5 cm/min. Se lava posteriormente esta columna (velocidad de flujo: 1,5 cm/min) con 5 VC de una mezcla 92:8 (p/p) de tampón A y tampón B (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0). Luego se eluye el rFVIIa oxidado con una mezcla 50:50 (p/p) de tampón A y tampón B seguido por una etapa posterior de elución con 5 VC de tampón B. Se llevan a cabo las etapas de elución mediante el uso de una velocidad de flujo de 1,0 cm/min.

50 Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el rFVIIa oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

55 Se purifica el conjugado de PEG-rFVIIa obtenido mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina Phenyl-Sepharose FF low sub (GE Healthcare) empaquetada en una columna fabricada por GE Healthcare con una altura de lecho (h) de 15 cm y un volumen de columna resultante (VC) de 81 ml.

60 Se realizan adiciones conocidas de la mezcla de reacción con acetato de amonio mediante adición de tampón Hepes 50 mM, que contiene cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio 8 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Se mezclan dos volúmenes de la mezcla de reacción con 1 volumen del sistema tampón que contiene acetato de amonio y se corrige el valor de pH hasta pH 6,9 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de NaOH 0,5 N. Esta mezcla se carga en la columna de HIC usando una velocidad de flujo de 1 cm/min seguido por una etapa de lavado usando >3 VC de tampón de equilibrado (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, acetato de amonio

65

2,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9).

Para la retirada de subproductos y sales anticaotrópicas, se realiza una segunda etapa de lavado con >5 VC de tampón de lavado 1 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) en modo de flujo ascendente a una velocidad de flujo de 2 cm/min. Luego se realiza la elución de conjugado de rFVIIa purificado en modo de flujo descendente usando un gradiente escalonado del 40% de tampón de lavado 2 (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 1,5 M, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9) y el 60% de tampón de elución (Hepes 20 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 1 cm/min. Se monitoriza la elución del conjugado de PEG-rFVIIa 280 nm de UV y se recoge el eluato que contiene el conjugado en <4 VC. Se realiza la etapa posterior de elución con >3 VC de tampón de elución en las mismas condiciones para separar rFVIIa secundario y/o no modificado del producto principal.

Finalmente, se concentra el conjugado purificado mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular de 10 kD (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se pegila rFVIIa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de rFVIIa en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de rFVIIa/ml. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína para dar una concentración final de 10 mM.

Se retira el rFVIIa libre por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se diluyó la mezcla de reacción con cantidades apropiadas de tampón A (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5) para corregir la conductividad de las disoluciones y el valor de pH antes de cargarlas en una columna HiPrep QFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluyó la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5). Se eluyó rFVIIa libre mediante un gradiente escalonado usando el 25% de tampón B, que da como resultado una conductividad de entre 12-25 mS/cm en la fracción y el conjugado obtenidos usando un gradiente escalonado del 50% de tampón B, lo que da como resultado una conductividad de entre 27-45 mS/cm en la fracción de conjugado. Se eleva posteriormente la conductividad de la fracción que contiene el conjugado con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9; mediante el uso de sales anticaotrópicas por ejemplo acetato de amonio) y se carga en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT; o medio de HIC comparable) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9). Se enjuagó reactivo PEG libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente se eluyó el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4). Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD, Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).

Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

Ejemplo 17 (ejemplo de referencia)

Polisialilación de rFIX en presencia de ácido o-aminobenzoico

Método 1:

Se disuelven 8,2 mg rFIX en 4,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añaden 82 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 4 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrífugos Vivaspín 6 de 10 kD para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se mezcla el retenido (6,5 ml), que contienen rFIX oxidado, con 1,64 ml de un ácido o-aminobenzoico acuoso (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminoóxi-PSA con un PM de

20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incubó la mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

La purificación adicional del conjugado se lleva a cabo tal como se describe en el presente documento.

5

Método 2:

Se preparó una disolución de 1 mg de rFIX en 0,65 ml tampón fosfato de sodio, pH 6,0 que contiene un exceso molar de 5 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente). Luego se añadieron 333 μ l de una disolución acuosa de ácido o-aminobenzoico (30 mM) como catalizador nucleófilo para dar una concentración final de 10 mM. Posteriormente se añadieron 20 μ l de una disolución acuosa de NaIO₄ (5 mM) proporcionando una concentración final de 100 μ M. Se realizó el proceso de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente y se extinguió durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 1 μ l de disolución acuosa de cisteína (1 M). La purificación adicional del conjugado se lleva a cabo tal como se describe en el presente documento.

15

Ejemplo 18

Polisialilación de EPO usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

20

Método 1:

Se transfiere una concentración de partida de eritropoyetina (EPO) en un tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO₄ para dar una concentración final de 200 μ M. Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

25

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos o, alternativamente, a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibra con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,0). Se equilibra la columna con 5 VC de tampón A. Se eluye la EPO oxidada con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogen las fracciones que contienen EPO. Se determina el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajusta a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajusta hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de HCl 0,5 M.

30

35

Se añade un exceso molar de 50 veces de un reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxi-PSA por medio de HIC. Se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl₂ 5 mM. Finalmente se recogen las fracciones que contienen PSA-EPO y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (MWCO de 10 kD, 50 cm², Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

40

45

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera.

50

Se disuelven 10 mg de EPO en 5 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añaden 100 μ l de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 50 μ l de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín 15R de 10 kD para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

55

Se mezcla el retenido (aproximadamente 7 ml), que contiene EPO oxidada, con 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a TA a oscuras con agitación suave.

60

Se retira la EPO libre por medio de cromatografía de intercambio aniónico (AEC). Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 7,5) y se carga en una columna HiPrep QFF 16/10 de 20 ml (GE

65

Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,5). Se eluye la EPO libre lavando la columna con tampón B al 25% y el conjugado en tampón B al 50%. Se eleva posteriormente la conductividad de las fracciones que contienen conjugado hasta ~190 mS/cm con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, pH 6,9) y se carga en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, pH 6,9). Se enjuaga reactivo PSA libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, pH 7,4). Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 7,2 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PSA-EPO se determina una actividad específica de >50% en comparación con EPO nativa. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene EPO libre.

Método 2:

Se transfiere o se disuelve EPO en tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T = +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T = +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente la EPO oxidada mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen EPO oxidada del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene la EPO oxidada purificada dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a pH 6,0 a oscuras a una temperatura (T) de T = +22 +/- 2°C con agitación suave (concentración de proteína: 1 mg/ml).

Se purifica adicionalmente el conjugado de PSA-EPO obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PSA-EPO y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica y determinación del grado de polisialiación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Método 3:

Se transfiere eritropoyetina (EPO) a tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de un reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 µM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM). Luego se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente, se eluye el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-EPO y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (MWCO de 10 kD, 88 cm², Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se disuelven 10 mg de EPO en 8 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añaden 200 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo

de 5 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 100 μ l de disolución acuosa de cisteína 1 M.

5 Se retira la EPO libre por medio de cromatografía de intercambio aniónico (AEC). Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 7,5) y se carga en una columna HiPrep QFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,5). Se eluye la EPO libre lavando la columna con tampón B al 25% y el conjugado en tampón B al 50%. Se eleva posteriormente la conductividad de las fracciones que contienen conjugado hasta \sim 190 mS/cm con
10 tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, pH 6,9) y se carga en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, pH 6,9). Se enjuaga reactivo PSA libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, pH 7,4). Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de
15 celulosa regenerada (88 cm^2 , punto de punto de corte de 10 kD, Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 7,2 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PSA-EPO se determina una actividad específica de $>$ 50% en comparación con EPO nativa. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron
20 anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene EPO libre.

Método 4:

25 Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción EPO (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 \pm 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

30 Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de EPO dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 μ M.

35 Se incuba la mezcla de reacción durante 120 \pm 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 \pm 2°C con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 \pm 5 min.

40 Se purifica el conjugado de PSA-EPO obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-EPO del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (MWCO de 10 kD, 88 cm^2 , Millipore).

45 Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Ejemplo 19

Polisialilación de Ang-2 usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

50 Método 1:

Se transfiere una concentración de partida de angiopoyetina-2 (Ang-2) a un tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de
55 proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO₄ para dar una concentración final de 200 μ M. Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

60 A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos, o, alternativamente, se somete a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibra con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,0). Se equilibra la columna con 5 VC de tampón A. Se eluye la Ang-2 oxidada con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogen las fracciones que contienen Ang-2. Se determina el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajusta a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajusta hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de HCl 0,5 M.

65 Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente)

seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de HIC. Se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl_2 5 mM. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-Ang-2 y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere angiopoyetina-2 (Ang-2) en un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μM . Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a T.A.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PSA-Ang-2 del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se transfiere o se disuelve Ang-2 en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 μM . Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente la Ang-2 oxidada mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen Ang-2 oxidada del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene la Ang-2 oxidada purificada dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a pH 6,0 a oscuras a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación suave (concentración de proteína: 1 mg/ml).

Se purifica adicionalmente el conjugado de PSA-Ang-2 mediante cromatografía de intercambio iónico

Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PSA-Ang-2 y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Método 3:

Se transfiere angiopoyetina-2 (Ang-2) en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de un reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO_4 (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM). Luego se ajusta la

conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente, se eluye el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-Ang-2 y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere angiopoyetina-2 (Ang-2) en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de un reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO_4 (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM) y se purifica el conjugado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-Ang-2 del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción Ang-2 (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de Ang-2 dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 μM .

Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el conjugado de PSA-Ang-2 obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-Ang-2 del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

45 Ejemplo 20

Polisialilación de VEGF usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Se transfiere una concentración de partida de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μM . Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos o, alternativamente, a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibra con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,0). Se equilibra la columna con 5 VC de tampón A. Se eluye el VEGF oxidado con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogen las fracciones que contienen VEGF. Se determina el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajusta a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajusta hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de NaOH 0,5 M.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de

acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de HIC. Se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl_2 5 mM. Finalmente se recogen las fracciones que contienen PSA-VEGF y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μM . Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-VEGF del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se transfiere o se disuelve VEGF en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 μM . Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente el VEGF oxidado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen VEGF oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el VEGF oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a pH 6,0 a oscuras a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación suave (concentración de proteína: 1 mg/ml).

Se purifica adicionalmente el conjugado de PSA-VEGF obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PSA-VEGF y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Método 3:

Se transfiere factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de un reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO_4 (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM). Luego se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de

amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-VEGF y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO_4 (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM) y se purifica el conjugado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-VEGF del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción VEGF (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de VEGF dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 μM .

Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el conjugado de VEGF obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-VEGF del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Ejemplo 21

Polisialilación de EGF usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Se transfiere una concentración de partida de factor de crecimiento epidérmico (EGF) en un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μM . Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a T.A.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos o, alternativamente, a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibra con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,0). Se equilibra la columna con 5 VC de tampón A. Se eluye el EGF oxidado con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogen las fracciones que contienen EGF. Se determina el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajusta a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajusta hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de HCl 0,5 M.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de

acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de HIC. Se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl_2 5 mM. Finalmente, se recogen las fracciones que contiene PSA-EGF y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere de crecimiento epidérmico (EGF) en un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μM . Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a T.A.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-EGF del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se transfiere o se disuelve EGF en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 μM . Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente el EGF oxidado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen EGF oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el EGF oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a pH 6,0 a oscuras a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación suave (concentración de proteína: 1 mg/ml).

Se purifica adicionalmente el conjugado de PSA-EGF obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PSA-EGF y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Método 3:

Se transfiere factor de crecimiento epidérmico (EGF) en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de un reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO_4 (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM). Luego se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga

en una columna rellena con Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente se recogen las fracciones que contienen PSA-EGF y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere factor de crecimiento epidérmico (EGF) en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de un reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO_4 (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM) y se purifica el conjugado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción EGF (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

Posteriormente se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de EGF dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 μM .

Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el conjugado de EGF obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-EGF del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Ejemplo 22

Polisialilación de NGF usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Se transfiere una concentración de partida de factor de crecimiento nervioso (NGF) a un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μM . Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos o, alternativamente, a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibra con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,0). Se equilibra la columna con 5 VC de tampón A. Se eluye el NGF oxidado con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogen las fracciones que contienen NGF. Se determina el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajusta a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajusta hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de HCl 0,5 M.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo

aminoxilo por medio de HIC. Se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl₂ 5 mM. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-NGF y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere factor de crecimiento nervioso (NGF) a un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO₄ para dar una concentración final de 200 μM. Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-NGF del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se transfiere o se disuelve NGF en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 μM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente el NGF oxidado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen NGF oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el NGF oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a pH 6,0 a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave (concentración de proteína: 1 mg/ml).

