

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 983**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 47/60 (2007.01)

A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2011 PCT/US2011/065591**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12087838**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2011 E 11806103 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 2654794**

54 Título: **Materiales y métodos para conjugar un derivado de ácido graso soluble en agua con una proteína**

30 Prioridad:

22.12.2010 US 201061426356 P

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

07.01.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SIEKMANN, JUERGEN;
SCHEINECKER, RICHARD;
ROTTENSTEINER, HANSPETER y
TURECEK, PETER**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 800 983 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

Materiales y métodos para conjugar un derivado de ácido graso soluble en agua con una proteína

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a materiales y métodos para conjugar un derivado de ácido graso soluble en agua con una proteína.

10 **Antecedentes de la invención**

Se han descrito una variedad moléculas y/o compuestos para conjugar con proteínas terapéuticas para aumentar la semivida de las proteínas terapéuticas conjugadas tras la administración a un paciente (Veronese FM y Mero A, *BioDrugs* 2008;22:315-29; Gregoriadis G *et al.*, *Int J Pharm* 2005; 300:125-30; y Shechter Y *et al.*; *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 2007; vol. 13 :105-17).

Los ácidos grasos (FA, por sus siglas en inglés) pueden conjugarse con proteínas terapéuticas para formar derivados de acción más prolongada. Este principio para la prolongación de la semivida de proteínas o péptidos se basa en el hecho de que el FA puede unirse a albúmina sérica humana (HSA; también denominada sondas de unión a albúmina). La asociación de un FA con albúmina sérica humana en el torrente circulatorio puede conducir a una prolongación sustancial de la semivida de la proteína terapéutica ya que se reciclará junto con la albúmina a través del receptor Fc neonatal. El FA y derivados del mismo (por ejemplo, ésteres metílicos correspondiente) ha mostrado propiedades de unión a albúmina similares (Spector AA, *J Lipid Res* 1975;16:165-79).

Un ejemplo destacado para este principio de acción prolongada es insulina detemir (Levemir®) de Novo Nordisk. En insulina detemir, el grupo carboxilo de un FA se acopla de manera covalente al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la proteína de insulina (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.866.538; US 6.011.007; y US 6.869.930). Otros grupos de investigación han descrito enfoques similares (Shechter Y *et al.*, *Bioconj Chem* 2005;16:913-20; y Sasson K *et al.*, *J Control Release* 2010;142:214-20). Por ejemplo, estos grupos describen un sistema FMOC liberable que contiene un éster de NHS activo para acoplar a grupos amino de proteínas. Sin embargo, la diferencia es que en este concepto el FA se une a la proteína a través de un grupo funcional en posición ω convirtiéndose así en grupo carboxilo en intacto. Por tanto, pueden prepararse profármacos de acción prolongada que se unen a albúmina sérica humana, pero se disocian a lo largo del tiempo a medida que el sistema FMOC experimenta baja hidrólisis en condiciones fisiológicas (Sasson K *et al.*, *J Control Release* 2010;142:214-20).

Además de los ácidos grasos, la preparación de conjugados formando una unión covalente entre el polímero soluble en agua y la proteína terapéutica puede llevarse a cabo por 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 procedimiento de pegilación une unidades de repetición de etilenglicol (polietilenglicol (PEG)) a un fármaco polipeptídico. Las moléculas de PEG tienen un gran volumen hidrodinámico (5-10 veces el tamaño de las proteínas globulares), son muy solubles en agua e hidratadas, no tóxicas, no inmunógenas y se someten a aclaramiento rápidamente del cuerpo. La pegilación de moléculas puede conducir a resistencia aumentada de los fármacos a la degradación enzimática, semivida aumentada *in vivo*, frecuencia de dosificación reducida, inmunogenicidad disminuida, estabilidad física y térmica aumentada, solubilidad aumentada, estabilidad en fase líquida aumentada y agregación reducida. Los primeros fármacos pegilados se aprobaron por la FDA a principios de la década de 1990. Desde entonces, la FDA ha aprobado varios fármacos pegilados para administración oral, inyectable y tópica.

El poli(ácido siálico) (PSA, por sus siglas en inglés), también denominado ácido colomínico (CA, por sus siglas en inglés), es un polisacárido que se produce de manera natural. Es un homopolímero del ácido N-acetilneuramínico con una unión cetosídica $\alpha(2\rightarrow8)$ contiene grupos diol vecinos como 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). Ya que el PSA producido de manera bacteriana es química e inmunológicamente idéntico al PSA producido en el cuerpo humano, el PSA bacteriano no es inmunógeno, incluso cuando se acopla a proteínas. A diferencia de algunos polímeros, el ácido PSA es biodegradable. El acoplamiento covalente del ácido colomínico a la 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).

El acoplamiento de derivados de PEG a péptidos o proteínas fue revisado por Roberts *et al.* (*Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 459-76). Un enfoque para acoplar polímeros solubles en agua a proteínas terapéuticas es la conjugación de los polímeros a través de los restos de hidratos de carbono de la proteína. Los grupos hidroxilo (OH) vecinos de hidratos de carbono en las proteínas pueden oxidarse fácilmente con peryodato de sodio (NaIO₄) para formar grupos aldehído activos (Rothfus y Smith, *J Biol Chem* 1963; 238: 1402-10; van Lenten y 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 uniones oxima (documentos WO 96/40662, WO2008/025856).

5 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 hidratos de carbono en el factor de von Willebrand y el posterior acoplamiento al PEG usando química de hidrazida; la publicación de patente estadounidense n.º 2009/0076237 que enseña la oxidación de rFVIII y el posterior acoplamiento a PEG y otros polímeros solubles en agua (por ejemplo, PSA, HES, dextrano) usando química de hidrazida; el documento WO
10 2008/025856 que enseña la oxidación de diferentes factores de coagulación, por ejemplo, rFIX, FVIII y FVIIa y el acoplamiento posterior a, por ejemplo, PEG, usando química de aminoóxilo formando una unión oxima; la patente estadounidense n.º 5.621.039 que enseña la oxidación de FIX y el posterior acoplamiento a PEG usando química de hidrazida.

15 El documento WO2005117984 A2 que se refiere a un compuesto de unión a albúmina que comprende un grupo espaciador, un grupo de unión en puente soluble en agua, una cadena de ácido graso y un grupo ácido, caracterizado porque el grupo ácido se une al extremo distal de la cadena de ácido graso; y el documento WO2006084319 A1 que se refiere a moléculas inmunógenas autoadyuvantes capaces de estimular una respuesta inmunitaria a los epítomos de un polipéptido independientemente del tipo de HLA de un sujeto.

20 A pesar de los materiales y métodos anteriores para la conjugación de proteínas, se desean nuevos materiales y métodos que, por ejemplo, permitan la manipulación y preparación de conjugados de proteínas estables. Aunque los ácidos grasos pueden proporcionar el beneficio de unirse a HSA, los ácidos grasos a menudo son difíciles de manipular en un entorno acuoso y pueden liberarse o eliminarse de su compañero de unión a proteínas a lo largo del tiempo.

25 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona materiales y métodos para conjugar polímeros y derivados de ácido graso solubles en agua con proteínas lo que mejora las propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas de la proteína mientras
30 que minimiza los costes asociados con los diversos reactivos y los riesgos para la salud a los pacientes receptores cuando la reacción de conjugación está catalizada por un catalizador nucleófilo. La presente invención proporciona materiales y métodos para conjugar derivados de ácido graso solubles en agua con proteínas en una disolución acuosa, produciendo así conjugados de proteínas estables en la que los derivados de ácidos grasos no se liberan a lo largo del tiempo.

35 En una realización de la presente invención, se proporciona un conjugado de un derivado de ácido graso soluble en agua y una proteína terapéutica, en la que el derivado de ácido graso soluble en agua comprende un ácido graso o éster de ácido graso unido a un ligador soluble en agua, y en la que el derivado de ácido graso se une de manera estable a la proteína terapéutica por una unión oxima formada entre un grupo aminoóxilo en el ligador soluble en agua
40 y un grupo aldehído de un hidrato de carbono oxidado en la proteína terapéutica. En otra realización, el conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica se une a albúmina sérica humana (HSA) *in vitro* o *in vivo*. En todavía otra realización, el conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica tiene una semivida aumentada en relación con una proteína terapéutica nativa. En aún otra realización, un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica mencionado anteriormente comprende un ácido graso saturado o ácido graso insaturado. En una
45 realización relacionada, el ácido graso es un ácido graso saturado. En aún otra realización, el ácido graso es un ácido graso de cadena ramificada.

Se contemplan diversas longitudes de ácidos grasos en el conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica. En una realización, se proporciona un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica mencionado
50 anteriormente en el que el ácido graso comprende una longitud de cadena entre C10 y C24, incluyendo ácidos grasos sintéticos con números impares de carbonos. En una realización, se proporciona un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica mencionado anteriormente en el que el ácido graso comprende una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en: C10, C12, C14, C16, C18, C20, C20, C22 y C24. En otra realización, el ácido graso tiene una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en C14, C16 y C18. En todavía otra, el ácido
55 graso tiene una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en C13, C15 y C17.

En todavía otra realización, se proporciona un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica mencionado anteriormente en el que el ácido graso se une al ligador soluble en agua en un grupo en el ácido graso seleccionado del grupo que consiste en: grupo carboxilo terminal y grupo ω . En otra realización, el ácido graso se une al ligador
60 soluble en agua en el grupo ω . En todavía otra realización, el grupo ω se selecciona del grupo que consiste en: hidroxilo, amino, tio y carboxilo.

En una realización de la presente invención, se proporciona un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica mencionado anteriormente en el que el ácido graso es ácido 16-hidroxihexadecanoico.

65 En otra realización, se proporciona un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica en el que el éster de

ácido graso se selecciona del grupo que consiste en: éster metílico y éster etílico. En una realización, el éster de ácido graso es éster metílico del ácido 16-hidroxihexadecanoico.

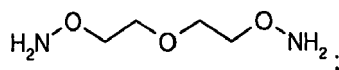
5 Se contemplan diversos ligadores solubles en agua en la presente invención. En una realización, se proporciona un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica mencionado anteriormente en el que el ligador soluble en agua comprende un polímero soluble en agua y al menos un grupo funcional unido a la proteína terapéutica.

El grupo funcional es un grupo aminoóxido.

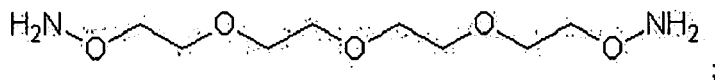
10 Se contemplan numerosos polímeros solubles en agua en la presente invención. En una realización, se proporciona un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica mencionado anteriormente en el que el polímero soluble en agua, que es parte integral del ligador, se selecciona del grupo que consiste en: polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, poli(ácido siálico) (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, carboximetildextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolina, poli(acrililormorfolina), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico y poli(1-hidroximetil-etil-hidroximetil-formal) (PHF). En todavía otra realización, el polímero soluble en agua es PEG. También se contemplan diversas longitudes de polímeros solubles en agua en el presente documento. En una realización, se proporciona un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica en el que el polímero soluble en agua comprende una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en O3, O5, O7, O9, O11, O13 y O15.

En una realización, se proporciona un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica en el que el ligador soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en:

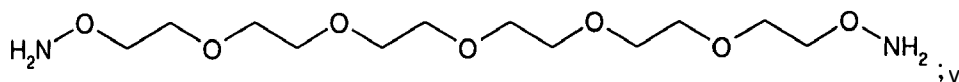
25 3-oxapentano-1,5-dioxiamina



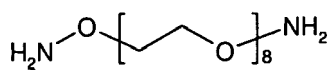
30 3,6,9-trioxaundecano-1,11-dioxiamina;



35 3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecano-1,17-dioxiamina;



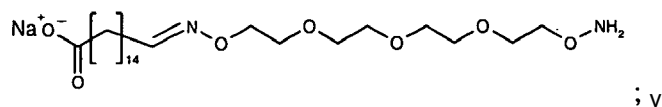
3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosano-1,23-dioxiamina



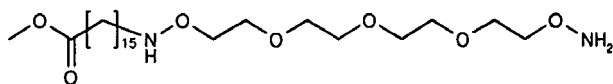
40 Se proporciona un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica en el que el derivado de ácido graso se une de manera estable a la proteína terapéutica por una unión oxima. La unión oxima se forma entre un grupo aminoóxido en el ligador soluble en agua y un grupo aldehído de un hidrato de carbono oxidado en la proteína terapéutica.

En una realización de la invención, se proporciona un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica en el que el derivado de ácido graso se selecciona del grupo que consiste en:

50 a) sal de sodio del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiimino)-hexadecanoico de la fórmula:



b) éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexadecanoico,



Se contemplan diversas proteínas terapéuticas en la presente invención. En una realización, se proporciona un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica mencionado anteriormente 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, tromboplastina tisular (TF), proteasa ADAMTS 13, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor estimulante de colonias 1 (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 similar a angiopoyetina 1 (ANGPTL1), polipéptido similar a angiopoyetina 2 (ANGPTL2), polipéptido similar a angiopoyetina 3 (ANGPTL3), polipéptido similar a angiopoyetina 4 (ANGPTL4), polipéptido similar a angiopoyetina 5 (ANGPTL5), polipéptido similar a angiopoyetina 6 (ANGPTL6), polipéptido similar a angiopoyetina 7 (ANGPTL7), vitronectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína morfogénica ósea 1, proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 3, proteína morfogénica ósea 4, proteína morfogénica ósea 5, proteína morfogénica ósea 6, proteína morfogénica ósea 7, proteína morfogénica ósea 8, proteína morfogénica ósea 9, proteína morfogénica ósea 10, proteína morfogénica ósea 11, proteína morfogénica ósea 12, proteína morfogénica ósea 13, proteína morfogénica ósea 14, proteína morfogénica ósea 15, receptor IA de proteínas morfogénicas óseas, receptor IB de proteínas morfogénicas óseas, receptor II de proteínas morfogénicas óseas, factor neurotrófico derivado del cerebro, cardiotrofina 1, factor neurotrófico ciliar, receptor del factor neurotrófico ciliar, cripto, criptico, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 1, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 α , factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 β , factor de crecimiento de células endoteliales β , endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, Epirregulina, factor quimiotáctico para neutrófilos derivado de células epiteliales, factor de crecimiento de fibroblastos 4, factor de crecimiento de fibroblastos 5, factor de crecimiento de fibroblastos 6, factor de crecimiento de fibroblastos 7, factor de crecimiento de fibroblastos 8, factor de crecimiento de fibroblastos 8b, factor de crecimiento de fibroblastos 8c, factor de crecimiento de fibroblastos 9, factor de crecimiento de fibroblastos 10, factor de crecimiento de fibroblastos 11, factor de crecimiento de fibroblastos 12, factor de crecimiento de fibroblastos 13, factor de crecimiento de fibroblastos 16, factor de crecimiento de fibroblastos 17, factor de crecimiento de fibroblastos 19, factor de crecimiento de fibroblastos 20, factor de crecimiento de fibroblastos 21, factor de crecimiento ácido de fibroblastos, factor de crecimiento básico de fibroblastos, receptor α 1 del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, receptor α 2 del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, proteína relacionada con el crecimiento, proteína relacionada con el crecimiento α , proteína relacionada con el crecimiento β , proteína relacionada con el crecimiento γ , factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado del hepatoma, factor de crecimiento similar a la insulina I, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento similar a la insulina II, proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de la leucemia, receptor α del factor inhibidor de la leucemia, factor de crecimiento nervioso receptor del factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina 3, neurotrofina 4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento placentario 2, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas AA, factor de crecimiento derivado de plaquetas AB, cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor del factor de células madre, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, factor de crecimiento transformante α , factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento transformante β 1, factor de crecimiento transformante β 1.2, factor de crecimiento transformante β 2, factor de crecimiento transformante β 3, factor de crecimiento transformante β 5, factor de crecimiento transformante latente β 1, proteína I de unión al factor de crecimiento transformante β , proteína II de unión al factor de crecimiento transformante β , proteína III de unión al factor de crecimiento transformante β , linfopoyetina estromal tímica (TSLP), receptor de tipo I del factor de necrosis tumoral, receptor de tipo II del factor de necrosis tumoral, receptor del activador del plasminógeno de tipo urocinasa, proteína de activación de fosfolipasas (PUP), insulina, lectina, ricina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona foliculoestimulante, hormona estimulante del tiroides, activador tisular del plasminógeno, IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, α -galactosidasa, β -galactosidasa, ADNasa, fetuína, hormona luteinizante, estrógeno, albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, transferrina, trombopoyetina, urocinasa, integrina, trombina, leptina, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanercept), una proteína en la tabla 1, o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo de la misma. En otra realización, la proteína terapéutica es FVIIa. En aún otra realización, la proteína terapéutica es FVIII. En todavía otra realización, la proteína terapéutica es FIX.

También se divulga un conjugado derivado de ácido graso-proteína terapéutica en el que el derivado de ácido graso se une de manera estable a la proteína terapéutica por un grupo maleimida en el ligador soluble en agua a un grupo sulfhidrilo libre en la proteína terapéutica. En todavía otra realización, el derivado de ácido graso se une de manera estable a la proteína terapéutica por un éster de N-hidroxisuccinimida en el ligador soluble en agua a un grupo amino

libre en la proteína terapéutica.

También se contemplan métodos de preparación de derivados de ácidos grasos en la presente invención. En una realización, se proporciona un método de preparación de un derivado de ácido graso descrito en el presente documento que comprende: a) oxidar un grupo ω -hidroxilo en un ácido graso para generar un grupo aldehído en el ácido graso; y b) acoplar un ligador soluble en agua que comprende un grupo aminooxilo activo al grupo aldehído para formar una unión oxima estable, en el que el derivado de ácido graso es soluble en agua. En una realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el grupo ω -hidroxilo se oxida por un reactivo de oxidación seleccionado del grupo que consiste en: reactivo de peryodinano de Dess Martin, reactivo Tempo, oxidación Swern con cloruro de oxalilo/DMSO, perrutenato de tetrapropilamonio (TPAP), reactivos de cromo VI tales como reactivo de Collins, clorocromato de piridinio (PCC) y dicromato de piridinio. En todavía otra realización, el reactivo de oxidación es peryodinano de Dess Martin.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el ácido graso es un ácido graso saturado o ácido graso insaturado. En todavía otra realización, el ácido graso es un ácido graso saturado.

En aún otra realización de la invención, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el ácido graso es un ácido graso de cadena ramificada.

Según otra realización, también se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el ácido graso comprende una longitud de cadena entre C10 y C24, incluyendo ácidos grasos sintéticos con números impares de carbonos. En una realización, se proporciona un derivado de ácido graso mencionado anteriormente en el que el ácido graso comprende una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en: C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 y C24. En otra realización, el ácido graso tiene una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en C14, C16 y C18. En todavía otra, el ácido graso tiene una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en C13, C15 y C17.

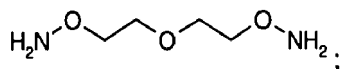
En todavía otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el ligador soluble en agua comprende un polímero soluble en agua y al menos un grupo aminooxilo.

Se contemplan numerosos polímeros solubles en agua en la presente invención para su uso en un método mencionado anteriormente. En una realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en: polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, poli(ácido siálico) (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, carboximetildextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolina, poli(acrilil morfolina), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico y poli(1-hidroximetil-etileno-hidroximetilformal) (PHF). En una realización, el polímero soluble en agua es PEG.

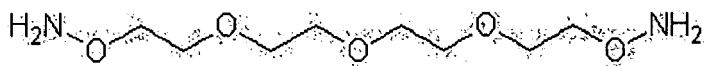
También se contemplan diversas longitudes de polímeros solubles en agua. En una realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el polímero soluble en agua comprende una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en O5, O7, O9, O11, O13 y O15.

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

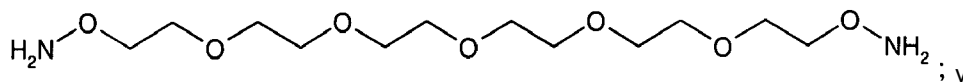
a) 3-oxapentano-1,5-dioxiamina de fórmula:



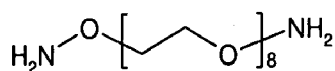
b) 3,6,9-trioxaundecano-1,11-dioxiamina de fórmula:



c) 3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecano-1,17-dioxiamina de fórmula:

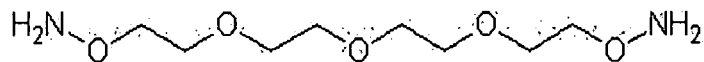


d) 3,6,9,12,15,18,21-heptaotricosano-1,23-dioxiamina de fórmula:



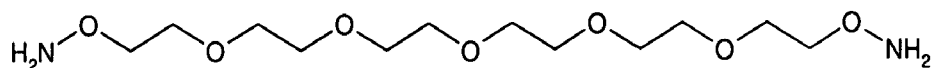
En aún otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el ligador soluble en agua es 3,6,9-trioxaundecano-1,11-dioxiamina de fórmula:

5



En todavía otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el ligador soluble en agua es 3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecano-1,17-dioxiamina de fórmula:

10



Se contemplan todavía otros métodos para elaborar los derivados de ácidos grasos en el presente documento. En una realización, se proporciona un método de preparación de un derivado de ácido graso mencionado anteriormente que comprende: a) esterificar un grupo carboxilo en un ácido graso para generar un éster en el ácido graso; b) activar un grupo ω -hidroxilo en un ácido graso mediante la introducción de un grupo mesilo en el ácido graso de la etapa a); y c) acoplar un ligador soluble en agua que comprende un grupo aminooxilo activo sustituyendo el grupo mesilo de la etapa b) formándose así un enlace oxiamina-metileno estable; en el que el derivado de ácido graso es soluble en agua.

15

En una realización, se proporciona lo mencionado anteriormente en el que el grupo carboxilo se esterifica por un agente de esterificación seleccionado del grupo que consiste en: cloruro de acetilo, metanol en presencia de ácido, etanol en presencia de ácido, diazometano y yoduro de metilo. En otra realización, el agente de esterificación es cloruro de acetilo.