Se purifica adicionalmente el conjugado de PSA-NGF obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PSA-NGF y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Método 3:

Se transfiere factor de crecimiento nervioso (NGF) a tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM). Luego se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena

con Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-NGF y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere factor de crecimiento nervioso (NGF) en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO_4 (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM) y se purifica el conjugado mediante cromatografía de intercambio iónico. Luego se recogen las fracciones que contienen PSA-NGF y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción NGF (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de NGF dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 μM .

Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el conjugado de NGF obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-NGF del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Ejemplo 23

Polisialilación de HGH usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de hormona del crecimiento humana (HGH) se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila HGH *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

Se transfiere una concentración de partida de hormona del crecimiento humana (HGH) a un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μM . Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos o, alternativamente, a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibra con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,0). Se equilibra la columna con 5 VC de tampón A. Se eluye la HGH oxidada con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogen las fracciones que contienen HGH. Se determina el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajusta a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajusta hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de HCl 0,5 M.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de HIC. Se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl₂ 5 mM. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-HGH y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de hormona del crecimiento humana (HGH) se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila HGH *in vitro* según métodos conocidos en la técnica. Se transfiere HGH en un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO₄ para dar una concentración final de 200 µM. Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-HGH del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de hormona del crecimiento humana (HGH) se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila HGH *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

Se transfiere o se disuelve HGH en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente la HGH oxidada mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen HGH oxidada del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene la HGH oxidada purificada dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a pH 6,0 a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave (concentración de proteína: 1 mg/ml).

Se purifica adicionalmente el conjugado de PSA-HGH obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PSA-HGH y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Método 3:

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de hormona del crecimiento humana (HGH) se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila HGH *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

Se transfiere hormona del crecimiento humana (HGH) en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM). Luego se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-HGH y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de hormona del crecimiento humana (HGH) se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila HGH *in vitro* según métodos conocidos en la técnica. Se transfiere HGH en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM) y se purifica el conjugado mediante cromatografía de intercambio iónico. Luego se recogen las fracciones que contienen PSA-HGH del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de hormona del crecimiento humana (HGH) se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila HGH *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción HGH (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de HGH dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 μM.

Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el conjugado de HGH obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-HGH del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Ejemplo 24

Polisialilación de TNF-alfa usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Se transfiere una concentración de partida de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) a un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μM . Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos o, alternativamente, a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibra con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,0). Se equilibra la columna con 5 VC de tampón A. Se eluye el TNF-alfa oxidado con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogen las fracciones que contienen TNF-alfa. Se determina el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajusta a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajusta hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de HCl 0,5 M.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de HIC. Se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl_2 5 mM. Finalmente se recogen las fracciones que contienen PSA-TNF-alfa y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) en un tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μM . Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-TNF-alfa del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se transfiere o se disuelve en tampón de reacción TNF-alfa (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 μM . Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente el TNF-alfa oxidado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen TNF-alfa oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el TNF-alfa oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a pH 6,0 a oscuras a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación suave (concentración de proteína: 1 mg/ml).

Se purifica adicionalmente el conjugado de PSA-TNF-alfa obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PSA-TNF-alfa y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado

(Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Método 3:

Se transfiere factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) a tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM). Luego se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente se recogen las fracciones que contienen PSA-TNF-alfa y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) a tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM) y se purifica el conjugado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-TNF-alfa del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción TNF-alfa (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

Posteriormente se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de TNF-alfa dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 μM.

Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el conjugado de TNF-alfa obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-TNF-alfa del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Ejemplo 25

Polisialilación de insulina usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de insulina se modifica en primer

lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila insulina *in vitro* según métodos conocidos en la técnica. Se transfiere una concentración de insulina de partida a un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO₄ para dar una concentración final de 200 μM. Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos o, alternativamente, a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibra con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,0). Se equilibra la columna con 5 VC de tampón A. Se eluye la insulina oxidada con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogen las fracciones que contienen insulina. Se determina el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajusta a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajusta hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de HCl 0,5 M.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de HIC. Se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl₂ 5 mM. Finalmente se recogen las fracciones que contienen PSA-insulina y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de insulina se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila insulina *in vitro* según métodos conocidos en la técnica. Se transfiere insulina a un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO₄ para dar una concentración final de 200 mM. Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-insulina del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de insulina se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila insulina *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

Se transfiere o se disuelve insulina en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 μM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente la insulina oxidada mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen la insulina oxidada del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene la insulina oxidada purificada dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego

se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción mediante 120 +/- 10 min a pH 6,0 a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave (concentración de proteína: 1 mg/ml).

5 Se purifica adicionalmente el conjugado de insulina-PSA obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PSA-insulina y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

10 Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica, y determinación del grado de polisialización midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Método 3:

15 Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de insulina se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila insulina *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

20 Se transfiere insulina en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 µM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM). Luego se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-insulina y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

35 En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de insulina se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila insulina *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

40 Se transfiere insulina en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 µM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM) y se purifica el conjugado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-insulina del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

50 Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de insulina se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila insulina *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

55 Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción insulina (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

60 Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de insulina dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 µM.

65 Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para

dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el conjugado de insulina obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-insulina del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Ejemplo 26

Polisialilación de interferón-alfa usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Se transfiere una concentración de partida de interferón-alfa a un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μM . Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos o, alternativamente, a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibra con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,0). Se equilibra la columna con 5 VC de tampón A. Se eluye el interferón-alfa oxidado con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogen las fracciones que contienen interferón-alfa. Se determina el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajusta a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajusta hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de HCl 0,5 M.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de HIC. Se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl_2 5 mM. Finalmente se recogen las fracciones que contienen PSA-interferón-alfa y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfieren interferón-alfa a un tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μM . Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-interferón-alfa del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se transfiere o se disuelve interferón-alfa en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 μM . Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una

temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 ± 5 min.

- 5 Se purifica adicionalmente el interferón-alfa oxidado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen interferón-alfa oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

10 Se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el interferón-gamma oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 ± 10 min a pH 6,0 a oscuras a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación suave (concentración de proteína: 1 mg/ml).

15 Se purifica adicionalmente el conjugado de PSA-interferón-alfa obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen el conjugado de PSA-interferón-alfa y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

20 Método 3:

Se transfiere interferón-alfa a un tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de un reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 µM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM). Luego se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-interferón-alfa y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

35 En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere interferón-alfa a un tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 µM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM) y se purifica el conjugado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-interferón-alfa del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

50 Método 4:

Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción interferón-alfa (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de $1,0 \pm 0,25$ mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

55 Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de interferón-alfa dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 µM.

60 Se incuba la mezcla de reacción durante 120 ± 10 min a oscuras a una temperatura (T) de $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 ± 5 min.

65 Se purifica el conjugado de interferón-alfa obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-interferón-alfa del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

5

Ejemplo 27

Polisialilación de interferón-gamma usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Se disuelven 10 mg de interferón-gamma en 5 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añaden 100 μ l de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 50 μ l de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrífugos Vivaspin 15R de 10 kD para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se mezcla el retenido (aproximadamente 7 ml), que contiene interferón-gamma oxidado, con 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a TA a oscuras con agitación suave.

Se retira el interferón-gamma libre por medio de cromatografía de intercambio de cationes (CEC). Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 6,5) y se carga en una columna HiPrep SPFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,5). Se eluye interferón-gamma libre lavando la columna con tampón B al 25% y el conjugado en tampón B al 50%. Se eleva posteriormente la conductividad de las fracciones que contienen conjugado hasta ~190 mS/cm con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, pH 6,9) y se carga en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, pH 6,9). Se enjuaga reactivo PSA libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, pH 6,9). Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de corte de 10 kD, Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 6,9 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PSA-interferón-gamma se determina una actividad específica de > 50% en comparación con interferón-gamma nativo. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene interferón-gamma libre.

Método 2:

Se disuelven 10 mg de interferón-gamma en 8 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añadieron 200 μ l de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 100 μ l de disolución acuosa de cisteína 1 M.

Se retira el interferón-gamma libre por medio de cromatografía de intercambio de cationes (CEC). Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 6,5) y se carga en una columna HiPrep SPFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,5). Se eluye interferón-gamma libre lavando la columna con tampón B al 25% y el conjugado en tampón B al 50%. Se eleva posteriormente la conductividad de las fracciones que contienen conjugado hasta ~190 mS/cm con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, pH 6,9) y se carga en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, pH 6,9). Se enjuaga reactivo PSA libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, pH 6,9). Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 6,9 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PSA-interferón-gamma se determina una actividad específica de >50% en comparación con interferón-gamma nativo. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna

65

Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene interferón-gamma libre.

Método 3:

Se disuelven 10 mg de interferón-gamma en 8 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añaden 200 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo amino-oxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 100 µl de disolución acuosa de cisteína 1 M.

Se retira el interferón-gamma libre por medio de cromatografía de intercambio de cationes (CEC). Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 6,5) y se carga en una columna HiPrep SPFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,5). Se eluye interferón-gamma libre lavando la columna con tampón B al 25% y el conjugado en tampón B al 50%. Se eleva posteriormente la conductividad de las fracciones que contienen conjugado hasta ~190 mS/cm con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, pH 6,9) y se carga en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, pH 6,9). Se enjuaga reactivo PSA libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente se eluye el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, pH 6,9). Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 6,9 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PSA-interferón-gamma se determina una actividad específica de >50% en comparación con interferón-gamma nativo. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene interferón-gamma libre.

Método 4:

Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción interferón-gamma (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

Posteriormente, se añade el reactivo amino-oxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de interferón-gamma dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 µM.

Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el conjugado de interferón-gamma obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-interferón-gamma del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Ejemplo 28

Polisialilación de G-CSF usando amino-oxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Se transfiere una concentración de partida de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaO₄ para dar una concentración final de 200 µM. Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue

la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos o, alternativamente, a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibra con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,0). Se equilibra la columna con 5 VC de tampón A. Se eluye el G-CSF oxidado con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogen las fracciones que contienen G-CSF. Se determina el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajusta a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajusta hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de HCl 0,5 M.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de HIC. Se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl₂ 5 mM. Finalmente se recogen las fracciones que contienen PSA-G-CSF y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en un tampón de reacción (por ejemplo, Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaO₄ para dar una concentración final de 200 μM. Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-G-CSF del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se transfiere o disuelve G-CSF en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 μM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente el G-CSF oxidado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen G-CSF oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el G-CSF oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a pH 6,0 a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave (concentración de proteína: 1 mg/ml).

Se purifica adicionalmente el conjugado de PSA-G-CSF obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PSA-G-CSF y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de

resorcinol).

Método 3:

5 Se transfiere factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 µM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM). Luego se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-G-CSF y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

20 En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 µM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM) y se purifica el conjugado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-G-CSF del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

35 Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción G-CSF (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

40 Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de G-CSF dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 µM.

45 Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

50 Se purifica el conjugado de G-CSF obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-G-CSF del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

55 Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Ejemplo 29

60 Polisialilación de Humira usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

65 Se transfiere una concentración de partida de Humira en un tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO₄ para dar una concentración final de 200 µM. Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína

(concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos o, alternativamente, a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibra con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,0). Se equilibra la columna con 5 VC de tampón A. Se eluye la Humira oxidada con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogen las fracciones que contienen Humira. Se determina el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajusta a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajusta hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de HCl 0,5 M.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de HIC. Se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl₂ 5 mM. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-Humira y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere Humira en un tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO₄ para dar una concentración final de 200 μM. Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-Humira del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se transfiere o disuelve Humira en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 μM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purificó adicionalmente la Humira oxidada mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen Humira oxidada del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contienen Humira oxidada purificada dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a pH 6,0 a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave (concentración de proteína: 1 mg/ml).

Se purifica adicionalmente el conjugado de PSA-Humira obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PSA-Humira y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Método 3:

5 Se transfiere Humira en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO_4 (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM). Luego se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente se recogen las fracciones que contienen PSA-Humira y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

20 En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se transfiere Humira a tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO_4 (concentración final: 400 μM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM) y se purifica el conjugado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-Humira del eluato y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

30 Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción Humira (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

35 Posteriormente, se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de Humira dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 μM .

45 Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el conjugado de Humira obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen PSA-Humira del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

50 Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Ejemplo 30

55 Polisialilación de Prolia usando aminooxi-PSA y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

60 Se transfiere una concentración de partida de Prolia a un tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. A esta disolución, se le añade NaIO_4 para dar una concentración final de 200 μM . Se lleva a cabo la oxidación a TA durante 30 min a oscuras con agitación suave. Luego se extingue la reacción con cisteína (concentración final: 10 mM) durante 60 min a TA.

65 A continuación se somete la disolución a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato

en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos o, alternativamente, a una columna de IEX con un volumen de 20 ml (Merck EMD TMAE (M)) que se equilibra con tampón A (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,0). Se equilibra la columna con 5 VC de tampón A. Se eluye Prolia oxidada con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0). Se recogen las fracciones que contienen Prolia. Se determina el contenido de proteínas (Coomassie, Bradford) y se ajusta a 1 mg/ml con tampón de reacción y se ajusta hasta pH 6,0 mediante adición gota a gota de HCl 0,5 M.

Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final: 10 mM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Se retira el exceso de reactivo aminooxilo por medio de HIC. Se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con 80 ml de Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM pH 7,5 que contiene CaCl₂ 5 mM. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen PSA-Prolia y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se disuelven 10 mg de Prolia en 5 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añaden 100 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 50 ml de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín 15R de 10 kD para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se mezcla el retenido (aproximadamente 7 ml), que contiene Prolia oxidada, con 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a TA a oscuras con agitación suave.

Se retira la Prolia libre por medio de cromatografía de intercambio de cationes (CEC). Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 6,5) y se carga en una columna HiPrep SPFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,5). Se eluye Prolia libre lavando la columna con tampón B al 25% y el conjugado en tampón B al 50%. Se eleva posteriormente la conductividad de las fracciones que contienen conjugado hasta ~190 mS/cm con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, pH 6,9) y se carga en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, pH 6,9). Se enjuaga reactivo PSA libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente, se eluye el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, pH 6,9). Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD, Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 6,9 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PSA-Prolia se determina una actividad específica de >50% en comparación con Prolia nativa. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene Prolia libre.

Método 2:

Se transfiere o se disuelve Prolia en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente la Prolia oxidada mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen Prolia oxidada del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene la Prolia oxidada purificada dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final

de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a pH 6,0 a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave (concentración de proteína: 1 mg/ml).

5 Se purifica adicionalmente el conjugado de Prolia obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de Prolia y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

10 Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica, y determinación del grado de polisialización midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Método 3:

15 Se transfiere Prolia a tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se diluye para obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) seguido por m-toluidina como catalizador nucleófilo (concentración final 10 mM) y NaIO₄ (concentración final: 400 µM). Se realiza la reacción de acoplamiento durante 2 horas a oscuras con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se extingue la reacción con cisteína durante 60 min a TA (concentración de cisteína: 10 mM). Luego se ajusta la conductividad de la mezcla de reacción añadiendo un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8 M, pH 6,9) y se carga en una columna rellena con Phenyl-Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,9. Posteriormente se eluye el conjugado con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 7,5. Finalmente se recogen las fracciones que contienen PSA-Prolia y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore). Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

30 En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se disuelven 10 mg de Prolia en 8 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añaden 200 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminooxi-PSA con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 100 µl de disolución acuosa de cisteína 1 M.

35 Se retira la Prolia libre por medio de cromatografía de intercambio de cationes (CEC). Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 6,5) y se carga en una columna HiPrep SPFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,5). Se eluye Prolia libre lavando la columna con tampón B al 25% y el conjugado en tampón B al 50%. Se eleva posteriormente la conductividad de las fracciones que contienen conjugado hasta ~190 mS/cm con tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, pH 6,9) y se carga en una columna HiPrep Butyl FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, pH 6,9). Se enjuaga reactivo PSA libre en 5 VC de tampón D. Posteriormente se eluye el conjugado con tampón E al 100% (Hepes 50 mM, pH 6,9). Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 6,9 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PSA-Prolia se determina una actividad específica de >50% en comparación con Prolia nativa. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene Prolia libre.

Método 4:

55 Se disuelve en o se transfiere a un tampón de reacción Prolia (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N.

60 Posteriormente se añade el reactivo aminooxi-ácido polisialílico (PSA-ONH₂) en un exceso molar de 50 veces a esta disolución de Prolia dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Finalmente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM para dar una concentración de 400 µM.

65

Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave. Luego se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

5 Se purifica el conjugado de Prolia obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen fracciones que contienen PSA-Prolia del eluato y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada (Millipore).

10 Se caracterizan analíticamente los conjugados preparados mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total, actividad biológica según métodos conocidos en la técnica, y determinación del grado de polisialilación midiendo el contenido de PSA (ensayo de resorcinol).

Ejemplo 31

15 Polisialilación de otras proteínas terapéuticas

Las reacciones de polisialilación realizadas en presencia de catalizadores nucleófilos alternativos similares a m-toluidina u ácido o-aminobenzoico tal como se describe en el presente documento pueden extenderse a otras proteínas terapéuticas. Por ejemplo, en diversos aspectos de la invención, las anteriores reacciones de polisialilación o pegilación tal como se describen en el presente documento con reactivos aminooxi-PSA o aminooxi-PEG se repiten con proteínas terapéuticas tales como las proteínas descritas en el presente documento.

Ejemplo 32

25 Pegilación de EPO usando un reactivo de aminooxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

30 Se pega eritropoyetina (EPO) mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve EPO en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros de centrifugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

35 A continuación se mezcla el retenido que contiene EPO oxidada con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

40 Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-EPO mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo en Q Sepharose FF). Por ejemplo, se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

45 En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pega EPO mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelven 10 mg de EPO en 5 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añaden 100 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 50 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros de centrifugos Vivaspin 15R de 10 kD para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

50 Se mezcla el retenido (aproximadamente 7 ml), que contiene EPO oxidada, con 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a TA a oscuras con agitación suave.

55 Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-EPO mediante cromatografía de intercambio iónico en Q Sepharose FF. Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 7,5) y se carga en una columna HiPrep QFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,5). Se eluye la EPO libre lavando la columna con tampón B al 25% y

el conjugado en tampón B al 50%. Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 7,2 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PEG-EPO se determina una actividad específica de >50% en comparación con EPO nativa. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene EPO libre.

Método 2:

Se pegila EPO mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón).

Se transfiere o se disuelve EPO en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente la EPO oxidada mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones de EPO oxidada del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene la EPO oxidada purificada dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

Se purifica adicionalmente el conjugado de PEG-EPO obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PEG-EPO y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 3:

Se pegila EPO mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve EPO en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM), y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente, se añade el reactivo aminoóxido para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-EPO mediante cromatografía de intercambio iónico en Q Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila EPO mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelven 10 mg de EPO en ~8 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añaden 200 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente, se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 100 µl de disolución acuosa de cisteína 1 M.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-EPO mediante cromatografía de intercambio iónico en Q Sepharose FF. Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 7,5) y se carga en una columna HiPrep QFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,5). Se eluye la EPO libre lavando la columna con tampón B al 25% y el conjugado en tampón B al 50%. Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 7,2 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PEG-EPO se determina una actividad específica de >50% en comparación con EPO nativa. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene EPO libre.

Método 4:

Se pega EPO mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve o se disuelve una concentración o un peso inicial de EPO en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de EPO/ml. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína para dar una concentración final de 10 mM.

Se purifica el conjugado de PEG-EPO por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).

Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

Ejemplo 33

Pegilación de Ang-2 usando un reactivo aminoóxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Se pega Ang-2 mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve Ang-2 en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

A continuación se mezcla el retenido que contiene Ang-2 oxidada con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-Ang-2 mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo en Q Sepharose FF). Por ejemplo, se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pega Ang-2 mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve Ang-2 en 7,0 ml de tampón histidina, pH

6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM. Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

A continuación se mezcla el retenido que contiene Ang-2 oxidada con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-Ang-2 mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se pegila Ang-2 mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón).

Se transfiere o se disuelve Ang-2 en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente la Ang-2 oxidada mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen Ang-2 oxidada del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene la Ang-2 oxidada purificada dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

Se purifica adicionalmente el conjugado de PEG-Ang-2 obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PEG-Ang-2 y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 3:

Se pegila Ang-2 mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve Ang-2 en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminooxilo para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-Ang-2 mediante cromatografía de intercambio iónico en Q Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila Ang-2 mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve Ang-2 en tampón Hepes (Hepes 50 mM,

cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminooxilo para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 μ l de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente se purifica el conjugado de PEG-Ang-2 mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

Se pegila Ang-2 mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de Ang-2 en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de Ang-2/ml. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 μ M, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína 1 M para dar una concentración final de 10 mM.

Se purifica el conjugado de PEG-Ang-2 por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).

Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

Posteriormente, se retira la Ang-2 libre por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF.

Ejemplo 34

Pegilación de VEGF usando un reactivo aminooxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Se pegila VEGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve VEGF en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 μ l de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

A continuación se mezcla el retenido que contiene VEGF oxidado con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-VEGF mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, en Q Sepharose FF). Por ejemplo, se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila VEGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve VEGF en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante

ES 2 731 626 T3

15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

5 A continuación se mezcla el retenido que contiene VEGF oxidado con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

10 Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-VEGF mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen el conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

15 Método 2:

Se pegila VEGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve VEGF en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el VEGF oxidado adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen VEGF oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

30 Se añade el reactivo aminooxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el VEGF oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

35 Se purifica adicionalmente el conjugado de PEG-VEGF obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PEG-VEGF y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

40 Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

45 Método 3:

Se pegila VEGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve VEGF en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente, se añade el reactivo aminooxilo para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

55 Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-VEGF mediante cromatografía de intercambio iónico en Q Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

60 En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila VEGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve VEGF en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente, se añade el reactivo aminooxilo para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de

disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-VEGF mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones del conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

Se pegila VEGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de VEGF en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de VEGF/ml. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína 1 M para dar una concentración final de 10 mM.

Se purifica el conjugado de PEG-VEGF por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).

Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

Ejemplo 35

Pegilación de EGF usando un reactivo aminoóxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Se pegila EGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve EGF en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrifugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

A continuación se mezcla el retenido que contiene EGF oxidado con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-EGF mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, en Q Sepharose FF). Por ejemplo, se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila EGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve EGF en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrifugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

A continuación se mezcla el retenido que contiene EGF oxidado con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a

oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-EGF mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen el conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se pegila EGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve EGF en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente el EGF oxidado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen EGF oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el NGF oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

Se purifica adicionalmente el conjugado de PEG-EGF obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PEG-EGF y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 3:

Se pegila EGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve EGF en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminooxilo para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-EGF mediante cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila EGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve EGF en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminooxilo para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-EGF mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

Se pegila EGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de EGF en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de EGF/ml. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína 1 M para dar una concentración final de 10 mM.

Se purifica el conjugado de PEG-EGF por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).

Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

Ejemplo 36

Pegilación de NGF usando un reactivo aminoóxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Se pegila NGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve NGF en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrifugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

A continuación se mezcla el retenido que contiene NGF oxidado con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el Conjugado de PEG-NGF mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, en Q-Sepharose FF). Por ejemplo, se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila NGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve NGF en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrifugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

A continuación se mezcla el retenido que contiene NGF oxidado con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-NGF mediante cromatografía de intercambio iónico (se recogen las fracciones que contienen conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se pegila NGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve NGF en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el NGF oxidado adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen NGF oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el NGF oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

Se purifica adicionalmente el conjugado de PEG-NGF obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen el conjugado de PEG-NGF y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 3:

Se pegila NGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve NGF en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminoóxido para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-NGF mediante cromatografía de intercambio iónico en Q Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila NGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve NGF en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminoóxido para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-NGF mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen el conjugado y luego se someten a UF/DF. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

Se pegila NGF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de NGF en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg NGF/ml. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una

concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína 1 M para dar una concentración final de 10 mM.

Se purifica el conjugado de PEG-NGF por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).

Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

15 Ejemplo 37

Pegilación de HGH usando un reactivo aminooxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de hormona del crecimiento humana (HGH) se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila HGH *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

Se pegila HGH mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve HGH en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

A continuación se mezcla el retenido que contiene HGH oxidada con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-HGH mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, en Q Sepharose FF). Por ejemplo, se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de hormona del crecimiento humana (HGH) se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila HGH *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

Se pegila HGH mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve HGH en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

A continuación se mezcla el retenido que contiene HGH oxidada con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-HGH mediante cromatografía de intercambio iónico (Se recogen las fracciones que contienen el conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de hormona del crecimiento humana (HGH) se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila HGH *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

Se pega HGH mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve HGH en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente la HGH oxidada mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen HGH oxidada del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene la HGH oxidada purificada dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

Se purifica adicionalmente el conjugado de PEG-HGH obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen el conjugado de PEG-NGF y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 3:

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de hormona del crecimiento humana (HGH) se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila HGH *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

Se pega HGH mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve HGH en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminoóxido para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-HGH mediante cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de hormona del crecimiento humana (HGH) se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila HGH *in vitro* según métodos conocidos en la técnica. Se pega HGH mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve HGH en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminoóxido para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-HGH mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las

fracciones que contienen el conjugado y luego se someten a UF/DF. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

5 Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de hormona del crecimiento humana (HGH) se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila HGH *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

10 Se pegila HGH mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de HGH en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de HGH/ml. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una
15 concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína para dar una concentración final de 10 mM.

20 Se purifica el conjugado de PEG-HGH por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final
25 contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).

Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

30 Ejemplo 38

Pegilación de TNF-alfa usando un reactivo aminoóxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

35 Se pegila TNF-alfa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve TNF-alfa en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con
40 agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrifugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

45 A continuación se mezcla el retenido que contiene TNF-alfa oxidado con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

50 Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-TNF-alfa mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, en Q-Sepharose FF). Por ejemplo, se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

55 En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila TNF-alfa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve TNF-alfa en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se
60 extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrifugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

65 A continuación se mezcla el retenido que contiene TNF-alfa oxidado con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y es incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminoóxi-PEG con un PM de

20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-TNF-alfa mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen el conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Se pegila TNF-alfa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve TNF-alfa en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el TNF-alfa oxidado adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen TNF-alfa oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el TNF alfa oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

Se purifica el conjugado de PEG-TNF-alfa obtenido adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PEG-TNF-alfa y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 3:

Se pegila TNF-alfa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve TNF-alfa en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminoóxido para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-TNF-alfa mediante cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila TNF-alfa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve TNF-alfa en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente, se añade el reactivo aminoóxido para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-TNF-alfa mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado y luego se someten a UF/DF. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

- Se pegila TNF-alfa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de TNF-alfa en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg TNF-alfa/ml. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína 1 M para dar una concentración final de 10 mM.
- Se purifica el conjugado de PEG-TNF-alfa por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).
- Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

Ejemplo 39

- Pegilación de insulina usando un reactivo aminoóxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

- Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de insulina se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila insulina *in vitro* según métodos conocidos en la técnica. Se pegila insulina mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve insulina en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.
- A continuación se mezcla el retenido que contiene insulina oxidada con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.
- Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-insulina mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, en Q-Sepharose FF). Por ejemplo, se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

- En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de insulina se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila insulina *in vitro* según métodos conocidos en la técnica. Se pegila insulina mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve insulina en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspín para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

- A continuación se mezcla el retenido que contiene insulina oxidada con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-insulina mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen el conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 2:

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de insulina se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila insulina *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

Se pegila insulina mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o disuelve insulina en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente la insulina oxidada mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen la insulina oxidada del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene la insulina oxidada purificada dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

Se purifica el conjugado de PEG-insulina obtenido adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PEG-insulina y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 3:

Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de insulina se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila insulina *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

Se pegila insulina mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve insulina en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente, se añade el reactivo aminoóxido para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-insulina mediante cromatografía de intercambio iónico en Q Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de insulina se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila insulina *in vitro* según métodos conocidos en la técnica. Se pegila insulina mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve insulina en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente

se añade el reactivo aminooxilo para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

- 5 Finalmente, se purifica el conjugado de insulina mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado y luego se someten a UF/DF. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

- 10 Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de insulina se modifica en primer lugar para incorporar al menos un sitio de glicosilación. Tras la purificación, se glicosila insulina *in vitro* según métodos conocidos en la técnica.

- 15 Se pega insulina mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o disuelve una concentración o un peso inicial de insulina en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de insulina/ml. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína para dar una concentración final de 10 mM.

- 25 Se purifica el conjugado de PEG-insulina por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM. pH 7,5).

- 30 Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

35 Ejemplo 40

Pegilación de interferón-alfa usando un reactivo aminooxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

- 40 Se pega interferón-alfa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve interferón-alfa en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrifugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

- 50 A continuación se mezcla el retenido que contiene interferón-alfa oxidado con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

- 55 Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-interferón-alfa mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, en Q-Sepharose FF). Por ejemplo, se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

- 60 En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pega interferón-alfa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve interferón-alfa en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína

- 65

1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

5 A continuación se mezcla el retenido que contiene interferón-alfa oxidado con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

10 Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-interferón-alfa mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

15 Método 2:

Se pegila interferón-alfa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve interferón-alfa en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente el interferón-alfa oxidado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen interferón-alfa oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

30 Se añade el reactivo aminooxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el interferón-alfa oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

35 Se purifica adicionalmente el conjugado de PEG-interferón-alfa obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PEG-interferón-alfa y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

40 Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

45 Método 3:

Se pegila interferón-alfa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve interferón-alfa en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminooxilo para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

55 Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-interferón-alfa mediante cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

60 En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila interferón-alfa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve interferón-alfa en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminooxilo para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición

de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-interferón-alfa mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen el conjugado y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

Se pegila interferón-alfa mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de interferón-alfa en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de interferón-alfa / ml. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína 1 M para dar una concentración final de 10 mM.

Se purifica el conjugado de PEG-interferón-alfa por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, 5 mM CnCl₂, pH 7,5).

Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

30 Ejemplo 41

Pegilación de interferón-gamma usando un reactivo aminooxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

Se pegila interferón-gamma mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelven 10 mg de interferón-gamma en 5 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añaden 100 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 50 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrífugos Vivaspin 15R de 10 kD para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se mezcla el retenido (aproximadamente 7 ml), que contiene interferón-gamma oxidado, con 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade el reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a TA a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-interferón-gamma mediante cromatografía de intercambio iónico en SP Sepharose FF. Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 6,5) y se carga en una columna HiPrep SPFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,5). Se eluye interferón-gamma libre lavando la columna con tampón B al 25% y el conjugado en tampón B al 50%. Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 6,9 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PEG-interferón-gamma se determina una actividad específica de >50% en comparación con interferón-gamma nativo. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene interferón-gamma libre.

Método 2:

Se pegila interferón-gamma mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo

aminoxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve interferón-gamma en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica el interferón-gamma oxidado adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen interferón-gamma oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el interferón-gamma oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

Se purifica el conjugado de PEG-interferón-gamma obtenido adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PEG-interferón-gamma y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Se caracteriza analíticamente el conjugado preparado mediante el uso de este procedimiento midiendo la proteína total y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 3:

Se pega interferón-gamma mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelven 10 mg de interferón-gamma en ~8 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añaden 200 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 100 µl de disolución acuosa de cisteína 1 M.

Finalmente el conjugado de PEG-interferón-gamma mediante cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose FF. Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 6,5) y se carga en una columna HiPrep SP FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,5). Se eluye interferón-gamma libre lavando la columna con tampón B al 25% y el conjugado en tampón B al 50%. Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 6,9 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PEG-interferón-gamma se determina una actividad específica de >50% en comparación con interferón-gamma nativo. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene interferón-gamma libre.

Método 4:

Se pega interferón-gamma mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de interferón-gamma en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de interferón-gamma / ml. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína 1 M para dar una concentración final de 10 mM.

Se purifica el conjugado de PEG-interferón-gamma por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).

Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

10 Ejemplo 42

Pegilación de G-CSF usando un reactivo aminooxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

15 Se pegila G-CSF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve G-CSF en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrifugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

25 A continuación se mezcla el retenido que contiene G-CSF oxidado con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

30 Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-G-CSF mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, en Q-Sepharose FF). Por ejemplo, se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

35 En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila G-CSF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve G-CSF en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtros centrifugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

45 A continuación se mezcla el retenido que contiene G-CSF oxidado con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

50 Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-G-CSF mediante cromatografía de intercambio iónico (se recogen las fracciones que contienen el conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

55 Método 2:

60 Se pegila G-CSF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o disuelve G-CSF en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente el G-CSF oxidado mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen G-CSF oxidado del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

5 Se añade el reactivo aminooxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene el G-CSF oxidado purificado dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

10 Se purifica adicionalmente el conjugado de PEG-G-CSF obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PEG-G-CSF y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

15 Método 3:

Se pegila G-CSF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve G-CSF en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente, se añade el reactivo aminooxilo para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

25 Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-G-CSF mediante cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

35 En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila G-CSF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve G-CSF en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente, se añade el reactivo aminooxilo para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

40 Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-G-CSF mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

45 Método 4:

Se pegila G-CSF mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o disuelve una concentración o un peso inicial de G-CSF en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de G-CSF/ml. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína 1 M para dar una concentración final de 10 mM.

60 Se purifica el conjugado de G-CSF por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).

65 Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

Ejemplo 43

Pegilación de Humira usando un reactivo aminooxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

5

Método 1:

Se pegila Humira mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve Humira en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

15

A continuación se mezcla el retenido que contiene Humira oxidada con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

20

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-Humira mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, en Q-Sepharose FF). Por ejemplo, se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

25

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila Humira mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve Humira en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

30

35

A continuación se mezcla el retenido que contiene Humira oxidada con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

40

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-Humira mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen el conjugado del eluato y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

45

Método 2:

Se pegila Humira mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o disuelve Humira en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

55

Se purifica adicionalmente la Humira oxidada mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen Humira oxidada del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

60

Se añade el reactivo aminooxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene la Humira oxidada purificada dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura

65

(T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

Se purifica el conjugado de PEG-Humira obtenido adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PEG-Humira y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Método 3:

Se pegila Humira mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve Humira en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente, se añade el reactivo aminoóxido para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-Humira mediante cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila Humira mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve Humira en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminoóxido para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-Humira mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

Método 4:

Se pegila Humira mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de HJumira en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de Humira/ml. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína para dar una concentración final de 10 mM.

Se purifica el conjugado de Humira por medio de cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).

Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

60 Ejemplo 44

Pegilación de Prolia usando un reactivo aminoóxi-PEG y m-toluidina como catalizador nucleófilo

Método 1:

65 Prolia se pegila mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un

ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve Prolia en 7,0 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Luego se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 7,5 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

A continuación se mezcla el retenido que contiene Prolia oxidada con una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a temperatura ambiente a oscuras con agitación suave.

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-Prolia mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, en Q-Sepharose FF). Por ejemplo, se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna equilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana de punto de corte de PM apropiada. A continuación se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Coomassie, Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 1 se lleva a cabo de la siguiente manera. Se pegila Prolia mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelven 10 mg de rFIX en 5 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añaden 100 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a oscuras a 4°C con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 50 µl de una disolución acuosa de cisteína 1 M. Se somete posteriormente la mezcla a UF/DF empleando filtradores centrífugos Vivaspin 15R de 10 kD para retirar el peryodato en exceso, el extinguidor y los subproductos de los mismos.

Se mezcla el retenido (aproximadamente 7 ml), que contiene Prolia oxidada, con 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añade el reactivo aminooxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba esta mezcla durante 2,5 h a TA a oscuras con agitación suave.

Finalmente se purifica el conjugado de PEG-Prolia mediante cromatografía de intercambio iónico en SP Sepharose FF. Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 6,5) y se carga en una columna HiPrep SP FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,5). Se eluye Prolia libre lavando la columna con tampón B al 25% y el conjugado en tampón B al 50%. Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 6,9 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PEG-Prolia se determina una actividad específica de >50% en comparación con Prolia nativa. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene Prolia libre.

Método 2:

Se pegila Prolia mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminooxilo. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve Prolia en tampón de reacción (por ejemplo Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 1,0 +/- 0,25 mg/ml. Luego se corrige el pH de la disolución hasta 6,0 mediante adición gota a gota de una disolución acuosa de HCl 0,5 N. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 40 mM en el plazo de 10 minutos para dar una concentración de 200 µM. Se lleva a cabo la reacción de oxidación durante 30 +/- 5 min a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C. Luego se detiene la reacción mediante adición de una disolución acuosa de L-cisteína (1 M) en el plazo de 15 minutos a T= +22 +/- 2°C para dar una concentración final de 10 mM en la mezcla de reacción e incubación durante 60 +/- 5 min.

Se purifica adicionalmente la Prolia oxidada mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen Humira oxidada del eluato y se usan para la reacción de conjugación.