20

En todavía otra realización, se proporciona lo mencionado anteriormente en el que el grupo ω -hidroxilo se activa por un agente de activación seleccionado del grupo que consiste en: cloruro de mesilo, cloruro de tosilo y cloruro de nosilo. En una realización, el agente de activación es cloruro de mesilo.

25

Se contemplan diversos ácidos grasos para su uso en el método mencionado anteriormente. En una realización, se proporciona lo mencionado anteriormente en el que el ácido graso es un ácido graso saturado o ácido graso insaturado. En otra realización, el ácido graso es un ácido graso saturado. En aún otra realización, el ácido graso es un ácido graso de cadena ramificada.

30

En todavía otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el ácido graso comprende una longitud de cadena entre C10 y C24, incluyendo ácidos grasos sintéticos con números impares de carbonos. En una realización, se proporciona un derivado de ácido graso mencionado anteriormente en el que el ácido graso comprende una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en: C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 y C24. En otra realización, el ácido graso tiene una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en C14, C16 y C18. En todavía otra, el ácido graso tiene una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en C13, C15 y C17.

35

También se contemplan diversos polímeros solubles en agua para su uso en el método mencionado anteriormente. En una realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el ligador soluble en agua comprende un polímero soluble en agua y al menos un grupo aminooxilo. En otra realización, el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en: polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, poli(ácido siálico) (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, carboximetildextrano, poli(óxido de alquilen) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolina, poli(acrilil morfolina), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico, y poli(1-hidroximetil etil en hidroximetil formal) (PHF). En otra realización, el polímero soluble en agua es PEG.

45

En todavía otra realización de la invención, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el polímero soluble en agua comprende una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en O3, O5, O7, O9, O11, O13 y O15. En otra realización, el ligador soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en:

50

También se contemplan métodos de preparación de proteínas conjugadas en la presente invención. En una realización, se proporciona un método de preparación de una proteína terapéutica conjugada que comprende poner en contacto un resto de hidrato de carbono oxidado en la proteína terapéutica con un derivado de ácido graso mencionado anteriormente (o un polímero soluble en agua tal como se describe en el presente documento) en

55

60

condiciones que permitan la conjugación; el resto de hidrato de carbono oxidado por 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 una unión oxima entre el resto de hidrato de carbono oxidado y el grupo aminoóxilo activo en el derivado de ácido graso; y en el que la formación de unión oxima se cataliza por un catalizador nucleófilo seleccionado del grupo que consiste en ácido o-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido sulfanílico, o-aminobenzamida, o-toluidina, m-toluidina, p-toluidina, o-anisidina, m-anisidina y p-anisidina.

En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente 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, tromboplastina tisular (TF), proteasa ADAMTS 13, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor estimulante de colonias 1 (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 similar a angiopoyetina 1 (ANGPTL1), polipéptido similar a angiopoyetina 2 (ANGPTL2), polipéptido similar a angiopoyetina 3 (ANGPTL3), polipéptido similar a angiopoyetina 4 (ANGPTL4), polipéptido similar a angiopoyetina 5 (ANGPTL5), polipéptido similar a angiopoyetina 6 (ANGPTL6), polipéptido similar a angiopoyetina 7 (ANGPTL7), vitronectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína morfogénica ósea 1, proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 3, proteína morfogénica ósea 4, proteína morfogénica ósea 5, proteína morfogénica ósea 6, proteína morfogénica ósea 7, proteína morfogénica ósea 8, proteína morfogénica ósea 9, proteína morfogénica ósea 10, proteína morfogénica ósea 11, proteína morfogénica ósea 12, proteína morfogénica ósea 13, proteína morfogénica ósea 14, proteína morfogénica ósea 15, receptor IA de proteínas morfogénicas óseas, receptor IB de proteínas morfogénicas óseas, receptor II de proteínas morfogénicas óseas, factor neurotrófico derivado del cerebro, cardiotrofina 1, factor neurotrófico ciliar, receptor del factor neurotrófico ciliar, cripto, críptico, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 1, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 α , factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 β , factor de crecimiento de células endoteliales β , endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, Epigen, epirregulina, factor quimiotáctico para neutrófilos derivado de células epiteliales, factor de crecimiento de fibroblastos 4, factor de crecimiento de fibroblastos 5, factor de crecimiento de fibroblastos 6, factor de crecimiento de fibroblastos 7, factor de crecimiento de fibroblastos 8, factor de crecimiento de fibroblastos 8b, factor de crecimiento de fibroblastos 8c, factor de crecimiento de fibroblastos 9, factor de crecimiento de fibroblastos 10, factor de crecimiento de fibroblastos 11, factor de crecimiento de fibroblastos 12, factor de crecimiento de fibroblastos 13, factor de crecimiento de fibroblastos 16, factor de crecimiento de fibroblastos 17, factor de crecimiento de fibroblastos 19, factor de crecimiento de fibroblastos 20, factor de crecimiento de fibroblastos 21, factor de crecimiento ácido de fibroblastos, factor de crecimiento básico de fibroblastos, receptor α 1 del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, receptor α 2 del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, proteína relacionada con el crecimiento, proteína relacionada con el crecimiento α , proteína relacionada con el crecimiento β , proteína relacionada con el crecimiento γ , factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado del hepatoma, factor de crecimiento similar a la insulina I, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento similar a la insulina II, proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de la leucemia, receptor α del factor inhibidor de la leucemia, factor de crecimiento nervioso, receptor del factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina 3, neurotrofina 4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento placentario 2, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas AA, factor de crecimiento derivado de plaquetas AB, cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor del factor de células madre, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, factor de crecimiento transformante α , factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento transformante β 1, factor de crecimiento transformante β 1.2, factor de crecimiento transformante β 2, factor de crecimiento transformante β 3, factor de crecimiento transformante β 5, factor de crecimiento transformante latente β 1, proteína I de unión al factor de crecimiento transformante β , proteína II de unión al factor de crecimiento transformante β , proteína III de unión al factor de crecimiento transformante β , linfopoyetina estromal tímica (TSLP), receptor de tipo I del factor de necrosis tumoral, receptor de tipo II del factor de necrosis tumoral, receptor del activador del plasminógeno de tipo urocinasa, proteína de activación de fosfolipasas (PUP), insulina, lectina, ricina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona foliculoestimulante, hormona estimulante del tiroides, activador tisular del plasminógeno, IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, α -galactosidasa, β -galactosidasa, ADNasa, fetuína, hormona luteinizante, estrógeno, albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, transferrina, trombopoyetina, urocinasa, integrina, trombina, leptina, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanercept), una proteína en la tabla 1, o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo de la misma.

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

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

5 En todavía otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el agente oxidante es peryodato de sodio (NaIO₄). En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el catalizador nucleófilo es m-toluidina.

10 En aún otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente que comprende además purificar la proteína terapéutica conjugada.

En todavía otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el derivado de ácido graso se prepara mediante un método tal como se describe en el presente documento.

15 Se contemplan todavía otros métodos de preparación de derivados de ácidos grasos en la presente divulgación. En una realización, se proporciona un método de preparación de un derivado de ácido graso mencionado anteriormente que comprende: a) esterificar un grupo carboxilo en un ácido graso para generar un éster en el ácido graso; y b) acoplar un ligador soluble en agua que comprende un grupo maleimida activo a un grupo sulfhidrilo (SH) libre, formándose así un enlace tioéter estable; en el que el derivado de ácido graso es soluble en agua.

20 En todavía otra realización de la presente divulgación, se proporciona un método de preparación de un derivado de ácido graso mencionado anteriormente que comprende: a) esterificar un grupo carboxilo en un ácido graso para generar éster de ácido graso; b) hacer reaccionar el ácido graso resultante de la etapa a) con un reactivo de azida produciendo así una azida de ácido graso correspondiente; c) hidrogenar la azida de ácido graso de la etapa b) para producir una amina de ácido graso correspondiente; y d) acoplar un ligador soluble en agua que comprende un grupo NHS activo a un grupo amina libre, formando así un enlace estable; en el que el derivado de ácido graso es soluble en agua.

Figuras

30 La figura 1 muestra la síntesis del ligador soluble en agua 3-oxapentano-1,5-dioxiamina.

Descripción detallada de la invención

35 Las propiedades farmacológicas e inmunológicas de las proteínas terapéuticas pueden mejorarse mediante modificación y conjugación química con compuestos poliméricos tales como ácidos grasos y derivados de ácidos grasos según la presente invención.

40 La adición de un derivado de ácido graso soluble en agua tal como se describe en el presente documento es un enfoque para mejorar las propiedades de proteínas terapéuticas tales como las proteínas de la coagulación sanguínea 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, tromboplastina tisular (TF) o proteasa ADAMTS 13, así como otras proteínas conocidas o fragmentos biológicamente/terapéuticamente activos de las mismas.

45 Proteínas terapéuticas

50 En determinadas realizaciones de la invención, los polipéptidos y polinucleótidos mencionados anteriormente se ejemplifican por las siguientes proteínas terapéuticas: enzimas, antígenos, anticuerpos, receptores, proteínas de coagulación sanguínea, factores de crecimiento, hormonas y ligandos. En determinadas realizaciones, la proteína terapéutica es una proteína de 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, tromboplastina tisular (TF) o proteasa ADAMTS 13.

55 En determinadas realizaciones, la proteína terapéutica es inmunoglobulinas, citocinas tales como IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor estimulante de colonias 1 (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 similares a angiopoyetinas humanos ANGPTL1 a 7, vitronectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína morfogénica ósea 1, proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 3, proteína morfogénica ósea 4, proteína morfogénica ósea 5, proteína morfogénica ósea 6, proteína morfogénica ósea 7, proteína morfogénica ósea 8, proteína morfogénica ósea 9, proteína morfogénica ósea 10, proteína morfogénica ósea 11, proteína morfogénica ósea 12, proteína morfogénica ósea 13, proteína morfogénica ósea 14, proteína morfogénica ósea 15, receptor IA de proteínas morfogénicas óseas, receptor IB de proteínas morfogénicas óseas, receptor II de proteínas morfogénicas óseas, factor neurotrófico derivado del cerebro, cardiotrofina 1, factor neurotrófico ciliar, receptor del factor neurotrófico ciliar, cripto, críptico, factor quimiotáctico de

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

En determinadas realizaciones, la proteína terapéutica es interferones alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonias incluyendo factores estimulante de colonias de granulocitos, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de plaquetas, proteína de activación de fosfolipasas (PUP), insulina, proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas, factores de necrosis tumoral y alelos relacionados, formas solubles de receptores de los factores de necrosis tumoral, receptores de interleucinas y formas solubles de receptores de interleucinas, 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 antidiuréticas, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona foliculoestimulante, hormona estimulante del tiroides, activador tisular del plasminógeno 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, trombopoyetina, urocinasa, ADNasa, integrinas, trombina, factores de crecimiento hematopoyéticos, 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 las mismas. Además de las proteínas mencionadas anteriormente, la siguiente tabla 1 proporciona proteínas terapéuticas contempladas por la presente invención:

Tabla 1

Péptido secretado por células dendríticas foliculares Dermiquina	Enzima convertidora de angiotensina	Miembro 6 de la familia de interleucina 1	Herstatina
Proteína secretada relacionada con frizzled 1	Antitrombina III	Proteína expresada por la próstata y los testículos 2	Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 28
Ectodisplasina A	Apolipoproteína B-100	Fosfolipasa A2 secretora del grupo XIA	Proteína similar al extremo C-terminal de LRRN4
Proteína secretada relacionada con frizzled 2	Apolipoproteína D	Cadena alfa-3(V) del colágeno	Proteína que contiene el dominio Ly6/PLAUR 2
Resistina	Apolipoproteína E	Proteína similar a la alfa-2 macroglobulina 1	Proteína transmembrana 81
Osteopontina	Beta-1,4-galactosiltransferasa 1	Dermatopontina	Proteína similar a proteína mielina cero 3
Proteína secretada relacionada con frizzled 5	Proteína morfogenética ósea 7	Proteína asociada al cartilago	Homólogo de proteína notum
Proteína secretada relacionada con frizzled 4	Subunidad B del subcomponente C1q del complemento	Proteína Desert hedgehog	UDP-glucuronosiltransferasa 3A2
Fosfoproteína secretada 24	Cadena alfa de proteína de unión a C4b	Proteína de matriz extracelular 2	Protocadherina alfa-1
Glipicano 6	Calreticulina	Factor intrínseco gástrico	Fosfolipasa D4
Proteína secretada relacionada con frizzled 3	Globulina de unión a corticosteroides	Interleucina 33	Retinol deshidrogenasa 10
Quimiocina con motivo C-C 4	Carboxipeptidasa A1	Proteína morfogenética ósea 2	Lectina similar a Ig de unión a ácido siálico 14
Proteína de melanocitos Pmel 17	Carboxipeptidasa A2	Proteína morfogenética ósea 6	Proteína transmembrana 161A
Proteína secretada relacionada con Ly-6/uPAR 1	Eotaxina	Proteína no caracterizada KIAA0564	Proteína transmembrana 161B
Beta-microseminoproteína	Quimiocina con motivo C-C 13	Cerberus	Proteína transmembrana 182
Glipicano 4	Quimiocina con motivo C-C 18	Sulfotransferasa de hidratos de carbono 8	Proteína FAM24B
Miembro 15 de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral	Quimiocina con motivo C-C 20	Proteína asociada a contactina tipo 3	Proteína transmembrana 52
Resistina tipo beta	Receptor desencadenante expresado en células mieloides 2	Proteína similar a la fosfolipasa A2 del Grupo XIIB	Proteína que contiene el dominio de la superfamilia facilitadora principal 4
Miembro 12 de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral	Quimiocina con motivo C-C 2	Corticilberina	UDP-glucuronosiltransferasa 2A3
SPARC	Proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante beta	Desintegrina A y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 19	Proteína asociada a ameloblastos odontógenos
Glipicano 5	Ligando de CD40	Proteína UPF0556 tipo C19orf10	Proteína neurosecretora VGF
Homólogo de la proteína de gradiente anterior 2	Corneodesmosina	Quimiocina con motivo C-X-C 3	Fosfoproteína secretada 2, 24kDa
Homólogo de la proteína canopy 2	Factor D del complemento	Cistatina M	Proteína FAM150B
Glipicano 1	Cromogranina A	Defensina 5	Factor de crecimiento/diferenciación 9
Proteína que contiene dominio A del factor de von Willebrand 2	Cadena alfa-1(I) del colágeno	Defensina 6	Proteína similar a clusterina 1
Proteína 1 de la ruta de señalización	Proteína que contiene dominio de desintegrina y metaloproteinasa 18	Desintegrina A y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 18	Proteína que contiene dominio transmembrana y de inmunoglobulina 2
	Proteína secretora LCCL rica en	Desintegrina A y metaloproteinasa con	Proteína que contiene dominio de lectina

inducible por WNT1	cisteína que contiene dominio 1	motivos de trombospondina 3	de tipo C.UNQ5810/PRO19627
Quimiocina con motivo C-C.1	Cadena alfa-4(IV) del colágeno	Proteína relacionada con Dickkopf4	Lipocalina específica del epidídimo 10
Proteína de unión a calcio modular relacionada con SPARC 2	Proteína asociada a la diferenciación de queratinocitos	Desintegrina A y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 5	Desintegrina A y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 8
Miembro A de la familia 11 del dominio de lectina tipo C	Complemento C4-B	Proteína relacionada con ependimina de mamífero 1	Lipocalina específica del epidídimo 8
Proteína secretada relacionada con Ly-6/uPAR 2	Cadena alfa-2(V) del colágeno	Fibrilina 3	Péptido P-E rico en prolina básico
Glipicano 3	Complemento C5	Fetuina B	Supuesta proteína no caracterizada C10orf99
Proteína secretada y transmembrana 1	Cadena alfa-1(VII) del colágeno	Factor de crecimiento de fibroblastos 6	Proteína no caracterizada C17orf77
Proteína 264 de secuencia expresada en testículos	Componente C7 del complemento	Factor de crecimiento de queratinocitos	Arlacetamida desacetilasa tipo 2
Glipicano 2	Cadena beta del componente C8 del complemento	Factor de crecimiento/diferenciación 8	Lipocalina específica del epidídimo 12
Serina proteasa 23	Cadena gamma del componente C8 del complemento	Polipéptido inhibidor gástrico	Antígeno de melanoma B 2
Proteína ribosómica 39S L55, mitocondrial	Cadena alfa-1(XV) del colágeno	Hormona glicoproteica beta-5	Antígeno de melanoma B 3
Homólogo de proteína NipSnap 3A	Cadena alfa-1(XVI) del colágeno	Granzima M	Homólogo de proteína plasmática seminal bovina 1
Fibronectina	Cadena alfa-1(XVIII) del colágeno	Péptido de liberación de gastrina	Proteína similar al C1q del complemento de 3
Neudesina	Cadena alfa-1 (XIX) del colágeno	Serina proteasa HTRA1	Proteína UPF0565 tipo C2orf69
Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2	Proteína de la matriz oligomérica del cartilago	Interferón alfa-4	Proteína UPF0669 tipo C6orf120
Anhidrasa carbónica 6	Proteína C reactiva	Interferón alfa-5	Proteína similar a colipasa C6orf127
Proteína eliminada en tumores cerebrales malignos 1	Factor estimulante de colonias de granulocitos	Interferón alfa-7	Proteína no caracterizada C7orf69
Proteína de unión a calcio modular relacionada con SPARC 1	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos	Desintegrina A y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 7	Proteína similar al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
Proteína amiloide beta A4	Proteína CYR61	Miembro 10 de la superfamilia de inmunoglobulinas	Proteína similar a condroadherina
Miembro 6 de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral	Proteína similar al receptor 1 del componente del complemento	Proteína que contiene dominio asociado a proteasa de 21 kDa	Supuesta proteína no caracterizada UNQ6490/PRO21339
Subunidad 1 del receptor de tipo B del ácido gamma-aminobutírico	Factor de crecimiento de células madre; lectina de tipo C secretada por linfocitos	Proteína que contiene dominio de abhidrolasa FAM108A1	Supuesta proteína no caracterizada UNQ6493/PRO21345
Pro-neuregulina 1, isoforma unida a la membrana	CMP-N-acetilneuraminato-beta galactosamida-alfa-2,3-sialiltransferasa	Desintegrina A y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 9	Supuesta proteína no caracterizada UNQ5815/PRO19632
Hormona glicoproteica alfa-2	Dipeptidilo peptidasa 4	Receptor de interleucina 9	Cistatina A
Metalo-endopeptidasa de la membrana de tipo 1	Sialofosfoproteína de la dentina	Interleucina 9	Inhibidor de peptidasa R3HDML

Receptor de Fc de tipo A	Endotelina 1	Cadena beta B de inhibina	Cistatina 9
Quimiocina con motivo C-C de tipo 4	Efrina B1	Inhibidor de serina proteasa de tipo Kazal 2	Miembro 5 de la familia de dominios DAN
Receptor que contiene dominios de discoidina de células epiteliales 1	Proteína similar a serina proteasa específica de la epidermis	Proteína reguladora endotelial de unión a BMP	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1
Mucina 1	EMILIN-1	Proteína asociada a queratinocitos 2	Proteína de unión a los espermatozoides del epididimo 1
Factor de crecimiento endotelial vascular A	Endoplasmina	Subunidad alfa-1 de laminina	Elaftina
Fibulina 1	Receptor de tipo A de efrina 3	Quimiostatina derivada de células de leucocitos 2	Proteína FAM55A
Receptor de prolactina	Receptor de tipo B de efrina 6	Triacilglicerol lipasa gástrica	Factor de crecimiento/diferenciación 6
Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 6	Proteína que contiene dominios de glicosiltransferasa 1 1	Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina y dominios de homología de calponina 3	Proteína que contiene dominios de glucosa-fructosa oxidoreductasa 1
Antígeno CD209	Factor de coagulación X	Proteína relacionada con la lipasa pancreática 2	Eritropoyetina
Cadena alfa-2(XI) del colágeno	Factor de coagulación VIII	Alfa manosidasa específica del epididimo	Glutatión peroxidasa 6
Subunidad alfa del receptor de estimulantes de colonias de granulocitos-macrófagos	Proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral de C1q del complemento 7	Proteína que contiene dominios de fibronectina tipo III 7	Proteína no caracterizada UNQ511/PRO1026
Elaftina	Fibrilina 2	Proteína asociada a microfibrillas 5	Beta-defensina 128
Subunidad alfa del receptor de interleucina 15	Alfa-2-HS-glicoproteína	Factor inhibidor mülleriano	Interleucina 31
Midkina	Factor de crecimiento de fibroblastos 10	Metaloproteinasa de matriz 21	Interleucina 34
Integrina alfa-7	Cadena alfa de fibrinógeno	Metaloproteinasa de matriz 17	Proteína similar a calcitreina plasmática 4
Mucina 4	Cadena beta de fibrinógeno	Metaloproteinasa de matriz 20	Lipocalina específica del epididimo 9
Monoóxigenasa alfa-amidante de peptidilglicina	Proteína asociada al carcinoma del epitelio nasal, pulmonar y del paladar elongado 1	Subunidad gamma de N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa	ADNc de FLJ60957, muy similar a la proteína secretada relacionada con frizzled 4
Apolipoproteína A-I	Gastrina	Multimerina 2	Miembro M de lipasas
Proteoglicano 4	Cadena alfa de hormonas glicoproteicas	Promotilina	CLECSF12
Miembro de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral 25	Subunidades alfa/beta de N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa	Proteína de matriz extracelular relacionada con FRAS1 3	Supuesta fosfolipasa A2 secretora del grupo IIC inactiva
Atractina	Granzima A	Proteína de unión a proteína cinasa NELL1	Serina proteasa MPN2
Microseminoproteína asociada a la próstata	Proteína similar al factor de crecimiento de hepatocitos	Proteína de unión a proteína cinasa NELL2	Netrina 5
Alfa-amilasa 1	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1	Neurotripsina	Proteína que contiene repeticiones de NHL 3
Factor neurotrófico derivado del cerebro	Proteína de unión al factor de	Neuroserpina	Proteína similar a olfactomedina 2B