Se añade el reactivo aminooxi-PEG con un reactivo de PM de 20 kD en un exceso molar de 50 veces al eluato que contiene la Prolia oxidada purificada dentro de un periodo de tiempo máximo (t) de 15 minutos con agitación suave. Luego se añade una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM) en el plazo de 15 minutos para obtener una

concentración final de 10 mM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 +/- 10 min a oscuras a una temperatura (T) de T= +22 +/- 2°C con agitación suave.

Se purifica adicionalmente el conjugado de PEG-Prolia obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico. Se recogen las fracciones que contienen conjugado de PEG-Prolia y se concentran mediante ultra/diafiltración (UF/DF) usando una membrana hecha de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular apropiado (Millipore).

Método 3:

Se pega Prolia mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelve EPO en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se mezcla con una disolución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente se añade el reactivo aminoóxido para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 8 µl de disolución acuosa de cisteína (1 M).

Finalmente, se purifica el conjugado de PEG-Prolia mediante cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose FF. Se cargan 1,5 mg de proteína/ml de gel en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5 mM. Se eluye el conjugado con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl₂ 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,4 y luego se someten a UF/DF usando una membrana. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica.

En una realización alternativa, el método 3 se lleva a cabo de la siguiente manera.

Se pega Prolia mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se disuelven 10 mg de Prolia en ~8 ml de tampón histidina, pH 6,0 (L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM). Luego se añaden 200 µl de una disolución acuosa de peryodato de sodio (5 mM) y 2 ml de una disolución acuosa de m-toluidina (50 mM). Posteriormente, se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 5 veces. Se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 100 µl de disolución acuosa de cisteína 1 M.

Finalmente se purifica el conjugado de PEG-Prolia mediante cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose FF. Se diluye la mezcla de reacción con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 6,5) y se carga en una columna HiPrep SPFF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. Luego se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,5). Se eluye Prolia libre lavando la columna con tampón B al 25% y el conjugado en tampón B al 50%. Se concentran las fracciones que contienen conjugado mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón histidina, pH 6,9 que contiene NaCl 150 mM. Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (Bradford) y la actividad biológica según métodos conocidos en la técnica. Para el conjugado de PEG-Prolia se determina una actividad específica de > 50% en comparación con Prolia nativa. Se caracteriza analíticamente de manera adicional el conjugado mediante HPLC de exclusión molecular usando un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Shodex KW 803 en condiciones tal como se describieron anteriormente (Kolarich *et al*, Transfusion 2006;46:1959-77). Se demuestra que la preparación no contiene Prolia libre.

Método 4:

Se pega Prolia mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo aminoóxido. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright®CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). Se transfiere o se disuelve una concentración o un peso inicial de HJumira en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para obtener una concentración final de proteína de 2 mg de Prolia/ml. Posteriormente se añade una disolución acuosa de peryodato de sodio 5 mM en el plazo de 15 minutos para dar una concentración final de 100 µM, seguido por la adición de una disolución acuosa de m-toluidina 50 mM para obtener una concentración final de 10 mM dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos. Luego se añade el reactivo aminoóxi-PEG con un PM de 20 kD (descrito anteriormente) para dar un exceso molar de reactivo de 20 veces. Tras la corrección del pH hasta 6,0 se incuba la mezcla durante 2 h a oscuras a temperatura ambiente con agitación suave y se extingue durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución acuosa de L-cisteína 1 M para dar una concentración final de 10 mM.

Se purifica el conjugado de Prolia por medio de cromatografía de intercambio iónico (EEC). Se concentran las fracciones que contienen el conjugado del eluato mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm², punto de corte de 10 kD / Millipore). Se realiza la etapa de diafiltración final

contra tampón Hepes (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5).

Se caracteriza analíticamente la preparación midiendo la proteína total (procedimiento Bradford y BCA) y la actividad biológica según métodos conocidos.

5

Ejemplo 45

Pegilación de una proteína terapéutica usando PEG ramificado

10 La pegilación de una proteína terapéutica de la invención puede extenderse a un reactivo de pegilación lineal o ramificado, el cual está constituido por un aldehído y un ligador adecuado que contiene un grupo aminoóxilo activo.

Lista de secuencias

15 <110> Siekmann, *et al.*

<120> Catalizadores nucleófilos para enlace oxima

20 <130> 31315/46394

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1

<211> 422

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 1

REIVINDICACIONES

1. Método de conjugación de un polímero soluble en agua con un resto de hidrato de carbono oxidado de una proteína terapéutica que comprende poner en contacto el resto de hidrato de carbono oxidado con un polímero soluble en agua activado en condiciones que permiten la conjugación;

conteniendo dicho polímero soluble en agua un grupo aminoóxilo activo y se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, R.U.), ácido polisilícico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, dextrano, carboximetildextrano, poli(óxido de alquileno) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolina, poliacriloil morfolina, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico y poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal)) (PHF); y

dicho resto de hidrato de carbono oxidado mediante incubación con un tampón que comprende un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en peryodato de sodio (NaIO₄), tetraacetato de plomo (Pb(OAc)₄) y perrutenato de potasio (KRuO₄);

en el que se forma un enlace oxima entre el resto de hidrato de carbono oxidado y el grupo aminoóxilo activo en el polímero soluble en agua;

y en el que dicha formación de enlace oxima se cataliza mediante el catalizador nucleófilo m-toluidina.

2. Método según la reivindicación 1

en el que dicha proteína terapéutica se selecciona del grupo que consiste en factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de Von Willebrand (vWF), factor V (FV), factor X (FX), factor XI (FXI), factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (TF), proteasa ADAMTS13, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor 1 estimulante de colonias (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), EPO, interferón-alfa (IFN-alfa), interferón de consenso, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-omega, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombopoyetina (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, polipéptido 1 de tipo angiopoyetina (ANGPTL1), polipéptido 2 de tipo angiopoyetina (ANGPTL2), polipéptido 3 de tipo angiopoyetina (ANGPTL3), polipéptido 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4), polipéptido 5 de tipo angiopoyetina (ANGPTL5), polipéptido 6 de tipo angiopoyetina (ANGPTL6), polipéptido 7 de tipo angiopoyetina (ANGPTL7), vitronectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína 1 morfogenética de hueso, proteína 2 morfogenética de hueso, proteína 3 morfogenética de hueso, proteína 4 morfogenética de hueso, proteína 5 morfogenética de hueso, proteína 6 morfogenética de hueso, proteína 7 morfogenética de hueso, proteína 8 morfogenética de hueso, proteína 9 morfogenética de hueso, proteína 10 morfogenética de hueso, proteína 11 morfogenética de hueso, proteína 12 morfogenética de hueso, proteína 13 morfogenética de hueso, proteína 14 morfogenética de hueso, proteína 15 morfogenética de hueso, receptor IA de proteína morfogenética de hueso, receptor IB de proteína morfogenética de hueso, receptor II de proteína morfogenética de hueso, factor neurotrófico derivado de cerebro, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, receptor de factor neurotrófico ciliar, cripto, críptico, factor 1 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor 2 α quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor 2 β quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor β de crecimiento de células endoteliales, endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, epígeno, epiregulina, atrayente de neutrófilos derivados de epitelio, factor 4 de crecimiento de fibroblastos, factor 5 de crecimiento de fibroblastos, factor 6 de crecimiento de fibroblastos, factor 7 de crecimiento de fibroblastos, factor 8 de crecimiento de fibroblastos, factor 8b de crecimiento de fibroblastos, factor 8c de crecimiento de fibroblastos, factor 9 de crecimiento de fibroblastos, factor 10 de crecimiento de fibroblastos, factor 11 de crecimiento de fibroblastos, factor 12 de crecimiento de fibroblastos, factor 13 de crecimiento de fibroblastos, factor 16 de crecimiento de fibroblastos, factor 17 de crecimiento de fibroblastos, factor 19 de crecimiento de fibroblastos, factor 20 de crecimiento de fibroblastos, factor 21 de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor α 1 de factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, receptor α 2 de factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, proteína relacionada con el crecimiento, proteína α relacionada con el crecimiento, proteína β relacionada con el crecimiento, proteína γ relacionada con el crecimiento, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de hepatoma, factor I de crecimiento de tipo insulina, receptor de factor de crecimiento de tipo insulina, factor II de crecimiento de tipo insulina, proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor α de factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento nervioso, receptor de factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina-3, neurotrofina-4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento de placenta, factor 2 de crecimiento de placenta,

- factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor AA de crecimiento derivado de plaquetas, factor AB de crecimiento derivado de plaquetas, cadena B de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor BB de crecimiento derivado de plaquetas, receptor α de factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor β de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor de factor de células madre, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, factor α de crecimiento transformante, factor β de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante, factor β 1.2 de crecimiento transformante, factor β 2 de crecimiento transformante, factor β 3 de crecimiento transformante, factor β 5 de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante latente, proteína I de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína II de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína III de unión a factor β de crecimiento transformante, linfopoyetina estromal tímica (TSLP), receptor de factor de necrosis tumoral tipo I, receptor de factor de necrosis tumoral tipo II, receptor de activador de plasminógeno de tipo urocinasa, proteína activadora de fosfolipasa (PUP), insulina, lectina, ricina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimuladora de folículos, hormona estimuladora de la tiroides, activador de plasminógeno tisular, IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, α -galactosidasa, β -galactosidasa, ADNasa, fetuina, hormona luteinizante, estrógeno, albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, transferrina, trombopoyetina, urocinasa, integrina, trombina, leptina, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanercept), una proteína de la tabla 1, o un fragmento, derivado o variante de los mismos biológicamente activo.
3. Método según la reivindicación 2, en el que una disolución que comprende una concentración inicial de la proteína terapéutica entre aproximadamente 0,3 mg/ml y aproximadamente 3,0 mg/ml se ajusta a un valor de pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0 antes de ponerse en contacto con el polímero soluble en agua activado; por ejemplo, en el que la concentración inicial de la proteína terapéutica es de aproximadamente 1,0 mg/ml y el pH es de aproximadamente 6,0.
4. Método según la reivindicación 2, en el que la proteína terapéutica se pone en contacto con una concentración en exceso deseada de polímero soluble en agua activado, en el que la concentración en exceso es un exceso de entre aproximadamente 1 molar y aproximadamente 300 molar, por ejemplo, un exceso molar de aproximadamente 50 veces.
5. Método según la reivindicación 4, en el que la proteína terapéutica se incuba con el polímero soluble en agua activado en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,5 horas y aproximadamente 24 horas; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación; por ejemplo, en el que las condiciones comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 120 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz; y con agitación.
6. Método según la reivindicación 2, en el que el catalizador nucleofílico se añade en una cantidad para dar como resultado una concentración final de catalizador nucleofílico de entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 50 mM, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,1 minutos y aproximadamente 30 minutos; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación; por ejemplo, en el que la concentración final del catalizador nucleofílico es de aproximadamente 10 mM, y las condiciones comprenden un periodo de tiempo de hasta aproximadamente 15 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz; y con agitación.
7. Método según la reivindicación 2, en el que el agente oxidante se añade en una cantidad para dar como resultado una concentración final de agente oxidante entre aproximadamente 50 μ M y aproximadamente 1000 μ M, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,1 minutos y 120 minutos; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación; por ejemplo en el que la concentración final de agente oxidante es de aproximadamente 400 μ M, y las condiciones comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 10 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz y con agitación.
8. Método según la reivindicación 2, en el que la conjugación del polímero soluble en agua con el resto de hidrato de carbono oxidado de la proteína terapéutica se detiene mediante la adición de un agente de extinción seleccionado del grupo que consiste en L-cisteína, metionina, glutatión, glicerol, metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), triptófano, tirosina, histidina o derivados de los mismos, cresol, imidazol, y combinaciones de los mismos; en el que el agente de extinción se añade en una cantidad para dar como resultado una concentración final de agente de extinción entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 120 minutos; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación.

9. Método según la reivindicación 8, en el que el agente de extinción es L-cisteína, y se añade preferiblemente para dar como resultado una concentración final de aproximadamente 10 mM y las condiciones comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 60 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz y con agitación.
- 5
10. Método según la reivindicación 2, que comprende:
- a) una primera etapa que comprende ajustar el valor de pH de una disolución que comprende la proteína terapéutica a un valor de pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, en la que la concentración de proteína terapéutica es de entre aproximadamente 0,3 mg/ml y aproximadamente 3,0 mg/ml;
- 10
- b) una segunda etapa que comprende oxidar uno o más hidratos de carbono en la proteína terapéutica, en la que el agente oxidante se añade a la disolución en la primera etapa para dar como resultado una concentración final de entre aproximadamente 50 μ M y aproximadamente 1000 μ M, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,1 minutos y aproximadamente 120 minutos; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz, y con o sin agitación;
- 15
- c) una tercera etapa que comprende poner en contacto la proteína terapéutica con una concentración en exceso deseada de polímero soluble en agua activado, en la que la concentración en exceso es un exceso de entre aproximadamente 1 molar y aproximadamente 300 molar, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,5 horas y aproximadamente 24 horas, una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz; y con o sin agitación;
- 20
- d) una cuarta etapa que comprende añadir el catalizador nucleofílico a la disolución de la tercera etapa, en la que el catalizador nucleofílico se añade para dar como resultado una concentración final de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 50 mM, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,1 minutos y aproximadamente 30 minutos; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz, y con o sin agitación;
- 25
- e) una quinta etapa en la que la proteína terapéutica se incuba con el polímero soluble en agua activado y catalizador nucleofílico en condiciones que permiten la conjugación del polímero soluble en agua activado con uno o más hidratos de carbono oxidados en la proteína terapéutica, comprendiendo dichas condiciones un periodo de tiempo de entre aproximadamente 0,5 horas y aproximadamente 24 horas, una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz, y con o sin agitación; y
- 30
- f) una sexta etapa en la que la conjugación del polímero soluble en agua con el uno o más hidratos de carbono oxidados de la proteína terapéutica en la quinta etapa se detiene mediante la adición de un agente de extinción seleccionado del grupo que consiste en L-cisteína, metionina, glutatión, glicerol, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (metabisulfito de sodio), triptófano, tirosina, histidina o derivados de los mismos, cresol, imidazol, y combinaciones de los mismos; en la que el agente de extinción se añade para dar como resultado una concentración final de aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM, en condiciones que comprenden un periodo de tiempo de entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 120 minutos; una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 37°C; en presencia o ausencia de luz, y con o sin agitación.
- 35
- 40
- 45
- 50 11. Método según la reivindicación 10, en el que la concentración inicial de la proteína terapéutica en la primera etapa es de aproximadamente 1 mg/ml y el pH es de aproximadamente 6,0;
- en el que la concentración final de agente oxidante en la segunda etapa es de aproximadamente 400 μ M, y las condiciones comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 10 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz y con agitación;
- 55
- en el que la concentración en exceso en la tercera etapa es un exceso de aproximadamente 50 molar; en el que las condiciones en la tercera etapa comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 15 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz y con agitación;
- 60
- en el que la concentración final del catalizador nucleofílico en la cuarta etapa es de aproximadamente 10 mM, y las condiciones en la cuarta etapa comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 15 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz y con agitación;
- 65
- en el que las condiciones de incubación de la proteína terapéutica con el polímero soluble en agua activado y catalizador nucleofílico en la quinta etapa comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente

2 horas; una temperatura de aproximadamente 22°C; ausencia de luz; y con agitación; y

en el que el agente de extinción en la sexta etapa es L-cisteína; y en el que la L-cisteína se añade para dar como resultado una concentración final de aproximadamente 10 mM y las condiciones en la sexta etapa comprenden un periodo de tiempo de aproximadamente 60 minutos, una temperatura de aproximadamente 22°C, ausencia de luz y con agitación.

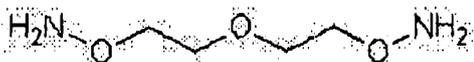
12. Método según la reivindicación 2, en el que el polímero soluble en agua es PSA y está comprendido por aproximadamente 10 - 300 unidades de ácido siálico.

13. Método según la reivindicación 2, en el que cuando la proteína terapéutica es una proteína de la coagulación sanguínea, el resto de hidrato de carbono oxidado de la proteína terapéutica se ubica en el péptido de activación de dicha proteína de la coagulación sanguínea.

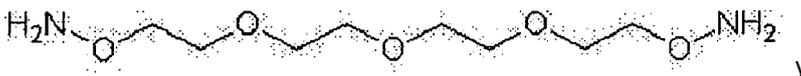
14. Método según la reivindicación 2, en el que el polímero soluble en agua es PSA y en el que el PSA se prepara haciendo reaccionar un ligador de aminoóxilo activado con PSA oxidado;

en el que el ligador de aminoóxilo se selecciona del grupo que consiste en:

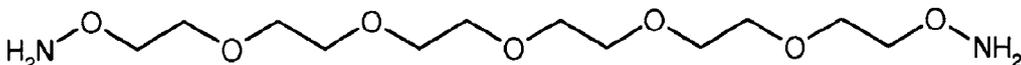
a) un ligador de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina de fórmula:



b) un ligador de 3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina de fórmula:



c) un ligador de 3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecano-1,17-dioxiamina de fórmula:



en el que el PSA se oxida mediante incubación con un agente oxidante para formar un grupo aldehído terminal en el extremo no reductor del PSA.

15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el agente oxidante es NaIO₄.

16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el catalizador nucleofílico se proporciona a una concentración de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 50 mM; preferiblemente a una concentración de aproximadamente 10 mM.

17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que comprende además la etapa de reducir un enlace oxima en la proteína terapéutica conjugada incubando la proteína terapéutica conjugada en un tampón que comprende un compuesto reductor seleccionado del grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃), ácido ascórbico (vitamina C) y NaBH₃.

18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, que comprende además la etapa de purificar la proteína terapéutica conjugada; por ejemplo en el que la proteína terapéutica conjugada se purifica mediante un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía, filtración y precipitación.

19. Método según la reivindicación 18, en el que la cromatografía se selecciona del grupo que consiste en cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), cromatografía de exclusión molecular (SEC), cromatografía de afinidad y cromatografía de fase inversa, opcionalmente en el que se usa una sal anticaotrópica en una etapa de carga de cromatografía y en una etapa de lavado de cromatografía; opcionalmente en el que la cromatografía tiene lugar en una columna, tal como una columna que comprende una resina de cromatografía seleccionada del grupo que consiste en Phenyl-Sepharose FF y Butyl-Sepharose FF; y en el que la resina está presente preferiblemente en la columna a una altura de lecho de entre aproximadamente 5 cm y aproximadamente 20 cm, preferiblemente aproximadamente 10 cm.

20. Método según la reivindicación 19, que comprende una o más etapas de lavado en las que la dirección de flujo se establece en flujo ascendente y en las que la velocidad de flujo es de entre aproximadamente

0,2 cm/min y aproximadamente 6,7 cm/min, opcionalmente en las que la velocidad de flujo es de aproximadamente 2 cm/min.

- 5 21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 19-20, que comprende una o más etapas de elución en las que la dirección de flujo se establece en flujo descendente y en las que la velocidad de flujo es de entre aproximadamente 0,1 cm/min y aproximadamente 6,7 cm/min, opcionalmente en las que la velocidad de flujo es de aproximadamente 1 cm/min.
- 10 22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 18-21 que comprende además concentrar la proteína terapéutica conjugada mediante ultra/diafiltración (UF/DF); opcionalmente en el que la concentración final de proteína terapéutica es de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3 mg/ml.
- 15 23. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 18-22, en el que la proteína terapéutica comprende entre aproximadamente 5 y aproximadamente 11 restos de polímero soluble en agua.
- 20 24. Método según la reivindicación 2, en el que la proteína terapéutica conjugada se purifica usando cromatografía; en el que se usa una sal anticaotrópica para una etapa de carga y para una etapa de lavado; comprendiendo el método una o más etapas de lavado en las que la dirección de flujo se establece en flujo ascendente y en las que la velocidad de flujo es de entre aproximadamente 0,2 cm/min y aproximadamente 6,7 cm/min y una o más etapas de elución en las que la dirección de flujo se establece en flujo descendente y en las que la velocidad de flujo es de entre aproximadamente 0,2 cm/min y aproximadamente 6,7 cm/min; que comprende además concentrar la proteína terapéutica conjugada mediante ultra/diafiltración (UF/DF); opcionalmente en el que la cromatografía es cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); en el que la velocidad de flujo de la una o más etapas de lavado es de aproximadamente 2 cm/min; y en el que la velocidad de flujo de la una o más etapas de elución es de aproximadamente 1 cm/min.
- 25 25. Método de formación de un enlace oxima entre un resto de hidrato de carbono oxidado en una proteína terapéutica y un polímero soluble en agua activado que contiene un grupo aminoóxilo activo que comprende las etapas de:
- 30 a) oxidar un resto de hidrato de carbono en una proteína terapéutica incubando dicha proteína con un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en peryodato de sodio (NaIO_4), tetraacetato de plomo ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$) y perrutenato de potasio (KRuO_4); y
- 35 b) formar un enlace oxima entre el resto de hidrato de carbono oxidado de la proteína terapéutica y el polímero soluble en agua activado que contiene un grupo aminoóxilo activo en presencia de un catalizador nucleofílico en condiciones que permiten la formación de dicho enlace oxima;
- 40 en el que dicho polímero soluble en agua que contiene un grupo aminoóxilo activo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, R.U.), ácido polisiálico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, dextrano, carboximetil-dextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolina, poliacriloilmorfolina, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico,
- 45 anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico y poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal) (PHF);
- en el que el catalizador nucleofílico es m-toluidina.
- 50 26. Método de formación de un enlace hidrazona entre un resto de hidrato de carbono oxidado en una proteína terapéutica y un polímero soluble en agua activado que contiene un grupo hidrazida activo que comprende las etapas de:
- 55 a) oxidar un resto de hidrato de carbono en una proteína terapéutica incubando dicha proteína con un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en peryodato de sodio (NaIO_4), tetraacetato de plomo ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$) y perrutenato de potasio (KRuO_4); y
- 60 b) formar un enlace hidrazona entre el resto de hidrato de carbono oxidado de la proteína terapéutica y el polímero soluble en agua activado que contiene un grupo hidrazida activo en presencia de un catalizador nucleofílico en condiciones que permiten la formación de dicho enlace hidrazona;
- 65 en el que dicho polímero soluble en agua que contiene un grupo hidrazida activo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, R.U.), ácido polisiálico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, dextrano, carboximetil-dextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolina, poliacriloilmorfolina, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico,

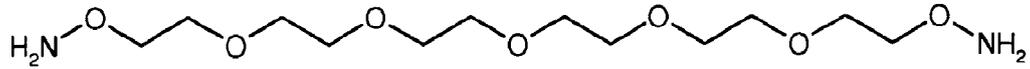
anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico y poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal) (PHF);

en el que el catalizador nucleofílico es m-toluidina.