Miembro M de la familia 4 de dominios de lectina de tipo C	crecimiento similar a la insulina 2	Nidógeno 2	Ovoquimasa 2
Receptor de factores estimulantes de colonias de granulocitos	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 4	Proteína que contiene dominio de abhidrolasa FAM108B1	Supuesta proteína no caracterizada UNQ3029/PRO9830
Factor de crecimiento similar a la insulina II	Miembro 10D de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral	Neurotrofina 4	Ovoquimasa 1
Molécula de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario 1	Interferón alfa-1/13	Glutación peroxidasa secretora del epididimo	Supuesta glicoproteína beta-1 específica del embarazo 7
Miembro A de la familia 4 de dominios de lectina de tipo C	Interferón alfa-2	Fosfolipasa A2 secretora del grupo 10	Homólogo de ovostatina 2
Molécula similar a CMRF35 1	Interferón beta	Fosfolipasa A2 secretora del grupo IID	Neuropéptido orexigeno QRFP
Proteína similar al transportador de colina 4	Interferón gamma	Lactoperoxidasa	Linfocito antígeno 6K
Proteína asociada a tensioactivo pulmonar A1	Factor de crecimiento similar a la insulina IB	Efector de apoptosis p53 relacionado con PMP-22	Proteína expresada por la próstata y los testículos 1
Esperrmina oxidada	Proteína india hedgehog	Proteína específica de placenta 1	Supuesta fosfolipasa de tipo B 1
CMP-N-acetilneuraminato-beta-1,4-galactosido alfa-2,3-sialiltransferasa	Proteína similar a la molécula de adhesión celular neuronal L1	Péptido tuberoinfundular de 39 residuos	Supuesta proteína no caracterizada FLJ42147
Callicreina 8	Interleucina 13	Prolargina	Otogelina
Activador de plasminógenos de tipo tisular	Interleucina 2	Secretogranina 2	Ribonucleasa 8
N(1)-acetil-espermina/espermidina oxidasa peroxisomal	Miembro 2A de la familia de elastasas de tipo quimiotripsina	Proteína 1 que contiene dominios de endonucleasa	Proteína de interacción con el complejo del poro nuclear de tipo 2
Probable palmitoiltransferasa ZDHHC4	Cadena A de inhibina beta	Semaforina 3B	Polipéptido proactivador de tipo 1
Proteína de transferencia de éster colestérfico	Inhibidor de tripsina secretora pancreática	Somatostatina	Homólogo de proteína spinster 2
Antígeno de histocompatibilidad de clase I de HLA, cadena A-2 alfa	Miembro 21 de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral	Miembro 4 de la familia SDR de deshidrogenasa/reductasa de tipo 2	Proteína que contiene dominios C de factor de von Willebrand de tipo 2
Cadena alfa-1 (II) del colágeno	Cadena pesada H1 del inhibidor de inter-alfa-tripsina	Transcoblalmina 1	Urotensina 2B
Pro-interleucina 16	Cadena pesada H2 del inhibidor de inter-alfa-tripsina	Factor de trébol 2	Tetraspanina 18
Receptor de leptina	Cadena pesada H3 del inhibidor de inter-alfa-tripsina	Testican 1	Proteína de la membrana de UPF0514 FAM159A
Decorina	Antígeno específico de la próstata	Paraoxonasa/lactonasa sérica 3	Laterina
Factor derivado de células estromales 1	Calicreina 4	Proteína similar a Tollid 2	Proteína similar a metiltransferasa 7B
Tenascina	Calicreina plasmática	Tripsina 2	Proteína TEX261
Proteína que contiene dominio de desintegrina y metaloproteínasa 12	Regulador del canal de cloruro activado por calcio4	Proteína que contiene dominios de dedo RING y SPRY 1	Homólogo de proteína de alkB de reparación de ADN sometido a alquilación 7
Desintegrina A y metaloproteínasa con	Proteína de aumento bactericida/de la	Proteína que contiene dominios de	Proteína que contiene dominios emp24

motivos de trombospondina 13	permeabilidad de tipo1	unión a calcio y de enrollamiento enrollado 1	transmembrana 6
Cadena alfa de glicoproteína CD8 de la superficie de células T	Leptina	Proteína Wnt-2	Proteína relacionada con XK 5
Proteína sobreexpresada y amplificada conjuntamente con EGFR	Desintegrina A y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 4	Ectonucleósido trifosfato difosfodihidrolasa 8	Supuesta proteína que contiene dominios V-set e inmunoglobulina 7
Proteína relacionada con autofagia 16-1	Triacilglicerol lipasa hepática	Proteína Wnt-8b	Miembro 3 de la familiar similar a factores de crecimiento insulínicos
Proteína de resistencia de anti-estrógenos de cáncer de mama 3	Proteína G6c del locus del complejo de antígeno 6 de linfocitos	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa 4	Proteína de interacción con el complejo del poro nuclear de tipo 1
Cadherina 23	Lisofosfolipasa de eosinófilos	Proteína que contiene dominios EMI 1	Fosfoproteína secretada 1
Factor estimulante de colonias de macrófagos 1	Subunidad beta de lutropina	Proteína no caracterizada C6orf15	Cadena alfa-5(VI) del colágeno
Receptor alfa de folatos	Proteína asociada a microfibrillas 1	Colectina 10	Antígeno de melanoma B 5
Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 8	Factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos	CoA ligasa de ácidos grasos de cadena larga ACSBG2	Proteína de dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP 10A
Proteína ubiquitina E3 ligasa LRSAM1	Proteína Gla de matriz	Proteína 3 de transcritos inducidos por oncoproteínas	Proteína UPF0369 de tipo C6orf57
Molécula de adhesión celular neuronal 1	Colagenasa tipo IV de 72 kDa	Inhibidor de peptidasa 15	Supuesta proteína no caracterizada C10orf31
Neurilina 4, ligada al cromosoma X	Estromelina 1	Proteína ácida rica en prolina 1	Supuesta proteína no caracterizada C11orf45
Netrina G1	Colagenasa de neutrófilos	Urocortina	Proteína no caracterizada C12orf28
Componente PIG-T de GPI transamidasa	Mesotelina	Tripsina X3 (EC 3.4.21.4)	Proteína no caracterizada C17orf67
Ligando de kit	Mucina 5AC	Proteína similar a HHIP 2	Beta-defensina 121
Proteína similar a Seizure 6	Mucina 6	Fractalquina	Beta-defensina 130
Miembro 7 de la familia SLAM	Norrina	Proteína Wnt-11	Proteína de unión al triplete de nucleótidos de histidina 2
Factor de necrosis tumoral	Oxitocina-neurofina1	Proteína Wnt-7a	Apelina
Uromodulina	Factor de crecimiento nervioso beta	Proteína con dominios FCH y SH3 doble 1	Proteína específica de placenta 9
Miembro 13 de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral	Miembro 18 de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral	Proteína relacionada con el factor de crecimiento derivado del hepatoma 2	Proteína asociada con carcinoma hepatocelular TD26
Proteína CREG1	Neurofina 3	Subunidad alfa de interleucina 12	Persefina
Proteína que contiene dominios similares a EGF 8	Subunidad A del factor de crecimiento derivado de plaquetas	Proteína UPF0577 de tipo KIAA1324	Proteína específica endocrina regulada 18
Proteína multifuncional de interacción con el complejo de aminoacil-ARNt sintetasa1	Fosfopantotenoilcisteína descarboxilasa	Proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral del C1q del complemento 9	Proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral del C1q del complemento 8
Proteína similar a ADAMTS 4	Inhibidor del activador de plasminógenos 1	Mucina 17	Proteína morfogenética ósea 8A
Factor de coagulación XI	Inhibidor del activador de plasminógenos 2	Proteína lisosomal NCU-G1	Proteína WFDC13

Subunidad alfa-2 del receptor de interleucina 22	Potenciador de endopeptidasa C de procolágeno 1	Subunidad alfa-3 de prolil 4-hidroxilasa	Proteína Wnt-8a
Homólogo del factor autorregulador epidérmico deformado 1	Proteína que contiene dominios transmembrana y similares a ubiquitina 2	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa SDCCAG10	Proteína que contiene dominios similares a Ig ENSP00000270642
Prostaglandina-H2 D-isomerasa	Proteína disulfuro-isomerasa	Inhibidor de peptidasa 16	Proteína que contiene dominio de abhidrolasa 15
Alfa-1-antitripsina	Factor derivado del epitelio pigmentario	Proteína relacionada con el receptor de poliovirus 4	Proteína similar a ribonucleasa 9
Alfa-1-antiquimiotripsina	Pepsina A	Miembro 15 de la familia 22 de portadores de solutos	Proteína no caracterizada C2orf66
Proteína de unión a acil-CoA	Gastricina	GPI inositol-desacilasa	Proteína no caracterizada C17orf99
Factor B del complemento	Proteína Sonic hedgehog	Proteína transmembrana 43	Proteína FAM150A
Subunidad beta de coriagonadotropina	Proteína I-alfa de reconocimiento de peptidoglicanos	Proteína relacionada con angiopoyetina 2	Proteína de tipo 1 específica de la placenta
Proteína del núcleo de versicano	Biglicano	Proteína relacionada con angiopoyetina 6	Proteína no caracterizada C18orf20
Receptor del factor de crecimiento epidérmico	Proteína que puede inducirse por prolactina	Arlsulfatasa K	Beta-defensina 110
Intercambiador de ecto-NOX disulfuro-tiol 2	Factor de plaquetas 4	Aucurina	Proteína similar a neuritina
Hialuronidasa 1	Plasminógeno	Serina proteasa específica del cerebro 4	Proteína con extremo carboxi-terminal rico en histidina 1
Proteína antagonista del receptor de interleucina 1	Paraoxonasa/arilesterasa sérica 1	Proteína monooxigenasa similar a DBH 1	Miembro A de la familia 2 de dominios de lectina de tipo C
Subunidad beta del receptor de interleucina 6	Fosfatasa alcalina, tipo placentario	Proteína no caracterizada C1orf56	Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 70
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 que contiene dominio BTB/POZ 17
Glucodelina	Proteína rica en prolina salival básica 1	Proteína similar a colipasa C6orf126	Proteína no caracterizada C12orf53
Proteína relacionada con hormona paratiroidea	Proteína C asociada a tensioactivo pulmonar	Proteína no caracterizada C11orf83	Miembro A de la familia 9 de dominios de lectina de tipo C
Nurima	Hormona paratiroidea	Proteína no caracterizada C16orf89	Proteína similar a C1q del complemento 4
Subunidad alfa-2 de prolil 4-hidroxilasa	Componente P amiloide sérico	Proteína similar a carboxipeptidasa X2	Molécula similar a CMRF35 4
Antígeno CD276	Secretogranina 1	Cistatina tipo 9	Proteína FAM151B
Proteína con dominio similar a EGF rica en cisteína 1	Proteína del núcleo de proteglicano de heparán sulfato específica de la membrana basal	Miembro 13 de la familia SDR de deshidrogenasa/reductasa	Proteína que contiene dominio de abhidrolasa FAM108A2/A3
Proteína que contiene dominios CUB y sushi 1	Antileucoproteinasas	Beta-defensina 123	Osteocrina
Ficolina 2	Estabilina 1	Beta-defensina 132	Proteasa transmembrana, serina 11E2
Proteína similar al receptor de Fc 5	Superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn]	Proteína similar a citocina 1	Proteína transmembrana 14E
Proteína GPR89	Somatotropina	Proteína relacionada con Dickkopf 2	Proteína transmembrana 207

Molécula de adhesión de unión A	Serpina B5	Proteína similar a Dickkopf 1	Proteína similar a TOMM20 1
Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 8A	Espondina 1	Proteína secretora del epididimo beta	Proteína no caracterizada C3orf41
Inositol polifosfato fosfatasa múltiple 1	Proteína de mantenimiento estructural de cromosomas 3	Proteína que contiene dominios de repetición similares a EGF y similares a discoidina I 3	Proteína regulada por andrógenos de la glándula submandibular 3A
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 con caja de cuatro articulaciones 1
Periostina	Tiroglobulina	Proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos 2	Proteína HSN2
Proteína RIC-3	Inhibidor de metaloproteínasa 1	Factor de crecimiento/diferenciación 3	Humanina
Proteína similar a SLIT y NTRK 2	Inhibidor de metaloproteínasa 2	Proteína similar a GLIPR1 1	Proteína similar a queilina/cordina
Factor de modificación de sulfatasa 1	Inhibidor de metaloproteínasa 3	Inhibidor de serina proteasa de tipo Kazal 6	Proteína UPF0624 de tipo C6orf186
Factor de modificación de sulfatasa 2	Activador de plasminógenos de tipo urocinasa	Interleucina 178	Supuesta proteína similar a neurofibromina 1 4/6
Proteasa transmembrana, serina 6	Lactotransferrina	Interleucina 17C	Proteína similar a peroxidasa
Linfotaxina-alfa	Tripsina 1	Interleucina 17D	SCO-espondina
Miembro 10B de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral	Proteína regulada por andrógenos de la glándula submandibular3B	Proteína de unión a hialuronano y proteglicano 3	Supuesta proteína no caracterizada UNQ9165/PRO28630
Receptor de superficie del activador de plasminógenos de urocinasa	Miembro 1A de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral	Homólogo de la proteína 1 de la capa exterior de la membrana vitelina	Miembro 3 de la familia del regulador del canal de cloruro activado por calcio
Inhibidor de activación de células T que contiene dominio V-set 1	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1	Variante de la subunidad beta de coriogonadotropina 1	Probable serina proteasa UNQ9391/PRO34284
Glucagón	Proteína de unión a vitamina D	Proteína similar a lisozima 1	Proteína no caracterizada C4orf26
N-acetilmuramoiil-L-alanina amidasa	Vitronectina	Metaloproteínasa de matriz 28	Proteína no caracterizada C4orf40
Sulfidril oxidasa 1	Factor de von Willebrand	Nefronectina	Proteína no caracterizada C5orf55
Miembro 4 de la familia SDR de deshidrogenasa/reductasa	Proteína G5c del locus del complejo de antígeno 6 de linfocitos	Proteína de dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP 12	Supuesta proteína estimulante de macrófagos MSTP9
Proteína de unión a interleucina 18	Zinc-alfa-2-glicoproteína	Proteína similar a olfactomedina 1	Proteína no caracterizada C15orf61
Kin de proteína similar a IRRE 2	Proteína no caracterizada C14orf93	Proteína similar a olfactomedina 2A	Quimotripsinógeno B2
Marcador de diferenciación asociado a mieloides	Retinosquinina	Serina proteasa 27	Beta-defensina 108A
Cordina	Alfa-1,3-manosiltransferasa ALG2	Miembro 2 de la familia 3A de secretoglobina	Beta-defensina 111
1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa gamma	Miembro A de la familia 11 del dominio de lectina de tipo C, isoforma CRA b	Desintegrina A y metaloproteínasa con motivos de tromboespondina 2	Supuesta proteína que contiene dominios V-set e inmunoglobulina 6
Receptor específico del producto final de la glicosilación avanzada	Proteína que contiene dominios de superfamilia facilitadora principal 7	Proteína que contiene dominios de desintegrina y metaloproteínasa 28	Inhibidor de serina proteasa de tipo Kazal 5 de tipo 3
Proteína que contiene dominio CARD	Proteína neuronal transmembrana con	Proteína de aumento bactericida/de la	Supuesto inhibidor de serina proteasa de

de la familia NLR 4	repeticiones ricas en leucina 1	permeabilidad de tipo 2	tipo Kazal 5 de tipo 2
Pro-neuregulina 2, isoforma unida a la membrana	Subunidad 11 del subcomplejo beta de NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1, mitocondrial	Fosfodiesterasa similar a esfingomielinasa ácida 3b	Miembro 7C de la familia SDR de deshidrogenasa/reductasa
Antígeno asociado a espermatozoides 11A	Proteína de la membrana UPF0546 de tipo C1orf91	Inhibidor de serina proteasa de tipo Kazal 7	Beta-defensina 131
Homólogo de proteína 1 secretada por ovocitos	Proteína relacionada con anhidrasa carbónica 10	Neurexofilina 4	Beta-defensina 134
Albúmina sérica	Colectoquinina	Proteína Wnt-9b	Beta-defensina 136
Cocina	Codanina 1	Homólogo B de la proteína 16 de gránulos de zimógeno	Beta-defensina 116
Inhibidor de proteasa C1 plasmática	Proteína no caracterizada C6orf89	Semafarina 3D	Proteína FAM132A
Subunidad alfa del receptor de interleucina 7	Sulfato de condroitina glucuroniltransferasa	Apolipoproteína L4	Proteína FAM132B
Cadena pesada H5 del inhibidor de inter-alfa-tripsina	Proteína que contiene dominios que quitinasa 1	Proteasa transmembrana, serina 11D	Beta-defensina 115
Factor de crecimiento derivado de plaquetas D	Proteína transmembrana C9orf7	Proteína sensible a encefalopatía espongiiforme ovina 1	Beta-defensina 114
Proteína S100-A7	Molécula similar a CMRF35 9	Supuesta proteína similar a anexina A2	Inhibidor de serina proteasa Kazal de tipo 9
Lectina similar a Ig de unión a ácido siálico 10	Citocromo P450 2S1	Proteína morfogenética ósea 10	Miembro M de lipasas
Antígeno de tipo nefritis tubulointersticial	Homólogo de proteína Crumbs 3	Secretogranina 3	Proteína relacionada con la lipasa pancreática 3
Miembro 13B de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral	Miembro 7 de la familia SDR de deshidrogenasa/reductasa	Proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral del C1q del complemento 4	Proteína expresada en testículo, próstata y placenta
CoA ligasa de ácidos grasos de cadena larga 5	Proteína ENED	Proteína no caracterizada C1orf54	Neuromedina S
Claudina 14	Proteína relacionada con el factor H del complemento 4	Carboxipeptidasa A6	Neuropéptido S
Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 20	Miembro 3 de la familia LGI con repeticiones ricas en leucina	Quimiocina con motivo C-C 19	Proteína similar a pentraxina neuronal C-16orf38
Miembro 7 de la familia de interleucina 1	Gliomedina	Quimiocina con motivo C-C 25	Otolina 1
Proteína G5b del locus del complejo de antígeno 6 de linfocitos	Proteína que contiene dominios de glicerosfodiestérfosfodiesterasa 5	Miembro 2B de la familia de la elastasa similar a quimotripsina	Proteína similar a fosfatasa ácida púrpura de hierro/zinc
Acetilcolinesterasa	Probable receptor acoplado a proteína G 113	Proteína CEI	Homólogo de ovostatina 1
Amelogenina, isoforma X	Probable receptor acoplado a proteína G 114	Proteína no caracterizada C6orf1	Proteína relacionada con plasminógenos A
Angiogenina	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa 4	Proteína no caracterizada C7orf34	Poliserasa 3
Receptor de la toxina del carbunco 2	Gremlin 1	Proteína asociada a queratinocitos 3	Supuesto péptido YY-2
Anexina A2	Miembro 17 de la subfamilia K del canal del potasio	Proteína no caracterizada C9orf47	Supuesto péptido YY-3

Apolipoproteína C-III	Proteína que contiene motivo KDEL 2	Cadena alfa-1 (VIII) del colágeno	Proteína similar a ribonucleasa 10
Apolipoproteína L1	Layilina	Proteína no caracterizada C18orf54	Proteína similar a ribonucleasa 12
Subunidad A del subcomponente C1q del complemento	Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 8B	Cistatina tipo 1	Proteína similar a ribonucleasa 13
Subunidad C del subcomponente C1q del complemento	Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 8D	Proteína que contiene dominio C2 2	Serpina A11
Calcitonina	Lectina similar a Ig de unión a ácido siálico 6	Proteína que contiene dominio DDRGK 1	Inhibidor de proteasa de tipo Kunitz 4
Nucleotidasa activada por calcio soluble 1	Beta-1-glicoproteína específica del embrazo 2	Proteína FAM55C	Proteína similar a meteorina
Quimocina con motivo C-C 15	Proteína que contiene el dominio Ly6/PLAUR 1	Cadena alfa-1 (XXVI) del colágeno	Supuesta serina proteasa de testículo 2
Antígeno CD97	Proteína que contiene el dominio Ly6/PLAUR 5	Proteína FAM19A2	Beta-defensina 112
Contactina 4	Homólogo del dominio N-terminal de MLN64	Proteína FAM5B	Proteína no caracterizada FLJ37543
Complemento C2	Factor inhibidor de la migración de macrófagos	Factor de crecimiento de fibroblastos 5	Proteína FAM24A
Cadena alfa-6(IV) del colágeno	2-acilglicerol O-aciltransferasa 3	Probable serina proteasa HTRA3	Proteína secretada relacionada con frizzled 4
Cadena alfa-2(VI) del colágeno	Homólogo del portador mitocondrial 1	Miembro 8 de la familia de interleucina 1	Proteína similar a C1q del complemento 2
Cadena alfa-1 (XI) del colágeno	Apolipoproteína L6	Inhibidor de serina proteasa de tipo Kazal 4	Supuesta proteína no caracterizada C17orf69
Homólogo de Crumbs 1	Protocadherina alfa-6	Otospiralina	Supuesta cistatina 13
Cistatina C	Protocadherina gamma-A12	Péptido antimicrobiano expresado en el hígado 2	Beta-defensina 109
Defensina de neutrófilos 1	Canal de hidrógeno regulado por voltaje 1	Homólogo de lisil oxidasa 1	Beta-defensina 113
Endotelina 3	Todo-trans-retinol 13,14-reductasa	Homólogo de lisil oxidasa 2	Beta-defensina 135
Receptor de Fc de inmunoglobulina epsilon de baja afinidad	Regulador de proteína de dinámica de microtúbulos 2	Proteína asociada al carcinoma del epitelio nasal, pulmonar y del paladar elongado 4	Proteína que contiene dominio S1 de peptidasa LOC136242
Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3	R-espondina 4	Proteína similar a lisozima g 2	Factor de crecimiento/diferenciación 7
Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 4	Proteína transportadora de ácidos grasos de cadena larga 3	Endomucina	Homólogo de proteína de inducción de IgA
Proteína específica de la parada del crecimiento 6	Proteína de tráfico de vesículas SEC22c	Neuropéptido B	Supuesta proteína similar a lipocalina 1 1
Receptor de la hormona del crecimiento 2-	Claudina 1	Proteína similar a quinesina KIF7	Supuesta serina proteasa 29
UDP-N-acetilglucosamina epimerasa/N-acetilmannosamina cinasa bifuncional	Proteína con dominios similares a inmunoglobulina y repeticiones ricas en leucina 3	Receptor similar a inmunoglobulina asociado con leucocitos 2	Supuesta proteína que contiene dominios ricos en cisteína del receptor Scavenger LOC619207
Miembro 8 de la superfamilia de inmunoglobulinas	Miembro 9 de la familia SLAM	Fosfolipasa A2 dependiente de calcio	Proteína similar a secretoglobina