5 27. Método según la reivindicación 26

en el que la proteína terapéutica se selecciona del grupo que consiste en factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de Von Willebrand (VWF), factor V (FV), factor X (FX), factor XI (FXI), factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (TF), proteasa ADAMTS13, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor 1 estimulante de colonias (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), EPO, interferón-alfa (IFN-alfa), interferón de consenso, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-omega, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombopoyetina (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, polipéptido 1 de tipo angiopoyetina (ANGPTL1), polipéptido 2 de tipo angiopoyetina (ANGPTL2), polipéptido 3 de tipo angiopoyetina (ANGPTL3), polipéptido 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4), polipéptido 5 de tipo angiopoyetina (ANGPTL5), polipéptido 6 de tipo angiopoyetina (ANGPTL6), polipéptido 7 de tipo angiopoyetina (ANGPTL 7), vitronectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína 1 morfogenética de hueso, proteína 2 morfogenética de hueso, proteína 3 morfogenética de hueso, proteína 4 morfogenética de hueso, proteína 5 morfogenética de hueso, proteína 6 morfogenética de hueso, proteína 7 morfogenética de hueso, proteína 8 morfogenética de hueso, proteína 9 morfogenética de hueso, proteína 10 morfogenética de hueso, proteína 11 morfogenética de hueso, proteína 12 morfogenética de hueso, proteína 13 morfogenética de hueso, proteína 14 morfogenética de hueso, proteína 15 morfogenética de hueso, receptor IA de proteína morfogenética de hueso, receptor IB de proteína morfogenética de hueso, receptor II de proteína morfogenética de hueso, factor neurotrófico derivado de cerebro, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, receptor de factor neurotrófico ciliar, cripto, críptico, factor 1 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor 2 α quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor 2 β quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina, factor β de crecimiento de células endoteliales, endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, epígeno, epiregulina, atrayente de neutrófilos derivados de epitelio, factor 4 de crecimiento de fibroblastos, factor 5 de crecimiento de fibroblastos, factor 6 de crecimiento de fibroblastos, factor 7 de crecimiento de fibroblastos, factor 8 de crecimiento de fibroblastos, factor 8b de crecimiento de fibroblastos, factor 8c de crecimiento de fibroblastos, factor 9 de crecimiento de fibroblastos, factor 10 de crecimiento de fibroblastos, factor 11 de crecimiento de fibroblastos, factor 12 de crecimiento de fibroblastos, factor 13 de crecimiento de fibroblastos, factor 16 de crecimiento de fibroblastos, factor 17 de crecimiento de fibroblastos, factor 19 de crecimiento de fibroblastos, factor 20 de crecimiento de fibroblastos, factor 21 de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor α 1 de factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, receptor α 2 de factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, proteína relacionada con el crecimiento, proteína α relacionada con el crecimiento, proteína β relacionada con el crecimiento, proteína γ relacionada con el crecimiento, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de hepatoma, factor I de crecimiento de tipo insulina, receptor de factor de crecimiento de tipo insulina, factor II de crecimiento de tipo insulina, proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor α de factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento nervioso, receptor de factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina-3, neurotrofina-4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento de placenta, factor 2 de crecimiento de placenta, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor AA de crecimiento derivado de plaquetas, factor AB de crecimiento derivado de plaquetas, cadena B de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor BB de crecimiento derivado de plaquetas, receptor α de factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor β de factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor de factor de células madre, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, factor α de crecimiento transformante, factor β de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante, factor β 1.2 de crecimiento transformante, factor β 2 de crecimiento transformante, factor β 3 de crecimiento transformante, factor β 5 de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante latente, proteína I de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína II de unión a factor β de crecimiento transformante, proteína III de unión a factor β de crecimiento transformante, linfopoyetina estromal tímica (TSLP), receptor de factor de necrosis tumoral tipo I, receptor de factor de necrosis tumoral tipo II, receptor de activador de plasminógeno de tipo urocinasa, proteína activadora de fosfolipasa (PUP), insulina, lectina, ricina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimuladora de folículos, hormona estimuladora de la tiroides, activador de plasminógeno tisular, IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, α -galactosidasa, β -galactosidasa, ADNasa, fetuina, hormona luteinizante, estrógeno, albúmina, lipoproteína, fetoproteína, transferrina, trombopoyetina, urocinasa, integrina, trombospondina, leptina, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanercept), una proteína de la tabla 1, o un fragmento, derivado o variante de los mismos biológicamente activo.

c) un ligador de 3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecano-1,17-dioxiamina de fórmula:



- 5
34. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 29 y 30, en el que el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃), ácido ascórbico (vitamina C) y NaBH₃.
- 10
35. Método según la reivindicación 30, en el que el catalizador nucleofílico es m-toluidina, y en el que opcionalmente el catalizador nucleofílico se añade en una cantidad para dar como resultado una concentración final de catalizador nucleofílico de entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 50 mM.
- 15
36. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 28-35, que comprende además concentrar la proteína terapéutica conjugada mediante ultra/diafiltración (UF/DF).

Figura 1

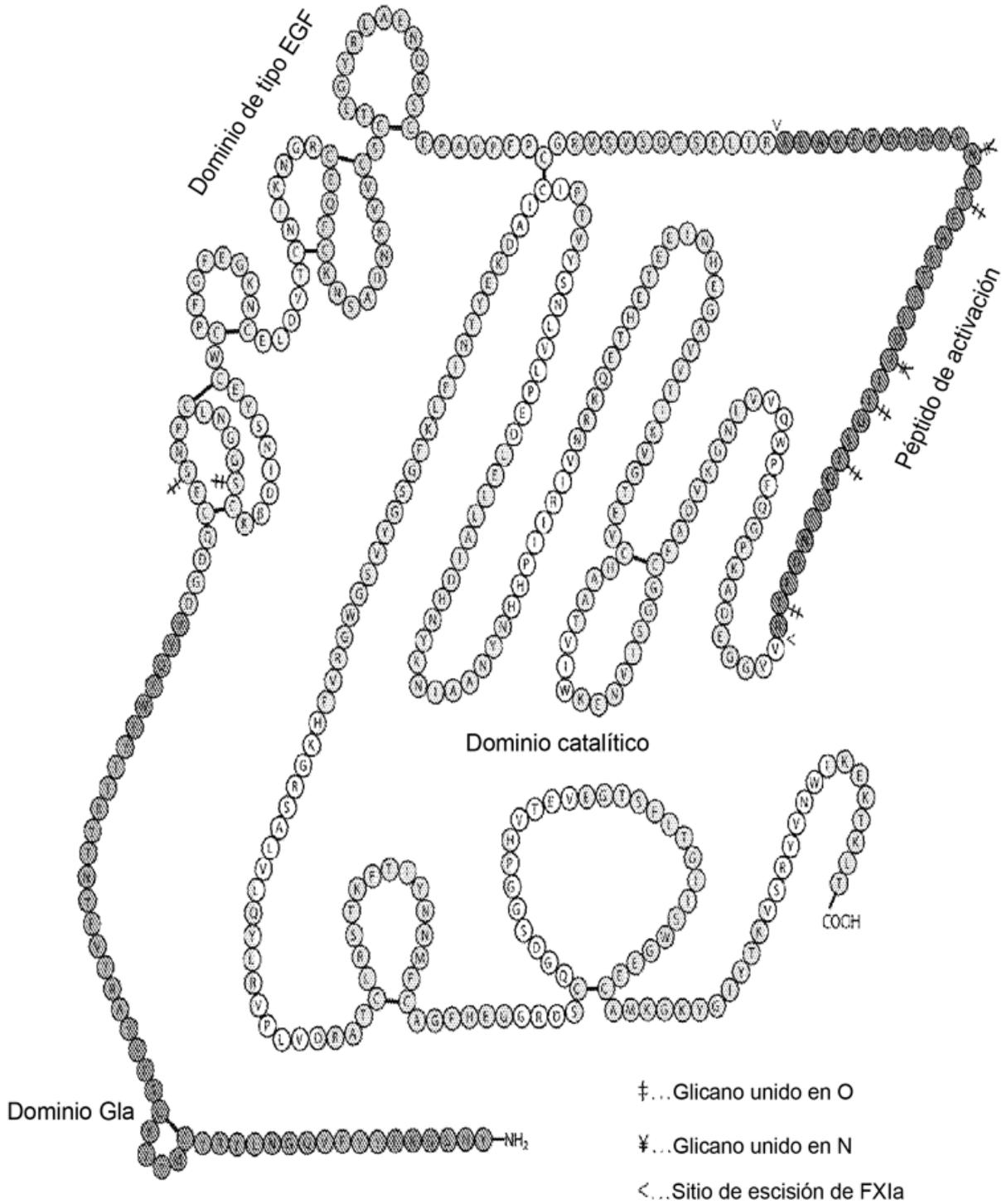


Figura 3

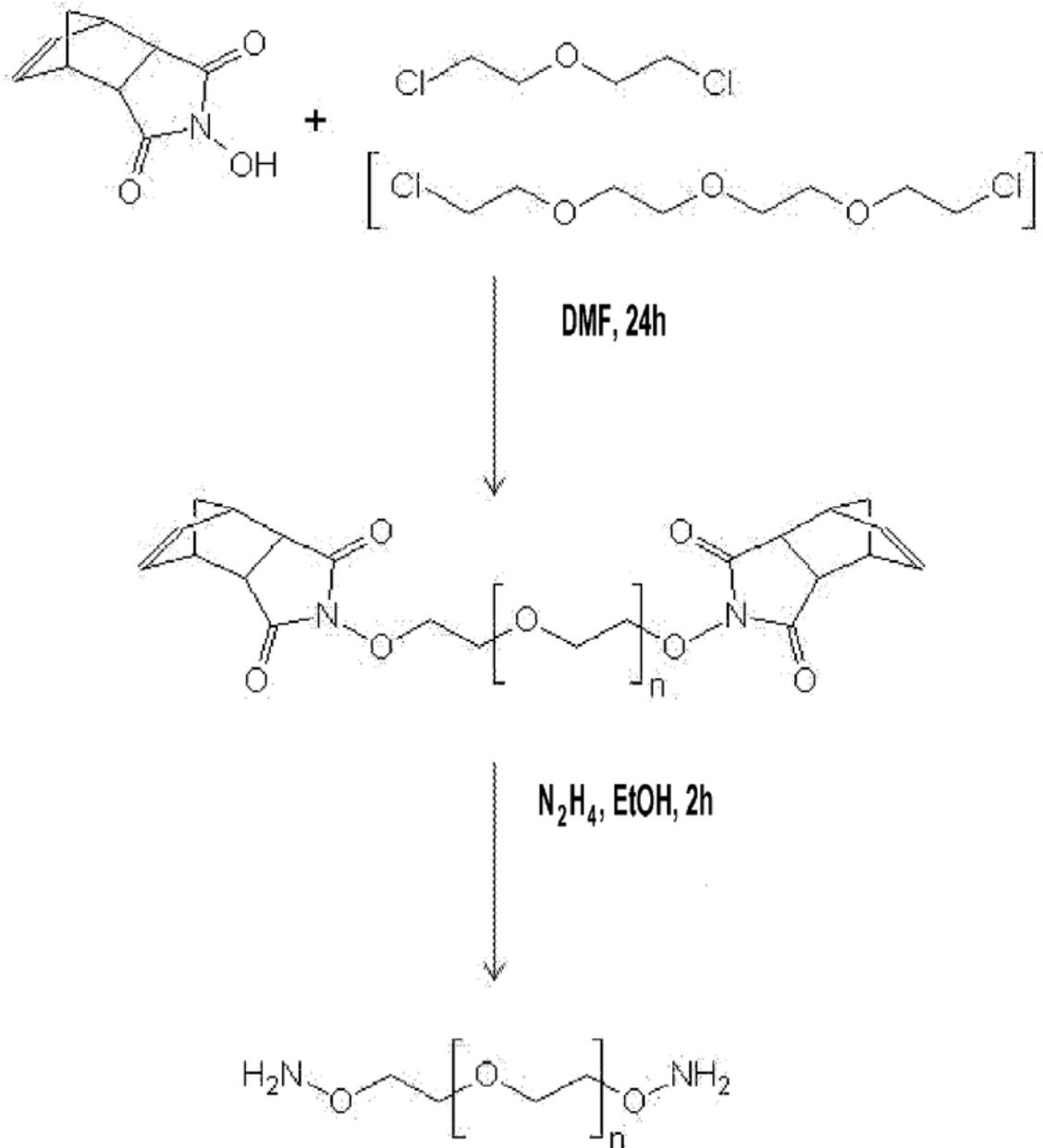
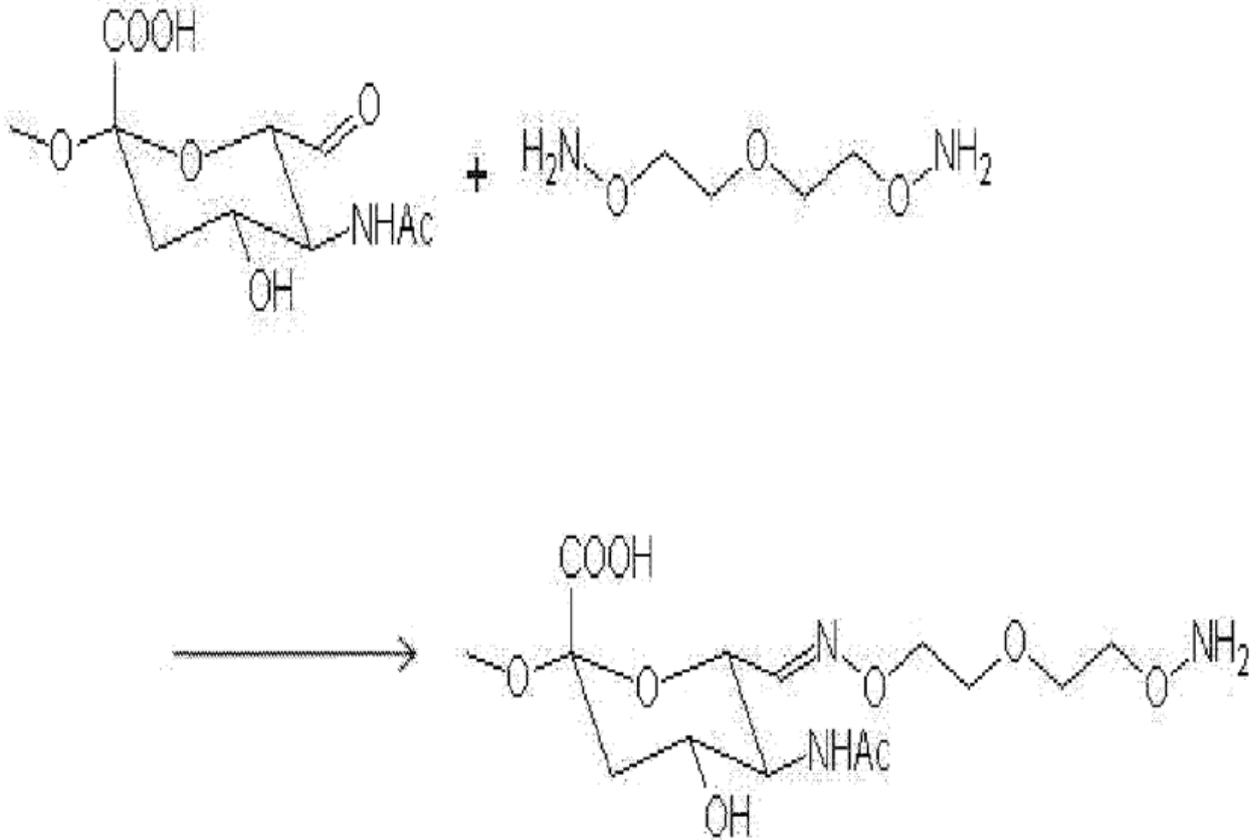