Cadena alfa del receptor de interleucina 4	Transiretina	Proteína adaptadora de caspasa proapoptótica	Supuesta proteína similar a estereocilina
Calicreína 14	Serina/treonina-proteína cinasa 32B	Proteína similar a integrina beta 1	Miembro 2 de la familiar similar a factores de crecimiento insulínicos
Calicreína 6	Subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas	Proteína similar a Tollid 1	KIR2DL4
Subunidad beta-3 de laminina	Nogina	Inhibidor de proteasa de tipo Kunitz 3	Supuesta zinc-alfa-2-glicoproteína tipo 1
Leucil-cistinil aminopeptidasa	Triptasa alfa-1	Proteína TMEF155	Miembro 4 de la familiar similar a factores de crecimiento insulínicos
Serina proteasa de unión a manano 1	Proteína con repeticiones de tetra-tricopéptidos 14	Prosalusina	Proteína no caracterizada C2orf72
Serina proteasa de unión a manano 2	Proteína del gen B transactivador de XTP3	Proteína amnionless	Proteína de tipo replicación-iniciación
Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos	Palmitoiltransferasa ZDHHC15	Proteína WFDC10B	Proteína expresada por la próstata y los testículos 3
Neuropéptido Y	Proteína de unión de zona pelúcida-espermatozoide 3	Proteína de dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP 8	Antígeno de melanoma B 4
Proteína del núcleo de agrecano	Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 39	Proteína Wnt-5b	Supuesta proteína no caracterizada C1orf191
Proteína B asociada a tensioactivo pulmonar	Triacilglicerol lipasa pancreática	Proteína Wnt-7b	Beta-defensina tipo 108B
Proteína relacionada con el receptor de poliovirus 1	Proteína transmembrana 139	Proteína de unión a la zona pelúcida 2	Proteína no caracterizada FLJ90687
Renina	Factor inhibidor de la leucemia	Proteína de unión al dominio SH3 tipo 5	Proteína secretada relacionada con frizzled 2
Ribonucleasa pancreática	Galectina 1	Molécula de adhesión a adipocitos	Péptido rico en prolina básica IB-1
Semenogelina 1	Quimiocina con motivo C-C 21	Proteína no caracterizada C12orf59	Factor de crecimiento de fibroblastos 16
Molécula de activación linfocítica de la señalización	Antígeno tipo CD5	Proteína de unión a apolipoproteína A-I	Inhibidor de serina proteasa Kazal de tipo 8
Inhibidor de la ruta de la tromboplastina tisular	Sulfotransferasa de hidratos de carbono 9	Claudina 17	Proteína no caracterizada KIAA0495
Usherina	Proteína de unión a lipopolisacáridos	Caspasa inactiva 12	Proteína básica de plaquetas de tipo 2
Factor de crecimiento de fibroblastos 23	Proteína 1 neuronal motora rica en cisteína	Proteína no caracterizada C7orf58	Serpina E3
Subunidad alfa de la interleucina 23	Factor de crecimiento de tejido conjuntivo	Cadena alfa-1 (XXVIII) del colágeno	Receptor CR1
Proteína secretora del epidídimo E1	Homólogo de proteína eyes shut	Proteína de la matriz de la dentina 4	Fosfoproteína secretada 1
Proteína similar a ADAMTS 1	Proteína similar a mucina 1	Proteína no caracterizada C16orf48	Proteína secretada inducida por estrés 1
Factor similar a quimiocina	Factor de crecimiento de fibroblastos 19	Carboxilesterasa 3	Proteína Wnt
Proteína que contiene dominios similares a EGF 7	Proteína relacionada con folistatina 3	Proteína FAM20B	Proteína Wnt (fragmento)
Tectonic-1	Proteína de interacción con Hedgehog	GTPasa con bucle de GPN 3	Supuesta serina proteasa LOC138652
Proteína transmembrana 25	Receptor B de la interleucina 17	Proteína que contiene dominio GRAM 1B	TOM1

UDP-GalNAc:beta-1,3-N-acetylglactosaminiltransferasa 1	Regulador del transporte de iones que contiene dominio FXYD 5	Proteína de clase U de biosíntesis de anclajes de fosfatidilinositol glicano	Supuesta proteína no caracterizada FLJ46089
Interleucina 15 (IL-1b)	Lipasa endotelial	Subunidad alfa de interleucina 27	Supuesta proteína no caracterizada C1orf134
Dominios similares al factor de crecimiento epidérmico múltiple 11	Proteína de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF 2	Pro-neuregulina 4, isoforma unida a la membrana	UDP-GlcNAc:betaGal acetilglucosaminiltransferasa 9
Proteína similar a mucina y cadherina	Otoraplina	Proteína neuronal con repeticiones ricas en leucina 3	Proteína no caracterizada C11orf44
Ribonucleasa 4	Fosfolipasa A2 secretora del grupo 3	Proteína regulada por el receptor de NMDA 2	Proteína no caracterizada C12orf73
Proteína que contiene dominio SH2 3C	Fosfolipasa A2 del grupo XV	NADH-citocromo b5 reductasa 1	Supuesta cistatina 9 de tipo 2
CMP-N-acetilneuraminato-beta galactosamida-alfa-2,3-sialiltransferasa	Miembro 14 de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral	Proteína que contiene el dominio 7 de la enfermedad de Parkinson1	Supuesta proteína que contiene dominio de abhidrolasa FAM108A5
Proteína transmembrana 9	Plexina A2	Proteína de unión a FK506 11	Beta-defensina 133
Proteína de dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP 2	Papilina	Miembro B de la familia 12 del dominio de lectina de tipo C	Fibrosina 1
Receptor de adenosina A3	Procinetina 1	Miembro F5 de la familia 35 de portadores de solutos	Probable receptor delta de folatos
Subunidad APH-1A de gamma-secretasa	Ribonucleasa 7	Lectina similar a Ig de unión a ácido siálico 12	RPE-espondina
Basigina	Inhibidor de proteasa de tipo Kunitz 1	Proteína FAM19A3	Proteína similar a NPIP ENSP00000346774
Proteína que contiene repeticiones de IAP baculoviral 7	Espondina 2	Proteína que contiene repeticiones de WD 82	Supuesta proteína de priones específica de testículo
Calumenina	Testican 2	Proteína de unión potenciadora de adipocitos 1	Proteína rica en prolina 1
Alfa-S 1-caseína	Serina proteasa inactiva PAMR1	Proteína similar a ADAMTS 3	Supuesta proteína no caracterizada FP248
Ciclina L1	Torsina 2A	Proteína que contiene dominios de enrollamiento enrollado 80	Proteína UPF0670 de tipo C8orf55
Factor H del complemento	Vasohibina 1	Intercambiador de ecto-NOX disulfuro-tiol 1	Supuesta zinc-alfa-2-glicoproteína de tipo 2
Hormona somatomotropina coriónica	Vasorina	Regulador del crecimiento neuronal 1	Proteína SPARC
Receptor de coxsackievirus y adenovirus	Xilosiltransferasa 1	Proteoglicano de la matriz del interfotoreceptor 1	Otopetrina 1
Miembro 2 de la familia de pirofosfatasa/ectonucleótido pirofosfatasa/ fosfodiesterasa	Miembro 6 de la familia de pirofosfatasa/ectonucleótido fosfodiesterasa	ADNc FLJ36603 fis, clon TRACH2015180, muy similar a la proteína secretada relacionada con frizzled 2	ADNc FLJ55667, muy similar a la proteína secretada ácida y rica en cisteína
Proteína alfa similar a ERO1	Oncostatina-M	Miembro H de las lipasas	Miembro K de las lipasas
Factor de coagulación IX	Derlina 1	Mucina 19 (MUC-19)	Miembro C de la familia 18 del dominio de lectina de tipo C
Receptor III-B de la región de Fc de inmunoglobulina gamma de baja	Poliproteína de la env. del provirus ancestral HERV-FRD_6p24.1	Proteína 2 del gen candidato 1 de susceptibilidad a psoriasis	Supuesta proteína no caracterizada UNQ6125/PRO20090

afinidad									
Ficolina 3	Prostasina								Complemento C3
Proteína similar al receptor de Fc 2	Proteasa transmembrana, serina 11E								Cadena alfa-2(IV) del colágeno
Proteína transmembrana con repeticiones ricas en leucina FLRT3	Antígeno de histocompatibilidad de clase I de HLA, cadena Cw-16 alfa								Proteína no caracterizada UNQ6126/PRO20091
Gelsolina	Factor inhibidor de Wnt 1								Proteína similar a serpina HMSD
Granulinsina	Péptido natrurético de tipo C								Proteína expresada por la próstata y los testículos 4
Glicoproteína transmembrana NMB	Angiopoyetina 2								Cadena alfa-1 (XXII) del colágeno
Granulinas	Desoxirribonucleasa gamma								Supuesta proteína no caracterizada C13orf28
Heparanasa	Carboxipeptidasa A5								Cistatina S
Región de la cadena C de Ig mu	Quimiocina con motivo C-C 14								R-espondina 1
Interleucina 1 alfa	Interleucina 5								C8orf2
Receptor A de interleucina 31	Interleucina 10								Proteína de unión a odorante 2a
Molécula de adhesión de unión B	Quimiocina con motivo C-X-C 2								Opiorfina
Lipocalina 1	Quimiocina con motivo C-X-C 5								Proteína regulada por andrógenos del riñón
Receptor 6 acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina	Desintegrina A y metaloproteinasas con motivos de tromboespondina 6								Supuesta proteína no caracterizada UNQ5830/PRO19650/PRO19816
Proteína de unión al factor de crecimiento transformante beta latente 1	Polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 1								Supuesta proteína no caracterizada UNQ6975/PRO21958
Matriilina 3	Fibulina 2								Taquicinina 3
Proteína similar a proteína mielina cero 1	Ficolina 1								Fosfoproteína secretada 1
Proteína similar a neurobeaquina 2	Citocina SL								Esclestorina
Nicastrina	Folistatina								Proteína similar a ADAMTS 2
ADP-ribosa pirofosfatasa, mitocondrial	Proteína de matriz extracelular relacionada con FRAS1 1								Proteína que contiene dominios ricos en cisteína del receptor Scavenger LOC284297
Protocadherina 15	Enamelina								Triptasa beta-1
Factor de crecimiento placentario	Proteína de unión a hialuronano y proteoglicano 1								Triptasa delta
Proteína beta-1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa de manosa unida en O 1	Miembro 3 de la subfamilia A del receptor similar a inmunoglobulina de leucocitos								Supuesta proteína de la región crítica del síndrome de coloboma vertical del iris 9
Probable hidrolasa PNKD	Interleucina 17F								Proteína que contiene dominios de plexina 1
Pleiotrofina	Proteína accesoria del receptor de interleucina 1								Homólogo de MC51L-53L-54L (fragmento)

Receptor del poliovirus	Inhibidor de serina proteasa de tipo Kazal 5	Citocromo P450 4X1	Proteína placentaria similar a COBW (fragmento)
Receptor de reticulón 4	Caliceína 15	Citocromo P450 4Z1	Factor similar al receptor de citocinas 2
Proteína amiloide A sérica	Interferón alfa-14	Proteína CREG2	Beta-defensina 103
Globulina de unión a la hormona sexual	Beta-1-glicoproteína específica del embrazo 4	Miembro 9 subfamilia B del homólogo de DnaJ	Beta-defensina 106
Miembro 6 de la familia SLAM	Colagenasa 3	Dipeptidasa 3	Hialuronidasa 3
Proteína asociada a la membrana sarcolémica	Metaloproteínasa de matriz 16	Proteína de la membrana FAM174A	Cadena alfa del receptor de interleucina 28
Proteína que contiene dominios sushi, factor tipo A de von Willebrand, EGF y pentraxina 1	Polipéptido activador de adenilato ciclasa pituitaria	Proteína que contiene dominio de tiorredoxina 15	Proteína que contiene dominio de glicosiltransferasa 54
Globulina de unión a tioxina	Procinetina 2	Proteína FAM19A4	Proteína similar a cordina 1
Proteína que contiene dominio transmembrana y de enrollamiento enrollado 1	Proteína de unión al factor de crecimiento transformante beta latente 3	Adenosina monofosfato-proteína transferasa FICD	Supuesta proteína no caracterizada UNQ9370/PRO34162
Proteasa transmembrana, serina 3	Somatolibarina	Prencilisteína de tipo oxidasa	Receptor de netrina UNC5B
Miembro 10C de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral	Proteína que contiene dominio de tromboespondina de tipo 11	Proteína tipo interacción con fitanoil-CoA hidroxilasa	Proteína en forma secretada del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos FGFR-1 (Fragmento)
Miembro 11B de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral	Factor angiogénico con dominios parche G y FHA 1	Regulador del transporte de iones que contiene dominio FXD 4	Proteína no caracterizada ENSP00000244321
Serotransferrina	Receptor de tipo III de TGF-beta	Factor de crecimiento/diferenciación 11	ECE2
Triptasa beta-2	Subunidad beta de tirotrina	Factor neurotrófico de dopamina cerebral	EPA6
Proteína YIPF5	Proteína no caracterizada C19orf36	GTPasa con bucle de GPN 2	Supuesto receptor de interleucina 18 soluble 1
Proteína asociada a proteínas de la membrana asociadas a vesículas B/C	Proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral de C1q del complemento 2	Proteína transmembrana que puede inducirse por la hormona del crecimiento	Supuesta proteína que contiene dominio de abhidrolasa FAM108A6
ADNc, FLJ96669, muy similar a proteína secretada de <i>Homo sapiens</i> ácida rica en cisteína (osteonectina) (SPARC), ARNm	Miembro 5 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa	Proteína que contiene glicerofosfodiéster fosfodiesterasa2	Supuesta proteína similar que contiene dominios V-set e inmunoglobulina ENSP00000303034
ADNc FLJ77519, muy similar a proteína secretada de <i>Homo sapiens</i> relacionada con frizzled, ARNm	Proteína similar a N-acetilgalactosaminiltransferasa polipeptídica 2	Proteína que contiene dominios WAP, kazal, inmunoglobulina, kunitz y NTR 1 B	Variante de transcrito antigénico de maduración de células 4 (miembro 17 de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral)
Antígeno CD6 de diferenciación de células T	Proteína 1 de homólogo de hendidura	Proteína que contiene motivo KDEL 1	Proteína UPF0672 de tipo C3orf58
Pikachurina	Variante de hormona del crecimiento	Adipofilina	Metiltioribosa-1-fosfato isomerasa
Proteína 1 similar a fibrinógeno 1	Proteína relacionada con angiopoyetina 3	Proteína similar a lactasa	17-beta hidroxisteroide deshidrogenasa 13
Interleucina 32	Proteína relacionada con angiopoyetina	Condromodulina 1	Aminopectidasa B

Matrilina 4	7	Ecto-ADP-ribosiltransferasa 5	Cadena alfa-6(VI) del colágeno	Dermicidina
Antígeno asociado a espermatozoides 11B		Proteína relacionada con anhidrasa carbónica 11	Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 33	Meteorina
Factor de coagulación XII		Probable ribonucleasa 11	Proteína que contiene dominio MANS C1	Proteína similar a metiltransferasa 7A
Hepcidina		Probable carboxipeptidasa X1	Lipocalina 15	NL3
Klotho		Proteína FAM3D	Arlisulfatasa I	N-acetiltransferasa 15
Serplicina		Quimiocina con motivo C-X-C 14	Candidato al desarrollo del mesodermo 2	Efrina A4
Tomorregulina 2		Beta-defensina 127	Proteína relacionada con Dickkopf1	Proteína Plunc
Proteína similar a cordina 2		Beta-defensina 129	Podocano	Calicreina 11
Miembro 6B de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral		Proteína secretora que contiene dominio LCCL rica en cisteína 2	Proteína que contiene dominios de fibronectina tipo III1	Proteína secretada inducida por WNT1 1) variante de corte y empalme x (Fragmento)
Proteína transmembrana UPF0414 de tipo C20orf30		Factor de crecimiento de fibroblastos 21	Neurotrimina	Miembro 10 de la familia de interleucina 1
Miembro C de la familia 4 del dominio de lectina de tipo C		Plasma alfa-L-fucosidasa	Receptor olfativo 10W1	PLA2G2D
Proteína UPF0317 de tipo C14orf159, mitocondrial		Gastroquina 1	Proteína PARM-1	Proteoglicano 3
Netrina G2		Gastroquina 2	Proteína que contiene dominio PDZ 2	Péptido similar a insulina INSL5
Metaloeductasa STEAP2		Glutión peroxidasa 7	Proopirregulina	Proteína similar a olfactomedina 3
Proteína que contiene dominio sushi 4		Proteína similar a HHIP 1	Proteína 1 de poliquistosis renal de tipo1	Glicoproteína extracelular lacritina
Proteína YIF1 B		Interferón kappa	WLP514	Retinol deshidrogenasa 13
Apolipoproteína M		Apolipoproteína C-I	Metaloproteína de matriz 26	Defensina de neutrófilos 3
Cadena beta de proteína de unión a C4b		Potenciador de endopeptidasa C de procolágeno 2	Proteína similar a RELT 2	GLGQ5807
Cadena beta de glicoproteína CD8 de la superficie de células T		Factor de determinación izquierda-derecha 1	Miembro E3 de la familia 35 de portador de solutos	TUFT1
Quimiocina con motivo C-C 3 de tipo 1		Miembro de la familia LGI con repeticiones ricas en leucina 4	Transportador de zinc ZIP9	DRLV8200
Factor de crecimiento de fibroblastos 8		Subunidad Abraxas del complejo BRCA1-A	Noelina 2	IDLW5808
Proteína del núcleo de sialomucina24		Proteína de cremallera de leucina 2	Proteína similar a Seizure 6 2	UBAP2
Ligando 2 de muerte celular programada 1		Neurexoflina 3	Semaforina 3A	Proteína relacionada con C1q/TNF 8
Proteína secretada y transmembrana 1		Osteomodulina	Semaforina 4C	KIR2DL4 (fragmento)
Proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral de C1q del complemento 6		Proteína que contiene dominio del inhibidor de serina proteasa de tipo Kazal 1	Proteína que contiene dominio de abhidrolasa 14A	Variante de transcripto 2 de la superfamilia 2 del factor similar a quimiocina
Receptor de hormonas similares a mucina que contiene módulo similar a EGF de tipo3		Proteína asociada a la membrana del acrosoma de espermatozoide 3	Proteína que contiene dominios de repetición de anquirina 36	Proteína transmembrana asociada a queratocitos 1

Noelina 3	Miembro 1 de la familia 3A de secretoglobinas	Proteína shisa 4	GKGM353
Proteína de unión a odorante 2b	Tsukushin	Neuromedina U	MATL2963
Urotensina 2	Claudina 2 (SP82)	Homólogo de Nodal	NINP6167
Vitrina	Proteína relacionada con el factor H del complemento 2	Sinaptogrina 2	Tipo POM121
Proteína de la ruta de señalización inducible por WNT1 3	Leucina con repeticiones ricas en leucina que contiene la superfamilia de inmunoglobulinas	Proteína de tipo 2 asociada al inhibidor 1 de angiogénesis específico del cerebro 2	RTFV9368 (regulación por incremento dependiente de SLE 1)
ADNc FLJ75759, muy similar a folistadina de <i>Homo sapiens</i> de tipo 3 (glicoproteína secretada) (FSTL3), ARNm	Proteína de interacción con el receptor de nogo que contiene dominios similares a inmunoglobulina y repeticiones ricas en leucina 1	Proteína que contiene dominios de enrollamiento enrollado 104	Proteína de interacción con el receptor de nogo que contiene dominios similares a inmunoglobulina y repeticiones ricas en leucina 4
Enzima convertidora de angiotensina 2	Kin de proteína similar a IRRE 3	Miembro 20 de la familia de proteína transmembrana L6 4 L6	KCNQ2
Adiponectina	Transductor de señales de células hematopoyéticas	Proteína transmembrana 107	ELCV5929
Proteína relacionada con angiopoyetina 4	Subunidad beta de follitropina	Proteína transmembrana 143	KVVM3106
Apolipoproteína A-V	Proteína con actividad inhibidora del melanoma 3	Proteína transmembrana 178	ISPF6484
Asporina	Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 4	Proteína transmembrana 205	LKHP9428
Proteína que aumenta la permeabilidad bactericida	Transportador de zinc 5	Proteína transmembrana 41 A	VNFT9373
Proteína que contiene dominio CLUB 1	Proteína neuronal con repeticiones ricas en leucina 1	Proteína transmembrana 50A	ACAH3104
Proteína de la capa intermedia del cartilago 1	Glicoproteína endosómica apical	Proteína transmembrana 50B	RVLA1944
Beta-Ala-His dipeptidasa	Proteína amiloide A-4 sérica	Interleucina 28B	Wpwp3002
Cadena alfa-1(V) del colágeno	Probetacelulina	Pentraxina neuronal 2	ZDHC11
Cadena alfa-1(XXV) del colágeno	Beta-1,4-galactosiltransferasa 7	Coletrina	AGLW2560
Estradiol 17-beta-deshidrogenasa 11	3-hidroxitubitrato deshidrogenasa tipo 2	Proteína transmembrana 92	TSSP3028
Miembro 10 de la subfamilia C de homólogos de DnAJ	Chaperona específica de C1GALT1 1	Proteína transmembrana 95	RFVG5814
Proteína que contiene dominios similares a EGF 6	Beta-caseína	Proteína transmembrana 9B	SHSS3124
Cadena A del factor de coagulación XIII	Kappa-caseína	Probable carboxipeptidasa PM20D1	MMP19
Glucosa-6-fosfato isomerasa	Proteína transmembrana C2orf18	Tetraspanina 12	GSQS6193
Hormona reguladora del apetito	Cadena catalítica de carboxipeptidasa N	Tetraspanina 13	VGPW2523
Subunidad beta de interleucina 12	Antígeno CD320	Tetraspanina 15	LMNE6487
Interleucina 22	Sulfato de condroitina sintasa 1	Proteína transmembrana UPF0513	ALLA2487
Intelectina 1	Sulfato de condroitina sintasa 2	Proteína de desacoplamiento mitocondrial 4	GAL11870

Proteína inactivada del glioma rica en leucina 1	Molécula similar a CMRF35 7	Poliserasa 2	FRSS1829
Antígeno linfocítico 96	Homólogo de la proteína canopy 3	Probable palmitoiltransferasa ZDHHC24	MRSS6228
Matrilisina	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta 3	Proteína de unión de zona pelúcida-espermatzoide 1	GRPR5811
Mucina 20	Proteína similar a delta 4	Proteína de unión de zona pelúcida-espermatzoide 2	AVLL5809
Proteína convertasa subilisisa/kexina tipo 9	Receptor relacionado con el factor de crecimiento epidérmico similar a delta y Notch	Subunidad 7 del complejo de Golgi oligomérico conservado	Exón C-term. del receptor SCR9 de CR1 C3b/C4b (o 16) SCR = repeticiones cortas de consenso
Proteína de reconocimiento de peptidoglicanos	Dolicol cinasa	Proteína del receptor de adiponectina 2	PIKR2786
Proteína inducida por interferón de 17 kDa	Enzima de conversión de endotelina de tipo 1	Cadena beta C de inhibina	Proteína A7 de unión a calcio S100 de tipo 3
Proteína Wnt-4	Proteína de la membrana integral 2B	Brorina	GTWW5826 (proteína LP5085)
Factor inflamatorio de aloinjertos de tipo 1	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 5	Semaforina 3C	KTIS8219 (HCG2020043)
Proteína ligada al cromosoma X que contiene repeticiones de armadillo 3	Moléculas de adhesión selectiva a células endoteliales	Sulfato de heparano glucosamina 3- osulfotransferasa 2	Proteína de unión a hialuronano y proteoglicano 4
Sulfato de condroitina N-acetilgalactosaminiltransferasa 1	Proteína que contiene dominios similares a péptido señal, CUB y EGF 1	Transcrito de solapamiento del receptor de leptina de tipo 1	Micronovel
Quitotriosidasa 1	Proteína relacionada con el factor H del complemento 3	Proteína similar a SPARC 1	SAMK3000
Proteína que contiene dominios de claudina 1	Porrelaxina H1	Fibulina 7	VFLL3057
Erina 2	Proteína relacionada con folistatina 1	Homólogo de proteína HEG 1	CVWG5837
Proteína que contiene dominios de glucosiltransferasa 8 1	Globósido alfa-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa 1	Proteína que contiene dominios de fibrinógeno C 1	VGSA5840
Proteína de la membrana de Golgi 1	Gamma-glutamil hidrolasa	Miembro A de la fosfolipasa A1	GHP3125
Probable receptor acoplado a proteína G125	Cadherina 24	Proteína rica en prolina salival básica 2	GRTR3118
Cadena alfa del receptor de interleucina 20	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa 3	Proteína asociada con la espermatogénesis 6	PAMP6501
Galectina 7	Receptor acoplado a la proteína G 56	Proteína que contiene repeticiones de sushi SRPX2	LTLL9335
Ligando 4 de NKG2D	Proteína de unión a hialuronano 2	Homólogo de proteína de gastrulación torcida 1	VCEW9374
L-amino-ácido oxidasa	Factor de crecimiento similar a EGF de unión a proheparina	Torsina 1B	AHPA9419
Protil 3-hidroxilasa 1	Glicoproteína rica en histidina	Proteína Wnt-5a	MDHV1887
GPI etanolamina fosfato transferasa 2	Sulfotransferasa de hidratos de carbono 14	Proteína de unión a acrosina	HSAL5836
GPI etanolamina fosfato transferasa 3	Cadena beta del receptor de interleucina 20	Miembro B de la familia 18 del dominio de lectina de tipo C	LHLC1946

Proteína portadora mitocondrial de unión a calcio SCA ₂ (proteína portadora mitocondrial de unión a calcio pequeña 2)	Miembro 3 de la familia de pirofosfatasa/fosfodiesterasa	Proteína asociada al carcinoma del epitelio nasal, pulmonar y del paladar elongado 3 (proteína de unión a ligandos RYA3)
Proteína asociada al tensioactivo pulmonar A2	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7	LPPA601
Factor de corte y empalme, rico en arginina/serina 16	Kalistatina	PINK1
Alfa-N-acetilgalactosaminidasa 6	Proteína que contiene dominios de fibronectina tipo III 3B	SERH2790
Receptor relacionado con Ig IL-1 única	Receptor del factor inhibidor de la leucemia	FLFF9364
Tectonic-3	Homólogo B de Lin-7	APELINA
Miembro 11 de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral	Proteína transmembrana relacionada con tioredoxina 1	GLSH6409
Miembro 19 de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral	Proteína que contiene dominio de desintegrina y metaloproteinasa 32	SFVP2550
Palmitoiltransferasa ZDHC9	Proteína que contiene el dominio Ly6/PLAUR 3	RRLF9220
Fibulina 5	Miembro A de la familia 14 del dominio de lectina de tipo C	PTML5838
Inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z	Homólogo de proteína cornichon	VLGN1945
Alfa-2-macroglobulina	Proteína FAM151A	AVPC1948
Proteína relacionada con agouti	Proteína de unión a FK506 14	AWGG2491
Alfa-amilasa pancreática	Neuropilina y proteína similar a Tollid 2	PSVL6168
Péptidos natriuréticos B	Protocadherina beta-13	LCII3035
Factor natriurético atrial	Prenilcisteína oxidasa 1	PPRR6495
Ceramidasa neutra	Peflina	RLSC6348
Beta-2-microglobulina	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa de tipo 1	CSRP2BP
Proteína morfogenética ósea 4	Antígeno de células madre de la próstata	GLLV3061
Biotinidasa	Homólogo 2 de proteína de parche	GWSI6489
Proteína M130 de tipo 1 rica en cisteína del receptor eliminador	Quitobiosidifosfodolicol betamanosiltransferasa	ADNc FLJ53955, muy similar a la proteína secretada relacionada con frizzled 4
Carboxipeptidasa B2	Homólogo 1 de proteína sel-1	PIIF
Carboxipeptidasa Z	ProSAAS	VSSW1971
Quimiocina con motivo C-C 5	Lectina similar a Ig de unión a ácido siálico 9	KLIA6249

Quimiocina con motivo C-C 7	Proteína similar a SLIT y NTRK 1	Proteína no caracterizada C4orf29	ALLW1950
Quimiocina con motivo C-C 8	Estaterina	Proteína que contiene dominio CUB 2	GVEI466
Glicoproteína CD59	Testisina	Proteína del transcrito similar a Trem 4	ESFI5812
Factor I del complemento	Proteína similar al canal transmembrana 5	Proteína no caracterizada C6orf58	GNNC2999
Clusterina	Proteasa transmembrana, serina 4	Condroadherina	AAGG6488
Cadena alfa-2(I) del colágeno	Supresor de la metástasis KISS-1	Proteína de la capa intermedia del cartilago 2	HHSL751
Cadena alfa-1(III) del colágeno	Polipéptido amiloide de los islotes	Proteína no caracterizada C10orf25	Beta-defensina 108B
Cadena alfa-1(IV) del colágeno	Proteína del transcrito similar a Trem 2	Isthmin-1	Beta-defensina 118
Cadena alfa-3(IV) del colágeno	Proteína que contiene dominio de tioredoxina 12	Cistatina 8	Beta-defensina 124
Cadena alfa-5(IV) del colágeno	Factor de crecimiento endotelial vascular B	Cardiotrofina 1 (CT-1)	Beta-defensina 125
Cadena alfa-3(VI) del colágeno	Factor de crecimiento endotelial vascular C	Quimotripsinógeno B	Beta-defensina 126
Componente C6 del complemento	Reticulocalbina 3	Quimiocina con motivo C-X-C 9	Desoxirribonucleasa-1 de tipo 2
Cadena alfa-1(IX) del colágeno	Fibrilina 1	Quimiocina con motivo C-X-C 13	Estaniocalcina 2
Cadena alfa-1 (X) del colágeno	Proteína FAM3A	EMILIN 3	Molécula específica de células endoteliales 1
Cadena alfa-1(XVII) del colágeno	Proteína G7c	Secretagogina	Carboxilesterasa 7
Cadena alfa-1(XXI) del colágeno	Neuropilina y proteína similar a Tollid 1	Proteína secretora del epidídimo E3-alfa	Homólogo de la proteína NOV
Subunidad alfa del coatómero	Beta-1-glicoproteína específica del embrazo 11	Epifcano	Proteína UPF0528FAM172A
Receptor del complemento de tipo 1	Serpina B4	Proteína FAM5C	Subunidad beta de interleucina 27
Cistatina SN	ADAM DEC1	Factor de crecimiento de fibroblastos 20	Proteína FAM3C
Desoxirribonucleasa-1	Glucocinasa dependiente de ADP	Proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos 3	Proteína 1 similar al factor derivado de células estromales 2
Proteína de matriz extracelular 1	Alfa-amilasa 2B	Proteína transmembrana 204	Miembro A1 de la subfamilia 1 de butirofilina
Receptor III-A de la región de Fc de inmunoglobulina gamma de baja afinidad	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa 3	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina 4	Proteína asociada a queratinocitos transmembrana 2
Alfa-fetoproteína	Péptido relacionado con genes de calcitonina 2	Factor de coagulación V	Receptor del Fc de inmunoglobulina alfa
Factor de crecimiento de unión a heparina 2	Carboxipeptidasa E	Factor de coagulación VII	EMILIN 2
Cadena gamma del fibrinógeno	Factor de citocinas similar a cardiotrofina 1	Pro-MCH	Receptor de tipo A de efrina 10
Factor de crecimiento/diferenciación 5	Cadena alfa-2(VIII) del colágeno	Receptor gamma de folatos	Exostosina tipo 2
Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial	Homólogo de Crumbs 2	Mucina 7	Proteína relacionada con folistatina 4
Proteína de unión al factor de	Fosfoproteína ácida de la matriz de la	Péptido similar a galanina	Proteína relacionada con folistatina 5

crecimiento similar a la insulina 3	dentina 1			
Factor de crecimiento similar a la insulina IA	Moléculas de adhesión celular del síndrome de Down	Hemicentina 1		Proteína transmembrana 66
Región de la cadena C de Ig gamma-1	Miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas 1	Interleucina 6		Factor de crecimiento/diferenciación 2
Región de la cadena C de Ig gamma-2	Interleucina 4	Factor de crecimiento/diferenciación embrionario 1		Receptor alfa-4 de la familia de GDNF
Región de la cadena C de Ig gamma-3	Subunidad alfa del receptor de interleucina 6	Interleucina 8		Región de la cadena C de Ig gamma-4
Insulina tipo 3	Interleucina 24	Gremlin 2		Antígeno linfocítico 86
Cadena pesada del inhibidor de inter-alfa-tripsina	Ladina 1	Estromelina 2		Cadena beta E de inhibina
Proteína UPF0378 de tipo KIAA0100	Miembro I de las lipasas	Probable receptor acoplado a proteína G-171		Proteína que contiene dominio GRAM 1C
Kininógeno 1	Proteína relacionada con la lipasa pancreática 1	Papalina 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 asociada a la remodelación de la matriz 5	Neuromedina B		Interferón alfa-6
Subunidad beta-1 de laminina	Netrina 4	Mimecan		Miembro 21 de la superfamilia de inmunoglobulinas
Proteína-lisina 6-oxidasa	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos	Metaloproteinasa de matriz 19		Agrina
Multimerina 1	Quimiocina con motivo C-C 22	Interleucina 11		Prolactina
Vasopresina-neurofisiina 2-coeptina	Nictalopina	Interleucina 17A		Proteína similar a Kelch 11
Nidógeno 1	Osteocalcina	Interleucina 18		Proteína Wnt-16
Fosfolipasa A2,	Proteína rica en prolina salival básica 3	Interleucina 26		Properdina
Perforina 1	Beta-1-glicoproteína específica del embarazo 10	Interleucina 28A		Caliceína 13
Fosfolipasa D específica de fosfatidinositol-glicano	Proteína transmembrana con repeticiones ricas en leucina FLRT2	Proteína que contiene dominios emp24 transmembrana 3		1-Acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa delta
Fibrocistina	R-espondina 3	Interleucina 29		Caliceína 9
Proteína de transferencia de fosfolípidos	Sialoadhesina	Péptido similar a insulina INSL6		Proteína S dependiente de vitamina K
Fosfatasa ácida prostática	Tripsina 3	Proteína Wnt-2b		Proteína similar a butirofilina 8
Proteína Z dependiente de vitamina K	Dipeptidasa 2	Beta-1-glicoproteína específica del embarazo 1		Subunidad beta-4 de laminina
Fosfoproteína rica en prolina ácida salival 1/2	Proteína que contiene dominio EGF de unión a colágeno y calcio 1	Proteína asociada a la membrana del acrosoma de espermatozoide 4		Receptor de ácido hialurónico endotelial del vaso linfático 1
Proteína de zona del embarazo	Proteína similar al gen 1 específico de célula germinativas	Subunidad gamma-3 de laminina		Cistatina SA
Prorelaxina H2	Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 31	Homólogo de lisil oxidasa 3		Proteína transmembrana 59
Semaforina 4D	Apolipoproteína O	Neurotensina/neuromedina N		Proteína similar a apolipoproteína(a) 2

Proteína del homólogo 2 de hendidura	Distroglicano	Proteína que contiene dominio MAM 2	Proteína similar a lisozima 2
Alfa-lectorina	Defensina de neutrófilos 4	Proteína asociada a microfibrillas 2	Proteína similar a lisozima 4
Tenascina-X	Proteína inducida por anfetamina 3	Proteína con actividad inhibidora del melanoma 2	Reelina
Factor de trébol 3	Subunidad APH-1 B de gamma-secretasa	Metaloporteinasa de matriz 24	Proteína de unión a retinol 4
Proteína del receptor de transferrina 1	Apolipoproteína C-IV	Metaloporteinasa de matriz 25	Anhidrasa carbónica 14
Factor de crecimiento protransformante alfa	Arilsulfatasa G	Netrina 1	Antígeno de nefritis tubulointersticial
Factor de crecimiento transformante beta-2	Factor de activación de la glia	Netrina 3	Neuropéptido W
Miembro 6 de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral	Proteína que contiene dominios de reclutamiento de caspasa18	Alfa-N-acetilgalactosaminidasa 1	Alfa-1,3-manosil-glicoproteína acetilglucosaminiltransferasa B
Miembro 1B de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral	Sulfato de heparano glucosamina 3-O-sulfotransferasa 3A1	Alfa-N-acetilgalactosaminidasa 3	Proteína que contiene dominios emp24 transmembrana 5
Miembro 5 de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral	Ectoenzima de degradación de hormonas de liberación de tirotrópina	Proteína reguladora del crecimiento derivado del melanoma	Proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral del C1q del complemento 3
Trombopoyetina	Guanilina	Péptidos relacionados con FMRFamida	Proteína similar a podocano 1
Péptidos VIP	Proteína similar al transportador de colina 3	Otoconina 90	Beta-1-glicoproteína específica del embarazo 5
Quitinasa de mamífero acida	17-beta-hidroxisteroide deshidrogenasa 14	Neurturina	Queratocano
Proteína secretora rica en cisteína 2	Polipéptido 1 similar a inmunoglobulina lambda	Neurexofilina 1	Fosfolipasa A2 secretora del grupo IIE
Proteína relacionada con haptoglobina	Miembro 14 de la subfamilia B del homólogo de DnaJ	Neurexofilina 2	Factor de determinación izquierdadera 2
Quimiocina con motivo C-C 26	Proteína sólo con caja F 8	Variante del factor de plaquetas 4	Ligando 2 de NKG2D
Colectina 11	Fibrolecina	Nociceptina	Metaloelastasa de macrófagos
Proteína con dominio similar a EGF rico en cisteína 2	Metionina-R-sulfóxido reductasa B3, mitocondrial	Proteína que contiene dominios V-set y transmembrana 1	Factor desencadenante expresado en células mieloides 1
Quimiocina con motivo C-X-C 16	Miembro 2 de la familia LGI con repeticiones ricas en leucina	Proteína rica en prolina 4	Factor similar al receptor de citocinas 1
Proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos 1	Proteína de transporte de vesículas GOT1 B	Péptido de liberación de prolactinas	Secretina
Miembro 5 de la familia de interleucina 1	Proteína de la membrana integral GPR177	Serina proteasa 33	Factor derivado de células estromales 2
Miembro 9 de la familia de interleucina 1	Probable receptor acoplado a proteína G78	Beta-1-glicoproteína específica del embarazo 8	Proteína similar a lisozima 6
Caliceína 5	Miembro 2 de la familia de HEPACAM	Retbindina	Serpina A9
Matrilina 2	Subunidad alfa del receptor de interleucina 27	Péptidos relacionados con FMRFamida	Proteína que contiene dominios de escleratina 1
Receptor 1 de la glicoproteína CD200	Proencefalina A	Ribonucleasa K6	Lisocardiopina aciltransferasa 1

de la superficie celular	Integrina alfa-10		Ribonucleasa T2	Glutamato carboxipeptidasa plasmática
Fosfatasa de ácido lisofosfatídico de tipo 6	Proteína que contiene motivos KTEL 1		Repetina	Proteína del homólogo 3 de hendidura
Factor de intercambio de nucleótidos SIL1	Miembro 5 de la subfamilia A del receptor similar a inmunoglobulina de leucocitos		Proteína similar al subcomponente C1r del complemento	Proteína que contiene dominios de alfa-2-macroglobulina similares a C3 y PZP 8
Proteína que contiene dominios de tromboespondina de tipo 14	Proteína que contiene dominios de fibronectina tipo III y repeticiones ricas en leucina 3	no	Glucosiltransferasa caracterizadaAER61	Proteína respondedora al receptor de ácido retinoico 2
Proteína de la ruta de señalización inducible por WNT1 2	Uteroglobina		Semaforina 3G	Proteína ácida del cartilago 1
Proteína que contiene dominio de bromo 9	Ligando de netrina G1		Miembro 1 de la familia 1C de secretoglobinas	Estaniocalcina 1
Proteína similar al antígeno CD99 2	Panexina 1		Miembro 1 de la familia 1D de secretoglobinas	Beta-tectorina
Proteína no caracterizada C1orf159	Protocadherina-12		Miembro 2 de la familia 1D de secretoglobinas	Factor de unión a proteínas tras GPI 3
Sulfotransferasa de hidratos de carbono 12	Protocadherina alfa-10		Serpina A12	Proteína del gen 1 específica de células germinativas
Probable serina carboxipeptidasa CPVL	Protocadherina beta-10		Serpina 12	Interleucina 21
Mucina 3A	Proteína transmembrana asociada a osteopetrosis 1		Proteína que contiene dominios de factor C de von Willebrand y EGF	Proteína que contiene dominios V-set e inmunoglobulina 4
Proteína que contiene dominios similares al receptor CUB y la zona pelúcida 1	Beta-galactósido alfa-2,6-sialiltransferasa 1		Desintegrina A y metaloproteinasa con motivos de tromboespondina 15	Proteína del grupo B que contiene dominios ricos en cisteína del receptor eliminador
Polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 14	Componente PIG-S de GPI transamidasa		Subunidad beta-2 del canal del calcio	Protitroliberina
Galectina 9	Proteína rica en prolina transmembrana 3		Inhibidor de metaloproteinasa 4	Semaforina 4A
Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 17	Sulfidril oxidasa 2		Proteína inmunomoduladora de células T	
Proteína neuronal con repeticiones ricas en leucina 2	Desintegrina A y metaloproteinasa con motivos de tromboespondina 16		Desintegrina A y metaloproteinasa con motivos de tromboespondina 10	Miembro 27 de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral
Sulfato de heparano N-desacetilasa/N-sulfotransferasa bifuncional 3	Proteína que contiene dominio SH2 3A		Linfopoyetina estromal tímica	Receptor similar a Toll 7
Tuftelina	Proteína transformante de SHC 4		Proteína transmembrana 130	
Proteína transportadora mitocondrial del cerebro	Proteína que contiene dominio de desintegrina y metaloproteinasa 23		Proteína asociada a la matriz del cartilago única	Proteína que contiene dominio de tioredoxina 16
Proteína que contiene dominios similares a péptido señal, CUB y EGF 3	Proteína similar a transducina beta proteína 2		Urocortina-2	Alfa-2-antiplasmina
Proteína sigma 14-3-3	Proteína que contiene dominio Tudor 10		Urocortina-3 (Proteína de dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP 3