Figura 4



Etapas de reducción para estabilizar

la base de Schiff:

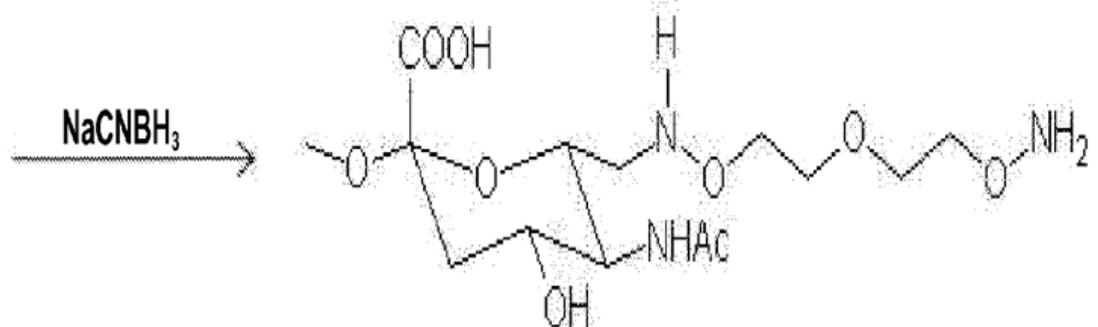


Figura 5A

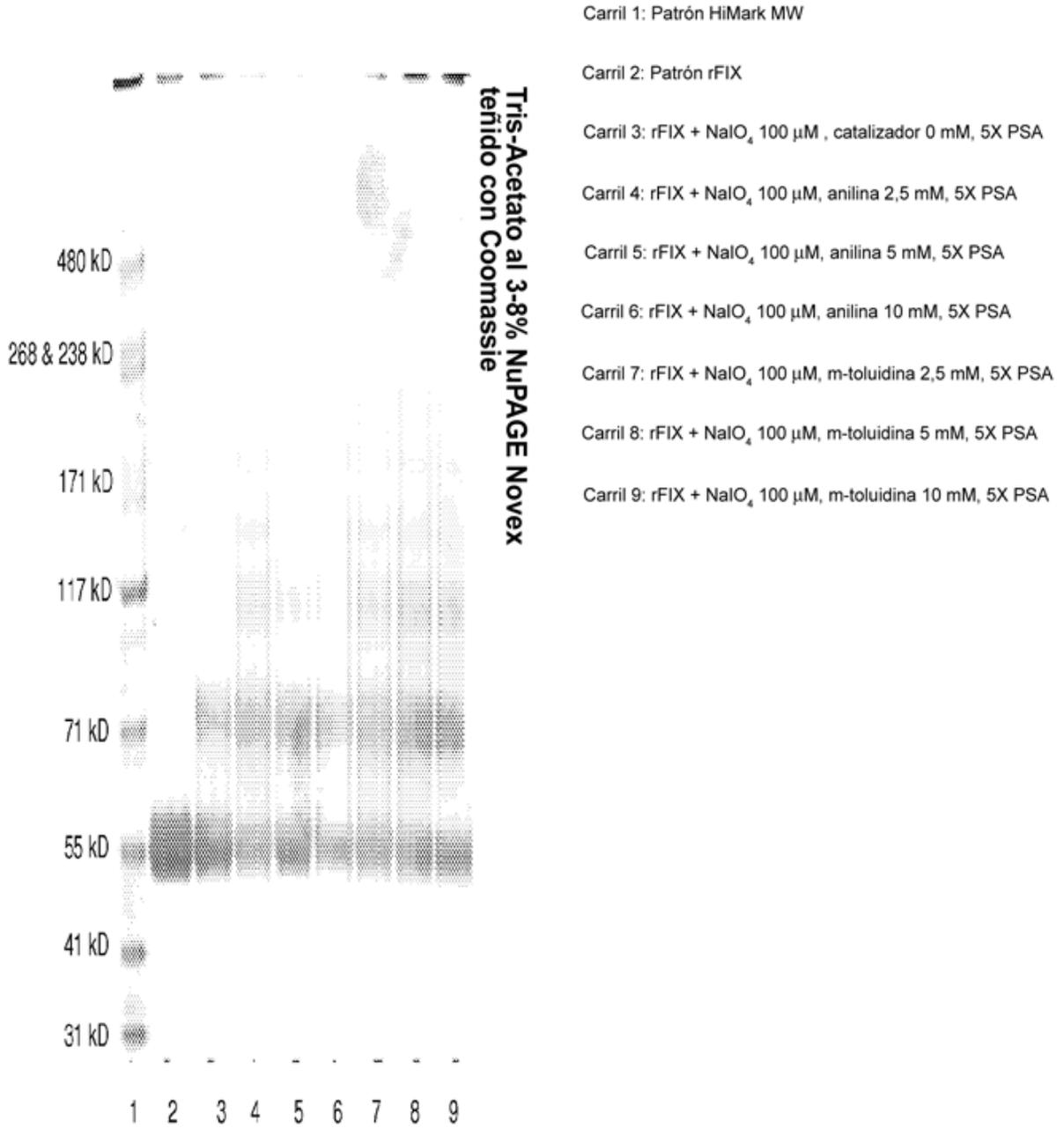


Figura 5B

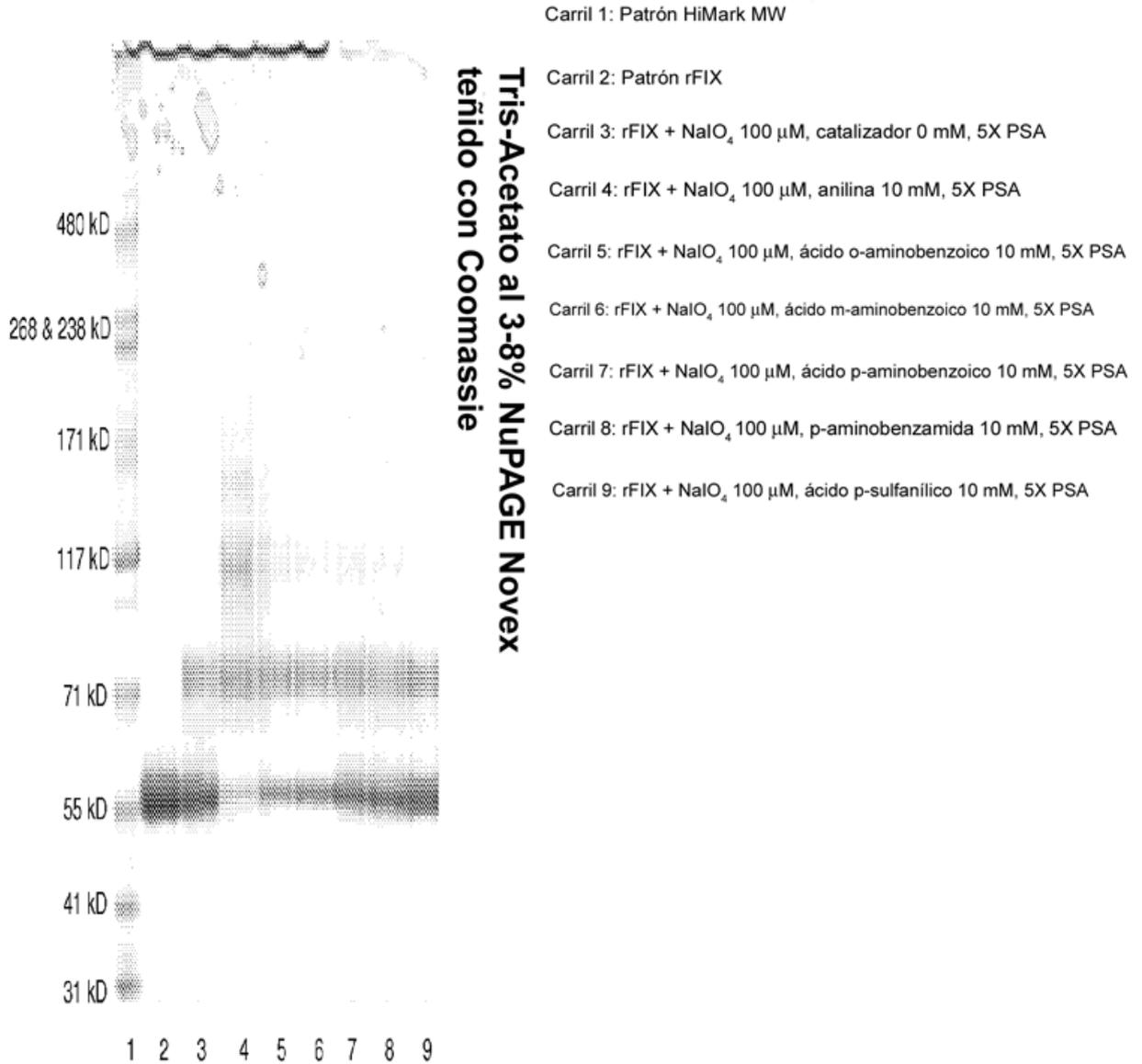
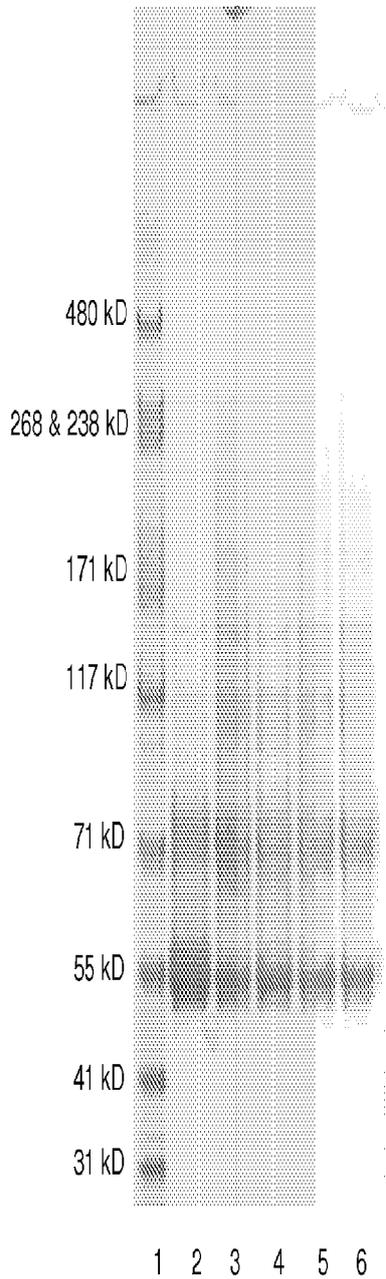


Figura 5C



**Tris-Acetato al 3-8% NUPAGE Novex
teñido con Coomassie**

Carril 1: Patrón Himark MW

Carril 2: rFIX + NaIO₄ 100 μM, catalizador 0 mM, 5X PSA

Carril 3: rFIX + NaIO₄ 100 μM, anilina 10 mM, 5X PSA

Carril 4: rFIX + NaIO₄ 100 μM, o-anisidina 10 mM, 5X PSA

Carril 5: rFIX + NaIO₄ 100 μM, m-anisidina 10 mM, 5X PSA

Carril 6: rFIX + NaIO₄ 100 μM, m-toluidina 10 mM, 5X PSA

Figura 6