Alfa-1-ácido glicoproteína 2	Miembro 3 de la superfamilia de proteínas transmembranas 9	Proteína AMBP	Proteína WFDC9
Proteína que contiene dominio A del factor de von Willebrand 1	Proteína que contiene dominios del factor D de von Willebrand factor D y EGF	Proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral del C1q del complemento de tipo 9	Desintegrina A y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 14
Proteína que contiene dominio de desintegrina y metaloproteinasas 9	Desintegrina A y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 17	Proteína relacionada con la inhibición del crecimiento y la inhibición 88	Proteína asociada a la membrana plasmática de adipocitos
Angiotensinógeno	Proteína similar al canal transmembrana 2	Proteína Wnt-10a	Homólogo de peroxidasa
Apolipoproteína A-II (Apo-AII) (ApoA-II)	Beta-1-glicoproteína específica del embrazo 3	Proteína Wnt-3a	Homólogo de la anquilosis progresiva
Apolipoproteína A-IV (Apo-AIV) (ApoA-IV)	Tenomodulina	Proteína de proto-oncogenes Wnt-3	Proteína similar a quitinasa 3 1
Apolipoproteína C-II (Apo-CII) (ApoC-II)	Tetraspanina 6	Proteína Wnt-6	Proteína UPF0672 de tipo CXorf36
Beta-2-glicoproteína 1	Proteína que contiene dominio de tiorredoxina 5	Proteína Wnt-9a	Arisulfatasa J
Proteína relacionada con la apoptosis 3	Factor de crecimiento endotelial vascular D	Citocina SCM-1 beta	Cortistatina
Beta-secretasa 2	Beta-1-glicoproteína específica del embrazo 9	Proteína de la membrana del gránulo de zimógenos 16	Ceruloplasmina
Transferasa del sistema ABO del grupo histo-sanguíneo	Semaforina 3F	Proteína de unión a la zona pelúcida 1	Proteína relacionada con angiopoyetina 5
Catepsina L2	Proteína similar a fosfatasa ácida 2	Homólogo de proteína de gradiente anterior 3	Proteína que contiene dominios de enrollamiento enrollado 126
Quimiocina con motivo C-C 3	Apolipoproteína de tipo O	Amelotina	Antígeno CD17
Miembro B de la familia 1 del dominio de lectina de tipo C	Beta-defensina 119	Proteína no caracterizada C5orf46	Homólogo de la proteína canopy 4
Regulador del canal de cloruro activado por calcio 1	Desintegrina A y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 12	Proteína cinasa que contiene dominio aarF no caracterizada 1	Proteína que contiene dominios de fibronectina tipo III C4orf31
Quimasa	Proteína FAM131A	Draxina	Proteína FAM180A
Cadena alfa-1 (VI) del colágeno	Proteína FAM3B	Factor de crecimiento de fibroblastos 18	Proteína básica de plaquetas
Cadena alfa del componente C8 del complemento	Proteína similar a beta-galactosidasa-1	Quimiocina con motivo C-X-C 11	Interferón épsilon
Componente C9 del complemento	Proteína similar a lisozima g 1	Proteína que contiene el dominio Ly6/PLAUR 6	Intelectina 2
Proteína que contiene dominios de oxidoreductasa de glucosa-fructosa 2	Proteína similar a la cadena pesada H5 del inhibidor de inter-alfa-tripsina	Miembro de la familia de la elastasa similar a quimotripsina 1	Alfa-1,3-manosil-glicoproteína 4-beta-Nacetilglucosaminiltransferasa A
Miembro 11 de la subfamilia B del homólogo de DnaJ	Proteína asociada al acrosoma de espermatozoide 5	Receptor de eritropoyetina	Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular
Miembro de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/ fosfodiesterasa 7	Proteína de interacción con el receptor de nogo que contiene dominios similares a inmunoglobulina y repeticiones ricas en leucina 2	Proteína de anclaje de glicosilfosfatidilinositol que contienen dominio MAM 2	ADNc FLJ77863, muy similar a proteína secretada y transmembrana de <i>Homo sapiens</i> 1 (SECTM1), ARNm
Aminopectidasa del retículo	Proteína asociada a tensioactivo 2	Metaloproteinasas de matriz 27	Lipocalina específica del epidídimo 6

endoplasmático 1	Proteína del receptor de adiponectina 1	Serina proteasa inactiva 35	Afamina
Tirosina-proteína cinasa receptora erbB-3	Proteína del receptor de adiponectina 1	Serina proteasa inactiva 35	Afamina
Proteína residente en el retículo endoplasmático ERp44	Domínios similares al factor de crecimiento epidérmico múltiples 6	Proteína que contiene dominios de enrollamiento enrollado 134	Probable ATPasa transportadora de cationes 13A5
Proteína de unión a IgGFc	Proteína neuroendocrina 7B2	Suprabasina	Glutatión peroxidasa 3
Proteína relacionada con el factor H del complemento 1	Alfa-1 B-glicoproteína	Miembro 4 de la familia 1D de las secretoglobinas	Claudina 18
Polipéptido Nacetilgalactosaminiltransferasa 2	Proteína que contiene dominios WAP, kazal, inmunoglobulina, kunitz y NTR 2	Proteína que contiene dominios V-set y transmembrana 2A	Supuesta proteína similar al receptor de inmunoglobulina de linfocitos citotóxicos KIR3DP1
Hemopexina	Arilacetamida desacetilasa tipo 1	ADM	Receptor de la fosfolipasa A2 secretora
Activador del factor de crecimiento de hepatocitos	Histatina 3	Proteína no caracterizada C2orf82	Haptoglobina
Proteína del gen del complejo principal de histocompatibilidad de clase I	Pro-neuregulina 3, isoforma unida a la membrana	Miembro de la familiar similar a factores de crecimiento insulínicos 1	Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 20
Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 6	Proteína de señalización de agouti	Proteína similar a cadherina 29	Proteína morfogenética ósea 3
Región de la cadena C de Ig delta	Claudina 8	Proteína morfogenética ósea 15	Antígeno estromal de la médula ósea 2
Interleucina 1 beta	Proteína UPF0454 de tipo C12orf49	Inhibidor de serina proteasa plasmática	Citocromo P450 20A1
Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 10	Proteína que contiene dominio A del factor de von Willebrand 5B1	Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 21	Proteína de aumento bactericida/de la permeabilidad de tipo 3
Molécula de adhesión de unión C	Cadherina 6	Alfa-lactalbumina	Homólogo 2 de proteína dpy-19
Proteína no caracterizada KIAA0319	Péptido antimicrobiano de catelicidina	Proteína de cohesión de cromátidas hermanas DCC1	Fosfolipasa A2 secretora del grupo IIF
Subunidad alfa-5 de laminina	Subunidad gamma-1 de laminina	Proteína de unión a galectina 3	Carboxipeptidasa B
Proteína que contiene dominios de fibronectina tipo III 4	Miembro de la familia SDR de deshidrogenasa/reductasa7B	Proteína que contiene dominios de cadena pesada de dineína 1	Proteína que contiene dominios de glucosiltransferasa 8 2
Lipoproteína lipasa	Quimiocina con motivo C-C 16	Quimiocina con motivo C-C 17	Proteína FAM19A1
Colagenasa intersticial	Quimiocina con motivo C-C 24	Acil-CoA reductasa grasa 1	Receptor de la familia de GDNF tipo alfa
Metaloproteínasa de matriz 9	Proteína que contiene repeticiones de HEAT C7orf27	Homólogo del factor de iniciación de brotes de atleta	Probable glutatión peroxidasa 8
Mucina 16	Cadena alfa-2(IX) del colágeno	Receptor de inmunoglobulina polimérico	Cistatina D
Mucina 2	Cadena alfa-3(IX) del colágeno	Proteína doppel similar a priones	Cistatina F
Mucina 5B	Colipasa	Quimiocina con motivo C-X-C 6	Acetilhidrolasa del factor de activación de plaquetas
Miocilina	Cadena alfa-1 (XXVII) del colágeno	Quimiocina con motivo C-X-C 10	Papalinsina 1
Receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidado 1	Subunidad 2 de carboxipeptidasa N	Beta-defensina 1	Miembro 12 de la familia 22 de portadores de solutos
Proteína del gen 1 sobreexpresado en tumor de próstata	Proteína neuronal transmembrana con repeticiones ricas en leucina 4	Proteína de unión a hialuronano y proteoglicano 2	Hormona somatomamotropina coriónica tipo 1
Serina/treonina-proteína cinasa de interacción con receptores 2	Proteína que contiene repeticiones de triple hélice de colágeno 1	Proteína que contiene dominios de desintegrina y metaloproteínasa 30	Regulador de proteína de dinámica de microtúbulos 3

Transportador de nucleósidos equilibrador 3	Endotelina 2	Supresor de homólogo condensado	Retinol deshidrogenasa 14
Selenoproteína P	Fibromodulina	Receptor beta de folatos	Galanina
Proteína asociada al tensioactivo pulmonar D	Receptor de Fc de tipo B	Sulfatase extracelular Sulf-2	Transcobalamina 2
Homólogo de proteína estimulado por gen 6 del ácido retinoico	Proteína que contiene dominio RAD18 de dedos de zinc C1orf124	Miembro 14 de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral	Proteína que contiene dominios de catecol-O-metiltransferasa 1
Factor de trébol 1	Factor de crecimiento/diferenciación 15	Artemina	Tripeptidil-peptidasa 1
Inhibidor de la ruta de la tromboplastina tisular 2	Nexina derivada de la glia	Cadena alfa-1 (XII) del colágeno	Transcrito similar a Trem 1 proteína
Protrombina	Progonaoliberina 1	Cadena alfa-1 (XIV) del colágeno	Activador de guanilato ciclasa 2B
Receptor similar a Toll 9	Granzima K	Beta-defensina 2	Coestimulador inducible de células T
Molécula de adhesión intercelular 4	Interferón alfa-17	Interleucina 21	
Interleucina 19	Interferón alfa-21	Interleucina 3	
Isthmin-2	Interferón alfa-8	Interleucina 7	Proteína similar al extremo N-terminal del homólogo 2 de Notch
Kin de proteína similar a IRRE 1	Interferón omega-1	Cadena alfa de inhibina	Subunidad beta-2 de laminina
Caliceína 10	Péptido similar a insulina placentaria temprana	Subunidad alfa-3 de laminina	Neuropilina 2
Proteína de unión al factor de crecimiento transformante beta latente 4	Proteína que contiene dominios EGF, latrofilina y siete transmembrana 1	Miembro de la familia SDR de deshidrogenasa/reductasa en el cromosoma X	Proteína de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF 1
Receptor alfa de tipo 2 similar a inmunoglobulina emparejada	Proteína con dominios de repetición de fibronectina tipo 3 y ankirina 1	Regulador del transporte de iones que contiene dominio FXYD 6	Tirosina-proteína fosfatasa kappa de tipo receptor
Proteína derivada de islotes de regeneración 3 alfa	Homólogo de lisil oxidasa 4	Incorporador de serina 2	Proteína derivada de islotes de regeneración 4
Proteína ubiquitina E3 ligasa RNF5	Lumicano	Estromelina 3	Taquicinina 4
Protaquinina 1	Adropina	Fosfoproteína secretada 1	Metaloпротеína de matriz 23
Proteína secretada relacionada con frizzled 1, isoforma CRA a	Proteína transmembrana con repeticiones ricas en leucina FLRT1	Proteína LACTB similar a serina beta-lactamasa, mitocondrial	Proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral del C1q del complemento 5
Proteína relacionada con plasmínogenos B	Nucleobindina 2	Galectina 3	Opticina
Probable palmitoiltransferasa ZDHHC16	Fosfolipasa A2	Prohormona pancreática	Glicoproteína prepequeña/secretada
Proteína relacionada con angiopoyetina 1	Proencefalina B	Beta-1-glicoproteína específica del embrazo 6	Proteína relacionada con pentraxina PTX3
Proteína UPF0510 de tipo C19orf63	Proteína de reconocimiento de peptidoglicanos I-beta	Proteína relacionada con Dickkopf 3	Carboxilesterasa 8
Proteína de tipo 1 rica en cisteína del receptor eliminador M160	Proteína con repeticiones ricas en leucina que contiene la superfamilia de inmunoglobulinas 2	Miembro 11 de la familia SDR de deshidrogenasa/reductasa	Proteína transmembrana relacionada con tiorreodina 4
Alfa-manosidasa que potencia la degradación de ER de tipo 2	Proteína que contiene dominios V-set e inmunoglobulina 2	Proteína derivada de islotes de regeneración 3 gamma	Proteína que contiene el dominio de la superfamilia facilitadora principal 2

Proteína 2 similar a beta-galactosidasa-1	Péptido YY	Proteína de dedos de RING 43	Caliceína 12
Receptor E de interleucina 17	Proteína de unión a retinol 3	Semenogelina 2	Proteína del núcleo de brevicano
Interleucina 20	Aterina	Mucina 15	Porimina
Interleucina 25	Homólogo de proteína de translocación SEC63	Sialoproteína ósea 2	Torsina 1A
Proteína que contiene dominio PDZ 11	Factor de crecimiento transformante beta-3	Linfotactina	Quimiocina con motivo C-C 23
Relaxina 3	Proteína Wnt-10b	Proteína alfa regulada por crecimiento	Testican 3
Serina carboxipeptidasa inducible por retinoides	Renalasa	R-espondina 2	Proteína rica en prolina salival básica 4
Proteína asociada al carcinoma del epitelio nasal, pulmonar y del paladar corto 2	Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 4	Proteína que contiene dominios transmembrana y de enrollamiento enrollado 3	Miembro 18 de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral
Proteína de dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP 5	Carboxipeptidasa A4	Quimiocina corregulada por VEGF 1	Hermano de CDO
Factor de crecimiento derivado de plaquetas C	Olfactomedina-4	ADM2	Beta-1,4-galactosiltransferasa 4
Proteína que contiene dominio de desintegrina y metaloproteína 33	Cadena lábil ácida del complejo de proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	Proteína similar a hidroxisteroide 11-betadeshidrogenasa 1	Miembro 9 de la familia SDR de deshidrogenasa/reductasa
Proteína que contiene dominio BSD 1	Amelogenina, isoforma Y	Proteína similar a Delta 1	Eppin
Molécula de adhesión celular 3	Arilsulfatasa F	Efrina A1	Otoancorina
Proteína relacionada con CDC45	Variante 2 de la subunidad beta de coriogonadotropina	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos de tipo 1	Tenascina R
Condrolactina	Beta-defensina 104	Receptor alfa-3 de la familia de GDNF	Factor de crecimiento
Diacilglicerol O-aciltransferasa 2	Beta-defensina 105	Receptor de plaquetas G124	Proteína TSPEAR
3-ceto-esteroide reductasa	Beta-defensina 107	Progonadoliberina 2	Hephaestina
Receptor C de interleucina 17	Proteína WFDC11	Caliceína 7	Proteína similar a butirofilina 3
Receptor D de interleucina 17	Proteína de dominio del núcleo de cuatro disulfuros WAP 6	Apolipoproteína F	Proteína similar a butirofilina 9
Subunidad 1 del complejo integrador	Epigen	Proteína CAS4	Subunidad gamma-2 de laminina
Molécula de tipo adhesión de unión	Proteína FAM19A5	Proteína similar a VIP36	Proteína LMBR1L
Proteína ubiquitina E3 ligasa LNX	Claudina 6	Proteína transportadora de magnesio 1	Mucina 21
Proteína neuronal transmembrana con repeticiones ricas en leucina 3	Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 19	Amina oxidasa sensible a amilorida [que contiene cobre]	Manosiligosacárido 1,2-alfa-manosidasa del retículo endoplasmático
Subunidad beta de metionina adenosiltransferasa 2	Desintegrina A y metaloproteínasa con motivos de tromboespondina 1	Proteína moduladora de autofagia regulada por daño al ADN 2	Glicoproteína principal de la membrana del gránulo secretor pancreático GP2
Proteína similar a podocalixina 2	Proteína COQ10 A, mitocondrial	Proteína transmembrana C17orf87	Semaforina 4B
Prominina 2	Proteína no caracterizada C19orf41	Proteína relacionada con el factor H del complemento 5	Semaforina 5B
Proteína que contiene dominios de plexina 2	Proteína no caracterizada C21orf63	Proteína de unión a FK506 7	Epsilon-sarcoglicano
Homólogo 4 de Roundabout	Homólogo 2 de proteína delta	Incorporador de serina 1	Proteína de unión a guanilato 5

Lactosilceramida sialiltransferasa	alfa-2,3-	Proteína de transcrito regulado por cocaína y anfetamina	Proteína que comprende dominios similares al transmembrana y ubiquitina 1	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 6
Miembro 2 de la familia de proteínas transmembranas SID1		Proteína de tipo 1 compañera de fusión de lipoma HMGIC	Proteína de tipo ERGIC-53	Serpina B3
Proteína que contiene dominio sushi 1		Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 18	Receptor similar a Toll 10	Homólogo B de proteína RMD5
Serina/treonina-proteína cinasa TAO2		Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 25	Receptor similar a Toll 8	Miembro 5 de la clase A del receptor eliminador
Proteasa transmembrana, serina 2		Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 3B	Selenoproteína T	Semaforina 6B
UDP-ácido glucurónico decarboxilasa 1		Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 3	Lectina similar a Ig de unión a ácido siálico 11	Proteína transmembrana 108
Proteína no caracterizada C10orf58		Proteína que contiene el dominio Ly6/PLAUR 4	Nexina de clasificación 24	Proteína que contiene dominio sushi 3
Proteína transmembrana relacionada con tioriodoxina 2		Subunidad 1 del complejo de epóxido reductasa de la vitamina K	Proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral del C1q del complemento 1	Proteína de unión al factor beta de crecimiento transformante 2
CMP-N-acetilneuraminato-beta galactosamida-alfa-2,3-sialiltransferasa		Desintegrina A y metaloproteínasa con motivos de tromboespondina 20	Supuesta proteína no caracterizada UNQ6494/PRO21346	Supuesta proteína no caracterizada UNQ6190/PRO20217
Supuesta proteína no caracterizada ENSP0000380674		Supuesta proteína no caracterizada ENSP0000381830	Variante del precursor de la proteína secretada y transmembrana 1	Variante del precursor de la proteína secretada y transmembrana 1
Proteína transmembrana 119		Proteína de la región crítica del síndrome del coloboma vertical del iris 1	Miembro A de la familia 18 del dominio de lectina de tipo C	Cadena alfa-1(XX) del colágeno
Proteína transmembrana 98		Proteína expresada en testículo 101	Proteína secretora rica en cisteína 3	Receptor de netrina UNC5D
Proteína de pre-linfocitos B 3		Xilosiltransferasa 2	Complemento C4-A	Mucina 13
Supuesta proteína no caracterizada C14orf144		Proteína FAM20A	Supuesta proteína no caracterizada PRO2829	Metaloproteasa dependiente de ATP YME1L1
Proteasa del sitio 1 del factor de transcripción unido a la membrana		Proteína que contiene dominios transmembrana e inmunoglobulina proteína 1	Regulador del canal de cloruro activado por calcio 2	Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 5
Ficolina (que contiene dominios de colágeno/fibrinógeno) 3 (antígeno Hakata) (NL3) (ficolina (que contiene dominios de colágeno/fibrinógeno) 3 (antígeno Hakata), isoforma CRA b)		Supuesta proteína similar al receptor de inmunoglobulinas de linfocitos citotóxicos KIR3DX1 (miembro 12 del agrupamiento de receptores de leucocitos)	Neuroblastoma supresor de tumorigenicidad 1	

Las proteínas terapéuticas proporcionadas en el presente documento no deben considerarse exclusivas. Más bien, como es evidente a partir de la divulgación proporcionada en el presente documento, los métodos de la invención son aplicables a cualquier proteína en la que se desee la unión de un derivado de ácido graso soluble en agua según la invención. Por ejemplo, se describen proteínas terapéuticas en el documento US 2007/0026485.

Proteínas de la coagulación sanguínea

En un aspecto, el material de partida de la presente invención es una proteína de la coagulación sanguínea, que puede derivarse del plasma humano o producirse mediante técnicas de ingeniería 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 documento EP 306 968.

Los polipéptidos terapéuticos tales como proteínas de la coagulación sanguínea incluyendo 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, tromboplastina tisular (TF) y proteasa ADAMTS 13 se degradan rápidamente por enzimas proteolíticas y se neutralizan por anticuerpos. Esto reduce su semivida y tiempo de circulación, limitando así su eficacia terapéutica. Se necesitan dosis relativamente altas y una administración frecuente para alcanzar y mantener el efecto terapéutico o profiláctico deseado de estas proteínas de la coagulación. Como consecuencia, la regulación adecuada de la dosis es difícil de obtener y la necesidad de administraciones intravenosas frecuentes impone restricciones en la forma de vida del paciente.

Tal como se describe en el presente documento, las proteínas de la coagulación sanguínea incluyendo, pero sin limitarse 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, tromboplastina tisular (TF) y proteasa ADAMTS 13 están contempladas por la invención. Tal como se usa en el presente documento, el término "proteína de coagulación sanguínea" se refiere a cualquier factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor de von Willebrand (VWF), factor FV (FV), factor X (FX), factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, tromboplastina tisular (TF) y proteasa ADAMTS 13 que presenta actividad biológica asociada con esa proteína de la coagulación sanguínea nativa particular.

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

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

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

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

La conversión de FVII en FVIIa también está catalizada por una serie de proteasas, incluyendo trombina, FIXa, FXa, factor XIa (FXIa) y factor XIIa (FXIIa). Para la inhibición de la fase temprana de la cascada, el inhibidor de la ruta de la tromboplastina tisular selecciona como diana el complejo de productos FVIIa/tromboplastina tisular/FXa.

Factor VIIa

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

El FVII se sintetiza en el hígado y se secreta como una glicoproteína monocatenaria de 48 kD. FVII comparte con todas las glicoproteínas de serina proteasa dependientes de vitamina K una estructura de dominio de proteína 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 las membranas lipídicas, un dominio carboxi-terminal de serina proteasa (dominio catalítico) y dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico que contienen un sitio de unión a iones de calcio que media la interacción con la tromboplastina tisular. La gamma-glutamyl carboxilasa cataliza la carboxilación de residuos 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. La vitamina K epóxido reductasa es necesaria para convertir de nuevo la forma de epóxido de vitamina K en la forma reducida.

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

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). Los genotipos de FVII diferentes pueden dar lugar a diferencias de varias veces en los niveles medios de FVII. Los niveles plasmáticos de FVII son elevados durante el embarazo en mujeres sanas y también aumentan con la edad y son más altos en mujeres y en personas con hipertrigliceridemia. El FVII tiene la semivida más corta de todos los factores procoagulantes (3-6 h). La concentración plasmática media de FVIIa es de 3,6 ng/ml en individuos sanos y la semivida circulante de FVIIa es relativamente larga (2,5 h) en comparación con otros factores de coagulación.

La deficiencia hereditaria de FVII es un trastorno hemorrágico autosómico recesivo poco frecuente con una prevalencia estimada en 1 caso por 500.000 personas en la población general (Acharya *et al.*, J Thromb Haemost. 2004; 2248-56). La deficiencia adquirida de FVII de los inhibidores también es muy rara. También 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 adquirida de FVII se produce espontáneamente o con otros estados, tales como mieloma, septicemia, anemia aplásica, con terapia con interleucina 2 y concentrado de inmunoglobulinas antitrombocíticas.

Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de referencia incluyen, por ejemplo, los números 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 polipéptidos. 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 la vitamina K que participa en la ruta intrínseca de la coagulación sanguínea al convertir FX a 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 en FX. La activación de FIX se produce por FXIa que provoca la escisión del péptido de activación de FIX para producir una molécula FIX activada que comprende dos cadenas mantenidas por uno o más enlaces disulfuro. Los defectos en FIX son la causa de la hemofilia B recesiva ligada al cromosoma X.

La hemofilia A y B son enfermedades hereditarias caracterizadas por deficiencias en los polipéptidos FVIII y FIX, respectivamente. La causa subyacente de las deficiencias es con frecuencia el resultado de mutaciones en los genes FVIII y FIX, que se encuentran en el cromosoma X. La terapia tradicional para las hemofilias a menudo implica la administración intravenosa de mezcla de plasmas o proteínas de coagulación semipurificadas de individuos normales. Estas preparaciones pueden estar contaminadas por agentes patógenos o virus, como priones infecciosos, VIH, parvovirus, hepatitis A y hepatitis C. Por tanto, existe la 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 del plasma (denominado tratamiento o terapia de sustitución o reemplazo de FIX).

Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de FIX pueden encontrarse, por ejemplo, en el n.º de registro de UniProtKB/Swiss-Prot P00740, y en la patente estadounidense n.º 6.531.298.

Factor VIII

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

El FVIII se sintetiza como un precursor de cadena sencilla de aproximadamente 270-330 kD con la estructura de

dominio A1-A2-B-A3-C1-C2. Cuando se purifica a partir de plasma (por ejemplo, "derivado de plasma" o "plasmático"), el FVIII se compone de 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 en el dominio B, la cadena pesada está en el intervalo de 90-220 kD.

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

15 La falta o disfunción del FVIII se asocia con el trastorno hemorrágico más frecuente, la hemofilia A. El tratamiento de elección para el tratamiento de la hemofilia A es la terapia de reemplazo con concentrados derivados de plasma o rFVIII. Los pacientes con hemofilia A grave con niveles de FVIII por debajo del 1%, reciben generalmente terapia profiláctica con el objetivo de mantener el FVIII por encima del 1% entre dosis. Teniendo en cuenta 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.

20 Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de referencia 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

30 El factor de von Willebrand (VWF) es una glicoproteína que circula en plasma como una serie de multímeros que oscilan en tamaño desde aproximadamente 500 hasta 20.000 kD. Las formas multiméricas de VWF se componen de subunidades de polipéptidos de 250 kD unidas entre sí por enlaces disulfuro. El VWF media la adhesión plaquetaria inicial al subendotelio de la pared del vaso dañado. Solo los multímeros más grandes presentan actividad hemostática. Se supone que las células endoteliales secretan grandes formas poliméricas de VWF y las 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 la estimulación.

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

40 El producto de traducción primario predicho a partir 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, con el VWF maduro que comprende 2050 aminoácidos (Ruggeri Z.A., y Ware, J., *FASEB J.*, 308-316 (1993).

45 Los defectos en el VWF son causales 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 falta completamente el VWF, y el 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, 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 multímeros intermedios y grandes. La VWD-2B se caracteriza por una pérdida de multímeros de mayor peso molecular. Otras enfermedades y trastornos relacionados con VWF son conocidos en la técnica.

50 Las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos de prepro-VWF están disponibles en los n.ºs de registro de GenBank NM_000552 y NP_000543, respectivamente.

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

A. Polipéptidos

65 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.

5 Las moléculas de proteínas terapéuticas 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 y variantes biológicamente activos de cualquiera de estas formas de proteínas terapéuticas. Por tanto, las proteínas terapéuticas incluyen aquellas que (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de más de aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%,
10 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, en una región de al menos aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400,
15 o más aminoácidos, a un polipéptido codificado por un ácido nucleico al que se hace 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 a la que se hace referencia tal como se describe en el presente documento, un fragmento inmunogénico del mismo y/o una variante modificada de manera conservadora del mismo.

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

25 Tal como se usa en el presente documento, "proteína terapéutica endógena" incluye una proteína terapéutica que se origina del mamífero destinado a recibir tratamiento. El término también incluye proteína terapéutica transcrita desde 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 destinado a recibir tratamiento.

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

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

40 Un "análogo", "variante" o "derivado" es un compuesto sustancialmente similar en estructura y que tiene la misma actividad biológica, aunque en determinados casos en un grado diferente, con respecto a una molécula que se produce de manera natural. Por ejemplo, una variante de polipéptido se refiere a un polipéptido que comparte una 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 natural del que se deriva el análogo, basándose en una o más mutaciones que implican (i) delección de uno o más residuos de aminoácidos en uno o más extremos terminales del polipéptido y/o una o más regiones internas de la secuencia de polipéptido 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" se refiere a un polipéptido que comparte la misma estructura o sustancialmente similar a un polipéptido de referencia que se ha modificado, por ejemplo, químicamente.

50 En diversas realizaciones, los análogos, variantes o derivados están diseñados para permitir, por ejemplo, la conjugación de otra molécula con el análogo, variante o derivado de proteína, formando así una proteína conjugada según la presente invención.

60 Los polipéptidos de variantes o análogos incluyen variantes de inserción, en las que se añaden uno o más residuos de aminoácidos a una secuencia terapéutica de aminoácidos de la proteína de la invención. Las inserciones pueden ubicarse en cualquiera o ambos extremos terminales de la proteína, y/o pueden colocarse dentro de las regiones internas de la secuencia terapéutica de aminoácidos de la proteína. Las variantes de inserción, con residuos adicionales en cualquiera o ambos extremos terminales, incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen etiquetas de aminoácidos u otros marcadores de aminoácidos. 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*.

65

En las variantes de deleción, se retiran uno o más residuos de aminoácidos en un polipéptido proteico terapéutico tal como se describe en el presente documento. Las deleciones pueden efectuarse en uno o ambos extremos terminales del polipéptido proteico terapéutico, y/o con la retirada de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína terapéutica. Por tanto, las variantes de deleción incluyen fragmentos de una secuencia terapéutica de polipéptidos proteicos.

En las variantes de sustitución, uno o más residuos de aminoácidos de un polipéptido proteico terapéutico se retiran 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 también son no conservadoras. Se describen sustituciones conservadoras a modo de ejemplo en Lehninger, [Biochemistry, 2ª edición; Worth Publishers, Inc., Nueva York (1975), págs.71-77] y se exponen inmediatamente a continuación.

SUSTITUCIONES CONSERVADORAS

CARACTERÍSTICA DE LA CADENA LATERAL	AMINOÁCIDO
No polar (hidrófobo):	
A. Alifático	A L I V P
B. Aromático	F W
C. Que contiene azufre	M
D. Límite	G
Polar sin carga:	
A. Hidroxilo	S T Y
B. Amidas	N Q
C. Sulfhidrilo	C
D. Límite	G
Cargado positivamente (básico)	K R H
Cargado negativamente (ácido)	D E

Alternativamente, las sustituciones conservadoras ejemplares se exponen inmediatamente a continuación.

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, miARN, 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 estrictas con un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos a la que se hace referencia tal como se describe en el presente documento, y variantes modificadas de manera conservadora de la misma; (2) tienen una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de nucleótidos mayor de aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o más, en 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), con respecto a una secuencia de ácido nucleico a la que se hace referencia tal como se describe en el presente documento. Las condiciones a modo de ejemplo de "hibridación estricta" incluyen hibridación a 42°C en formamida al 50%, 5X SSC, Na•PO4 20 mM, pH 6,8; y lavado 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 el contenido de nucleótidos GC de las secuencias que van a hibridarse. Las fórmulas convencionales en la técnica son apropiadas para determinar las condiciones de hibridación apropiadas. Véase Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) §§ 9.47-9.51.

25 Una secuencia polinucleotídica o polipeptídica "que se produce de manera natural" es normalmente de un mamífero que incluye, pero no se limita a, primates, por ejemplo, humanos; roedor, por ejemplo, rata, ratón, hámster; vaca, cerdo, caballo, oveja o cualquier mamífero. Los ácidos nucleicos y las 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 produce de manera natural).

30 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) la introducción de ADN recombinante en células procariotas o eucariotas, por ejemplo y sin limitación, transfección, electroporación o microinyección, (iii) el cultivo de dichas células transformadas, (iv) la expresión de la proteína terapéutica, por ejemplo, de manera constitutiva o tras la inducción y (v) el aislamiento de dicha proteína de la coagulación sanguínea, por ejemplo, del medio de cultivo o recogiendo las células transformadas, para obtener proteína terapéutica purificada.

40 En otros aspectos, la proteína terapéutica se produce por expresión en un sistema 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 mamíferos tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2.

45 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 la expresión procariota incluyen plásmidos tales como, y sin limitación, pRSET, pET y pBAD, en los que los promotores usados en los vectores de expresión procariota incluyen uno o más de, y sin limitación, lac, trc, trp, recA o araBAD. Los ejemplos de vectores para la expresión eucariota incluyen: (i) para la 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 la 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 la expresión en células de mamíferos, vectores tales como y sin limitación pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3 o pBPV, y vectores derivados de, 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.

60 En diversas realizaciones de la invención, las proteínas terapéuticas se modifican conjugando derivados de ácidos grasos solubles en agua o ligadores solubles en agua con uno o más hidratos de carbono en la proteína terapéutica. Por tanto, en una realización, la proteína terapéutica es una glicoproteína y se purifica de una célula huésped que permite la glicosilación (es decir, la proteína se glicosila *in vivo* y posteriormente se purifica como una glicoproteína). En diversas realizaciones, la proteína terapéutica es o no es una glicoproteína y se glicosila *in vitro* después de la

purificación de una célula huésped. Los métodos de glicosilación *in vitro* se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Meynial-Salles I y Combes D, Journal of Biotechnology 1996, 46: 1-14;/ Solá RJ y Griebenow K, BioDrugs 2010, 24: 9-21). Por supuesto, un experto en la técnica podría (1) purificar la proteína terapéutica; (2) modificar la proteína terapéutica para permitir la glicosilación *in vitro*, opcionalmente específica de sitio (por ejemplo, delecciones/inserción/sustituciones de aminoácidos); y (3) glicosilar la proteína modificada *in vitro* según los procedimientos conocidos en la técnica.

D. Administración

En una realización de la presente divulgación, 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 aceptables" se refieren a entidades moleculares y composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas tales como productos de agregación y escisión, y además no producen reacciones alérgicas u otras reacciones adversas cuando se administran usando vías bien conocidas en la técnica, tal como se describe a continuación. Los "portadores farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción clínicamente útiles y similares, incluyendo los agentes divulgados anteriormente.

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

Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones pueden llevarse a cabo con los niveles de dosis y el patrón seleccionados por el médico tratante. Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, tal como se describió anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el medicamento se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al fármaco, y la discreción del médico tratante.

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

ÁCIDOS GRASOS, DERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS Y CONJUGADOS DERIVADOS PROTEÍNAS Y ÁCIDOS GRASOS

En un aspecto, una molécula derivada de proteína terapéutica (una proteína terapéutica conjugada) proporcionada en el presente documento está unida a un derivado de ácido graso soluble en agua. Tal como se usa en la presente divulgación, un "derivado de ácido graso soluble en agua" comprende un ácido graso (es decir, un ácido carboxílico) conjugado con un ligador soluble en agua (por ejemplo, un ligador aminooxilo) tal como se describe en el presente documento. El derivado de ácido graso soluble en agua según la presente invención comprende un ácido graso o un

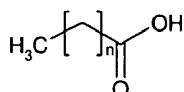
éster de ácido graso conjugado con un ligador aminoóxilo. Tales derivados de ácidos grasos, según la invención, son estables (es decir, no se liberan de la proteína), solubles en agua y capaces de unirse a albúmina sérica humana.

A. Ácidos grasos

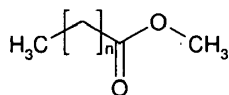
5 Los ácidos grasos (es decir, FA) incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, ácidos grasos de cadena ramificada (Mukherji *et al.*, Prog Lipid Res 2003; 42: 359-76) y derivados de los mismos que son capaces de unirse a albúmina sérica humana según la presente invención.

10 A modo de ejemplo, los ácidos grasos tienen la siguiente estructura general:

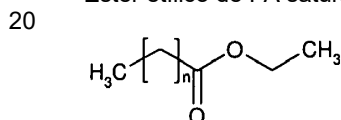
FA saturado: estructura general



15 Éster metílico de FA saturado: estructura general



Éster etílico de FA saturado: estructura general



25 Los ácidos grasos, según diversas realizaciones de la presente invención, también comprenden diversas estructuras alternativas (por ejemplo, ésteres metílicos o etílicos) u otras estructuras tales como las que contienen grupos terminales en posición ω (por ejemplo, grupos hidroxilo, amino, tio y carboxilo).

30 En una realización, el ácido graso es un ácido graso que se produce de manera natural. En diversas realizaciones, el ácido graso es un ácido graso de cadena corta (por ejemplo, menos de seis carbonos), un ácido graso de cadena media (por ejemplo, 6-12 carbonos), ácidos grasos de cadena larga (por ejemplo, más de 12 carbonos), o un ácido graso de cadena muy larga (por ejemplo, más de 22 carbonos). En otra realización, el ácido graso tiene entre 4 y 28 carbonos. En una realización, el ácido graso está en la configuración *cis*. En todavía otra realización, el ácido graso está en la configuración *trans*.

35 En una realización, el ácido graso es un ácido graso saturado de 12 a 20 carbonos de longitud. Tales ácidos grasos se conocen en la técnica, por ejemplo, C12 (ácido dodecanoico, ácido láurico), C14 (ácido tetradecanoico, ácido mirístico), C16 (ácido hexadecanoico, ácido palmítico), C18 (ácido octadecanoico, ácido esteárico) y C20 (ácido eicosanoico, ácido araquídico). Ejemplos de ácidos grasos insaturados son ácido miristoleico (C14:1), ácido palmitoleico (C16:1), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido araquidónico (C20:4). La mayoría de los ácidos grasos están disponibles comercialmente y pueden prepararse mediante diferentes métodos químicos (Recent Developments in the Synthesis of Fatty Acid Derivatives, editores: Knothe G y Derksen JTB, AOCS Press 1999, ISBN 1-893997-00-6.)

45 En diversas realizaciones de la presente invención, el ácido graso comprende 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ó 50 carbonos.

B. Derivados de ácidos grasos.

50 La presente invención proporciona la preparación de una nueva clase de derivados de ácidos grasos activados (derivados de FA) que pueden unirse a albúmina sérica humana. Los derivados de FA contienen un espaciador o ligador soluble en agua, que permite el manejo y la manipulación de derivados de FA en disolución acuosa (es decir, los derivados de ácidos grasos según la presente invención son solubles en agua, a diferencia de los ácidos grasos correspondientes de los que se derivan). Los derivados de FA contienen un grupo aminoóxilo activo, que permite el acoplamiento del derivado de FA a un resto de hidrato de carbono oxidado (predominantemente N-glicanos) de proteínas terapéuticas para formar uniones oxima estables. Tal como se usa en el presente documento, una unión "estable" significa que se forma un enlace covalente que es "no liberable" o no hidrolizable.

La modificación química a través de hidratos de carbono podría ser la opción preferida para proteínas de la coagulación como FVIII, FIX y FVIIa para formar conjugados con alta actividad residual.

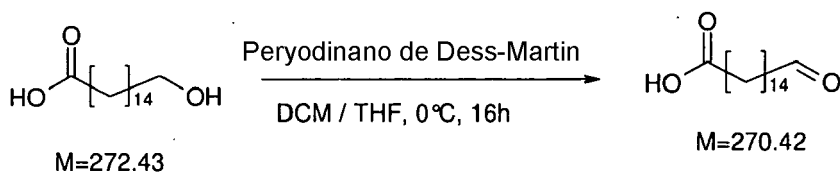
A modo de ejemplo, la siguiente estrategia representa una realización según la presente invención para preparar un derivado de FA soluble en agua que contiene un grupo aminoóxilo activo.

5 Estrategia 1:

El grupo ω-hidroxilo de un derivado de FA (por ejemplo, ácido 16-hidroxihexadecanoico) se somete a oxidación con peryodinato de Dess Martin para generar un grupo aldehído. En la siguiente etapa, un ligador de diaminoóxilo que contiene una cadena de PEG soluble en agua (por ejemplo, 3,6,9-trioxaundecano-1,11-dioxiamina) se acopla a este grupo aldehído para formar una unión oxima estable. El siguiente esquema representa un ejemplo según la estrategia 1:

10 Etapa 1: se oxidó selectivamente ácido 16-hidroxiesteárico con reactivo de Dess-Martin para producir ácido 16-oxoesteárico. El producto bruto se purificó por cromatografía usando gel de sílice como agente de separación.

15

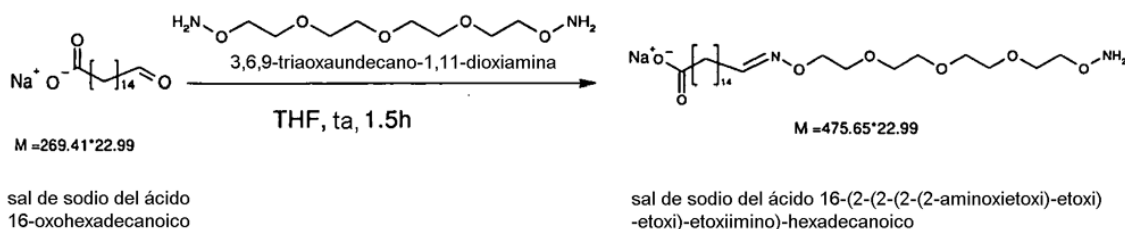


ácido 16-hidroxihexadecanoico

ácido 16-oxohexadecanoico

Etapa 2: se hizo reaccionar el resto 16-oxo de la sal de sodio del ácido 16-oxoesteárico con 3,6,9-trioxaundecano-1,11-dioxiamina. El producto bruto se purificó por cromatografía usando gel de sílice como agente de separación.

20



sal de sodio del ácido 16-oxohexadecanoico

sal de sodio del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxi)etoxi)-etoxi)-etoxi)imino)-hexadecanoico

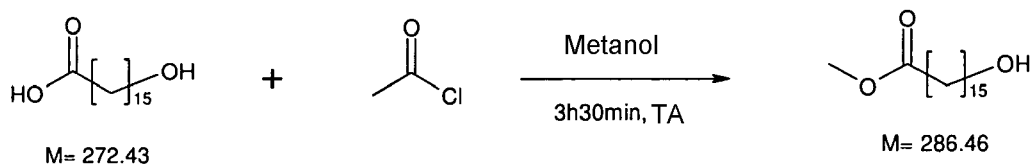
Alternativamente, otra realización, la siguiente estrategia se emplea para preparar derivados de FA solubles en agua que contienen un grupo aminoóxilo activo.

25

Estrategia 2:

El grupo carboxilo de un ácido graso ω-hidroxilo (por ejemplo, ácido 16-hidroxihexadecanoico) se esterifica con cloruro de acetilo. El grupo ω-hidroxilo de este derivado de éster metílico se activa con cloruro de mesilo para introducir un mejor grupo saliente. Luego, el grupo mesilo se hace reaccionar con un ligador de diaminoóxilo que contiene una cadena de PEG soluble en agua (por ejemplo, 3,6,9-trioxaundecano-1,11-dioxiamina) para formar un enlace aminoóxilo-metileno estable. Opcionalmente, el éster metílico puede hidrolizarse en disolución alcalina para generar un grupo carboxilo libre. El siguiente esquema representa un ejemplo según la estrategia 2:

35 Etapa 1: el resto de ácido carboxílico del ácido 16-hidroxihexadecanoico se protegió formando el éster metílico usando cloruro de acetilo como reactivo de metilación.

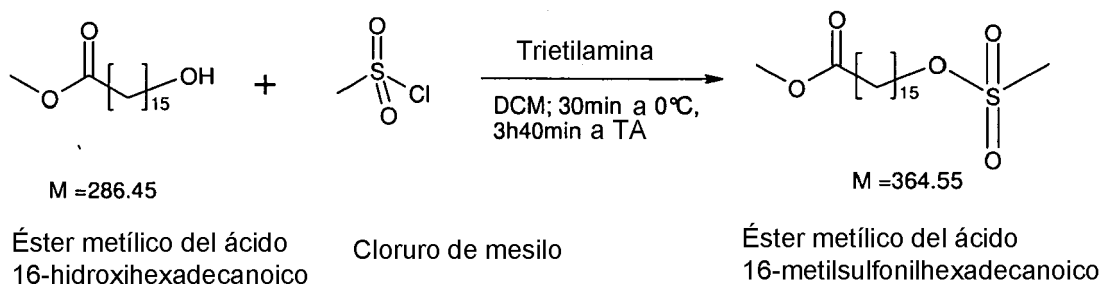


Ácido 16-hidroxihexadecanoico

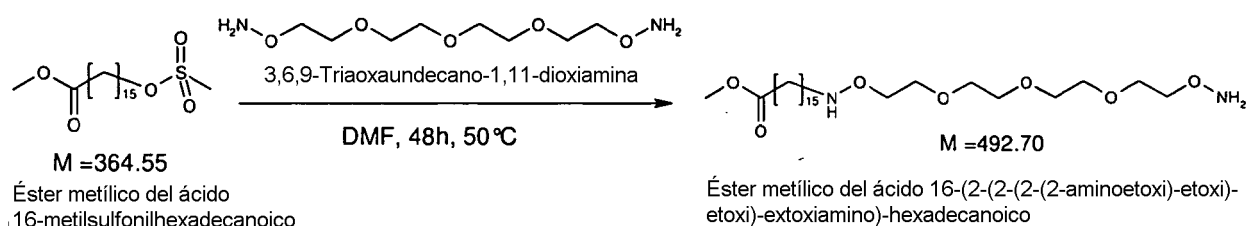
Cloruro de acetilo

Éster metílico del ácido 16-hidroxihexadecanoico

40 Etapa 2: el resto 16-hidroxilo de éster metílico del ácido 16-hidroxihexadecanoico se activó sustituyendo el grupo hidroxilo con mesilo, que es el mejor grupo saliente.



- 5 Etapa 3: el resto 16-mesilo de éster metílico del ácido 16-metilsulfonilhexadecanoico se sustituyó por un resto aminoóxido de la 3,6,9-trioxaundecano-1,11-dioxiamina bifuncional. El producto bruto se purifica por cromatografía usando gel de sílice como agente de separación.



- 10 Se divulgan estrategias adicionales en el presente documento, pero no forman parte de la presente invención.

Tal como se describe en el presente documento, se divulga el uso de otras químicas que incluyen, pero no se limitan a, hidrazidas para acoplamiento a grupos aldehído, ésteres de NHS para acoplamiento a grupos amino y maleimidas para acoplamiento a grupos SH libres de proteínas terapéuticas.

- 15 A modo de ejemplo, un éster metílico de ácido graso preparado tal como se describió anteriormente se hace reaccionar con un MAL-PEG-COOH disponible comercialmente (mal-PEG(12)-COOH/IRIS Biotech GmbH, Marktrechwitz, Alemania) tal como se describe en el presente documento. A modo de otro ejemplo más, un éster de ácido graso con un grupo amino reactivo se hace reaccionar con un NHS-PEG-NHS disponible comercialmente (NHS-dPEG(4)-NHS/IRIS Biotech GmbH, Marktrechwitz, Alemania) tal como se describe en el presente documento.
- 20

- Los ligadores solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua (por ejemplo, PEG). El ligador puede consistir en cualquier estructura química que contenga uno o más grupos funcionales, lo que aumenta su solubilidad en agua. Estos grupos funcionales podrían tener la capacidad de formar una carga negativa o positiva, haciendo que el ligador sea soluble en agua. En una realización, este grupo funcional incluye, pero no se limita a un grupo sulfo o carboxilo. Además, puede usarse cualquier grupo funcional polar, lo que hace que el ligador sea más soluble en agua. Ejemplos de esto son los grupos hidroxilo, amino, amido, maleimido, aminoóxido e hidrazida, así como los ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) y los ésteres de sulfo NHS.
- 25

- En diversas realizaciones, el polímero soluble en agua incluye, pero no se limita a, polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, poli(ácido siálico) (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, carboximetildextrano, poli(óxido de alquilen) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolona, poliacrililmorfolina, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico y poli(1-hidroximetiletlenhidroximetilformal) (PHF).
- 30
- 35

- En una realización, el polímero soluble en agua es PEG. En diversas realizaciones de la invención, el polímero soluble en agua comprende una longitud de cadena de entre aproximadamente 3 y 25 oxígenos. Por ejemplo, el polímero soluble en agua comprende 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 ó 25 oxígenos, en diversas realizaciones según la presente invención.
- 40

C. Conjugados de derivados de proteínas y ácidos grasos

- 45 La presente invención contempla sistemas ligadores de aminoóxido (es decir, en los que un derivado de ácido graso soluble en agua comprende un ligador aminoóxido). Por ejemplo, en una realización de la invención, la reacción de hidroxilamina o derivados de hidroxilamina con aldehídos (en un resto de hidrato de carbono tras la oxidación) para formar un grupo oxima se aplica a la preparación de conjugados de proteínas. Por ejemplo, una glicoproteína (una proteína terapéutica según la presente invención) se oxida en primer lugar con un agente oxidante tal como peryodato

de sodio (NaIO_4) (Rothfus JA y 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 clásica de Malaprade 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 tal agente oxidante son el tetraacetato de plomo ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$), acetato de manganeso ($\text{MnO}(\text{Ac})_3$), acetato de cobalto ($\text{Co}(\text{OAc})_2$), acetato de talio (TlOAc), sulfato de cerio ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) (documento US 4.367,309) o perrutenato de potasio (KRuO_4) (Marko *et al.*, J Am Chem Soc 1997, 119, 12661-2). Por "agente oxidante" se entiende un compuesto oxidante suave que es capaz de oxidar dioles vecinales en hidratos de carbono, generando así grupos aldehídos activos en condiciones de reacción fisiológicas.

La segunda etapa es el acoplamiento del polímero (derivado de ácido graso) que contiene un grupo aminoóxilo al resto de hidrato de carbono oxidado para formar una unión oxima. En una realización de la invención, esta etapa puede llevarse a cabo en presencia de cantidades catalíticas del catalizador nucleófilo anilina o derivados de anilina (Dirksen A y 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 realización de la invención, la unión oxima se estabiliza por reducción con NaCNBH_3 para formar una unión alcoxiamina. A continuación, se describen catalizadores adicionales. En otra realización, esta etapa se lleva a cabo en presencia de m-toluidina.

En una realización de la invención, las etapas de reacción para conjugar un ligador soluble en agua (derivado de ácido graso) con una proteína se llevan a cabo por separado y secuencialmente (es decir, materiales de partida (proteína terapéutica, ligador soluble en agua, etc.), reactivos (agentes oxidantes, anilina, etc.) y productos de reacción (hidrato de carbono oxidado en una proteína terapéutica, ligador de aminoóxilo activado soluble en agua, etc.) se separan entre las etapas de reacción individuales). En otra realización, los materiales de partida y los reactivos necesarios para completar una reacción de conjugación según la presente invención se llevan a cabo en un único recipiente. En una realización, la proteína nativa se mezcla con el reactivo de aminoóxilo-polímero. Posteriormente, se añade el reactivo oxidante y se realiza la reacción de conjugación.

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 ligada 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 y 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.

En determinados aspectos de la presente divulgación, las proteínas terapéuticas se conjugan con derivados de ácidos grasos solubles en agua por cualquiera de una variedad de métodos químicos (Roberts JM *et al.*, Advan Drug Delivery Rev 2002; 54: 459-76). Por ejemplo, en una realización de la divulgación, una proteína terapéutica se modifica mediante la conjugación de derivados de ácidos grasos con grupos amino libres de la proteína usando ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS). En otra realización, el derivado de ácido graso soluble en agua se acopla a grupos SH libres usando química de maleimida. En una realización de la invención, el derivado de ácido graso soluble en agua se acopla mediante el uso de química aminoóxilo a los restos de hidrato de carbono de la proteína terapéutica después de la oxidación previa.

En una realización de la divulgación, una proteína terapéutica se modifica a través de residuos de lisina mediante el uso de derivados de ácidos grasos solubles en agua que contienen un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) activo. Este derivado reacciona con los residuos de lisina de la proteína terapéutica en condiciones suaves formando un enlace amida estable.

En otra realización de la divulgación, la unión a través de un enlace peptídico entre un grupo carboxilo en uno de los derivados de proteína o ácido graso y un grupo amina de la proteína o derivado de ácido graso, o una unión éster entre un grupo carboxilo de la proteína o se contempla un derivado de ácido graso y un grupo hidroxilo de la proteína terapéutica o derivado de ácido graso. Otra unión por la que la proteína terapéutica se une de manera covalente al derivado de ácido graso es a través de una base de Schiff, por ejemplo, entre un grupo amino libre en la proteína que reacciona con un grupo aldehído formado en un extremo terminal de un ácido graso. La base de Schiff generada se estabiliza en un aspecto mediante reducción específica con NaCNBH_3 para formar una amina secundaria. Un enfoque alternativo es la generación de grupos amino libres terminales en el derivado de ácido graso por aminación reductora con NH_4Cl después de la oxidación previa. Pueden usarse reactivos bifuncionales para ligar dos grupos amino o dos grupos hidroxilo. Por ejemplo, un derivado de ácido graso que contiene un grupo amino se acopla 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 -maleimidocaproiloxi)sulfosuccinimida/Pierce), por ejemplo, para ligar grupos amina y tiol.

En otro enfoque divulgado en el presente documento, se prepara un derivado de ácido graso con un grupo hidrazida activo y se acopla al resto de hidrato de carbono de la proteína después de la oxidación previa y la generación de funciones aldehído.

Tal como se describió anteriormente, un grupo amina libre de la proteína terapéutica reacciona con el grupo 1-carboxilo de un derivado de ácido graso para formar un enlace peptídico o se forma una unión éster entre el grupo ácido 1-carboxílico y un hidroxilo u otro grupo activo adecuado en una proteína

5 En diversas realizaciones, la proteína terapéutica se liga a o se asocia con el derivado de ácido graso en cantidades estequiométricas (por ejemplo, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:7, 1:8, 1:9 o 1:10, etc.). En diversas realizaciones, 1-6, 7-12 o 13-20 derivados de ácidos grasos se ligan a la proteína. En todavía otras realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más derivados de ácidos grasos se ligan a la proteína.

10 En diversas realizaciones, la proteína terapéutica se modifica para introducir sitios de glicosilación (es decir, sitios distintos de los sitios de glicosilación nativos). Tal modificación puede lograrse usando técnicas convencionales de biología molecular conocidas en la técnica. Además, la proteína terapéutica, antes de la conjugación con un ligador soluble en agua a través de uno o más restos de hidrato de carbono, puede glicosilarse *in vivo* o *in vitro*. Estos sitios glicosilados pueden servir como dianas para la conjugación de las proteínas con ligadores 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).

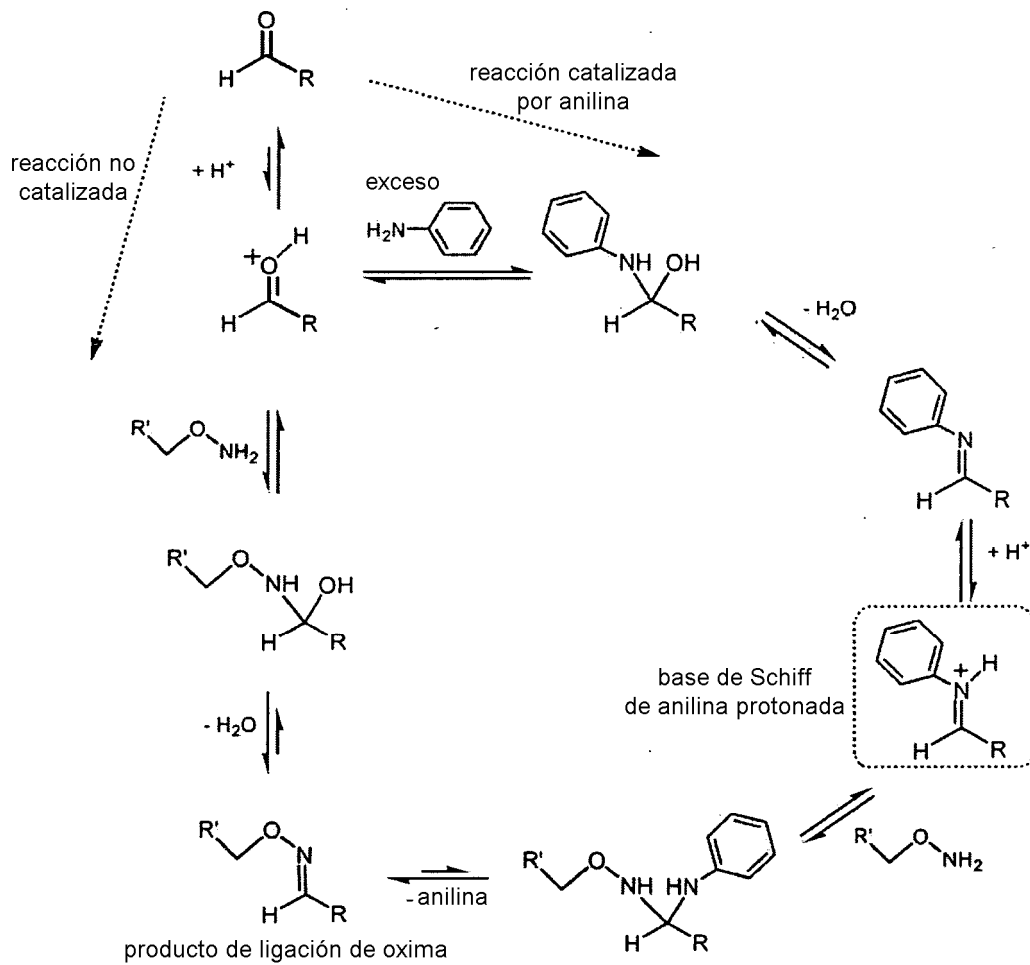
20 En una realización, la proteína conjugada conserva la actividad funcional completa de los productos de proteínas terapéuticas nativas y proporciona una semivida prolongada *in vivo*, en comparación con los productos de proteínas terapéuticas nativas. En otra realización, la proteína conjugada conserva 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.

30 En un aspecto relacionado, las actividades biológicas de la proteína conjugada y la proteína de la coagulación sanguínea nativa se determinan por las razones de actividad cromogénica con respecto al valor de antígeno del factor de la coagulación sanguínea (factor de la coagulación sanguínea:Chr: factor de la coagulación sanguínea:Ag).

35 En todavía otra realización más de la invención, la semivida de la proteína conjugada se 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 *in vivo* de la proteína terapéutica nativa.

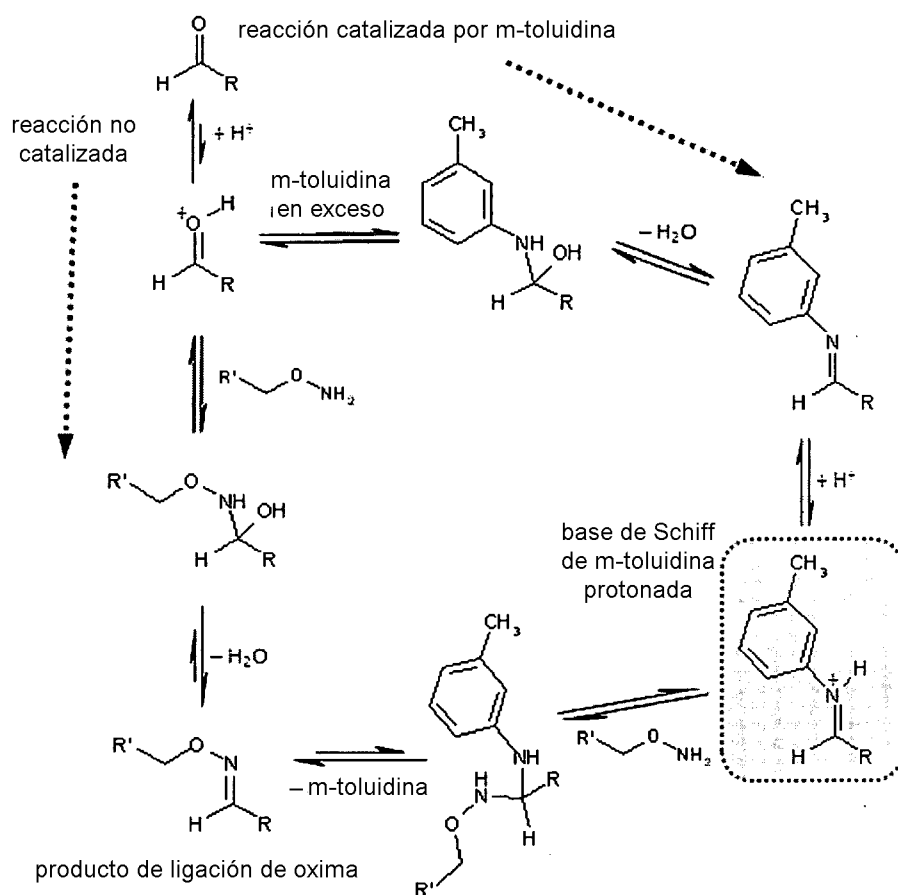
CATALIZADORES NUCLEÓFILOS

40 Tal como se describe en el presente documento, la anilina puede catalizar la conjugación de derivados de ácidos grasos solubles en agua con proteínas terapéuticas. La anilina cataliza fuertemente las 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 catalizada por anilina frente a no catalizada (adaptada de Kohler JJ, *ChemBioChem* 2009; 10: 2147-50).



Sin embargo, considerando los numerosos riesgos para la salud asociados con la anilina, son deseables catalizadores alternativos. La presente invención proporciona derivados de anilina como catalizadores alternativos de ligación de oxima. Tales derivados de anilina incluyen, pero no se limitan a, ácido o-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido sulfanílico, o-aminobenzamida, o-toluidina, m-toluidina, p-toluidina, o-anisidina, m-anisidina y p-anisidina. El siguiente diagrama compara una reacción de ligación de oxima catalizada por m-toluidina frente a no catalizada (documento PCT/US2011/45873):

5



adaptada de Kohler JJ, ChemBioChem 2009;10:2147-50

5 En una realización de la invención, se usa m-toluidina (también conocida como meta-toluidina, m-metil-anilina, 3-metil-anilina 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).

10 Los catalizadores nucleófilos de la invención son útiles para la ligación de oxima (usando unión aminooxilo). En diversas realizaciones de la invención, el catalizador nucleófilo 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 ó 50 mM. En una realización, el catalizador nucleófilo se proporciona entre 1 y 10 mM. En diversas realizaciones de la invención, el intervalo de pH de la reacción de conjugación está entre 4,0 y 7,0, entre 4,5 y 7,0, entre 5,0 y 6,5, entre 5,0 y 6,5. En diversas realizaciones, el pH de la reacción de conjugación es pH 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

20 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 derivado de ácido graso soluble en agua según la invención. Se conocen numerosas técnicas de purificación en la técnica e incluyen, sin limitación, métodos cromatográficos, métodos de filtración y métodos de precipitación (véase, por ejemplo, Guide to Protein Purification, Meth. Enzymology vol 463 (editado por Burgess RR y Deutscher MP), 2ª edición, Academic Press 2009).

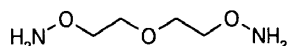
25 Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones específicas de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

30 Preparación del ligador homobifuncional NH₂[OCH₂CH₂]₂ONH₂

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



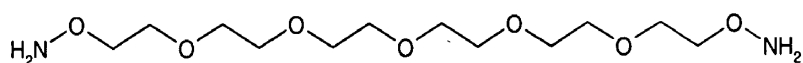
- 5 Se sintetizó 3-oxapentano-1,5-dioxiamina que contenía dos grupos aminooxilo activos según Boturyn *et al.* (Tetrahedron 1997; 53: 5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas que emplea una síntesis de Gabriel modificada de aminas primarias (figura 1). En la primera etapa, se hizo reaccionar una molécula de 2,2-diclorodietil 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 por hidrazinólisis en etanol.

10

Ejemplo 2

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

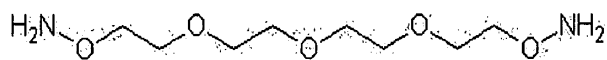
- 15 El ligador homobifuncional $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_6\text{ONH}_2$



- 20 Se sintetizó 3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecano-1,17-dioxiamina que contenía dos grupos aminooxilo activos según Boturyn *et al.* (Tetrahedron 1997; 53: 5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas que emplea una síntesis de Gabriel modificada de aminas primarias. En la primera etapa, se hizo 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 por hidrazinólisis en etanol.

25 Ejemplo 3

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



- 30 Se sintetizó el ligador homobifuncional $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$ (3,6,9-trioxaundecano-1,11-dioxiamina) que contenía dos grupos aminooxilo activos según Boturyn *et al.* (Tetrahedron 1997; 53: 5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas que emplea una síntesis de Gabriel modificada de aminas primarias: En la primera etapa, se hizo 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 final a partir del producto intermedio resultante por hidrazinólisis en etanol.

35

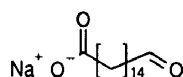
Ejemplo 4

- 40 Preparación de sal de sodio del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminoxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiimino)-hexadecanoico

Se sintetizó el ligador de ácido graso-aminoxilo sal de sodio del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminoxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiimino)-hexadecanoico según Halligan y Nair (Arkivoc 2006 (ii) 101-106) y Hubbs y Heathcock (J Am Chem Soc, 2003; 125: 12836-43) en una reacción de dos etapas.

45

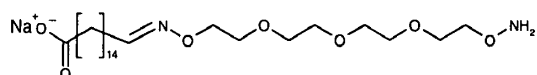
Producto intermedio 1: sal de sodio del ácido 16-oxohexadecanoico



- 50 A una disolución enfriada (0°C) de ácido 16-hidroxihexadecanoico (800 mg, 2,9 mmol) en diclorometano (10 ml) y tetrahidrofurano (20 ml) se le añadió peryodinano de Dess-Martin (1636 mg, 3,7 mmol) a 0°C. Se agitó la mezcla durante 3,5 horas a 0°C y 2,5 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de Ar. Se añadió luego una disolución al 15% de tiosulfato de sodio en disolución saturada de bicarbonato de sodio, se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se extrajo el producto intermedio 1 con dietil éter, después de secar sobre sulfato de sodio, se evaporó la fase orgánica hasta sequedad y se purificó por cromatografía en columna usando gel de sílice como agente de separación y una mezcla de disolventes de tolueno/acetato de etilo. Rendimiento: 34% (sólido blanco).

55

Producto: sal de sodio del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminoxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiimino)-hexadecanoico



60

5 A una disolución de 3,6,9-triaoxaundecano-1,11-dioxiamina (146 mg, 0,65 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (3 ml), se le añadió el producto intermedio 1 (19,1 mg, 0,07 mmol). Se agitó la mezcla durante 1,5 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de Ar. Se evaporó luego la mezcla hasta sequedad y se purificó por cromatografía en columna usando gel de sílice como agente de separación y una mezcla de disolventes de diclorometano/metanol/base de Huenig. Rendimiento: 71% (sólido blanco).

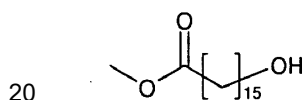
Espectrometría de masas (ESI): $m/z = 477,3529$ para $[M + 2H]^+$

10 Ejemplo 5

Preparación de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminoxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexadecanoico

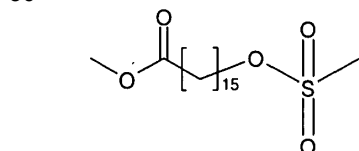
15 Se sintetizó el ligador de éster metílico de ácidos grasos-aminoxilo éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminoxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexadecanoico según Hang *et al.* (J Am Chem Soc 2007; 129: 2744-5) en una reacción de tres etapas.

Producto intermedio 1: éster metílico del ácido 16-hidroxihexadecanoico



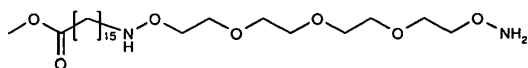
25 A una disolución enfriada (0°C) de ácido 16-hidroxihexadecanoico (3000 mg, 10,79 mmol) en metanol anhidro (27 ml), se le añadió cloruro de acetilo (3,837 ml, 53,96 mmol) gota a gota a 0°C en el plazo de 2 minutos, se agitó luego la mezcla a temperatura ambiente durante 3,5 horas bajo una atmósfera de Ar. Posteriormente, se evaporó la mezcla hasta sequedad, se disolvió el residuo en diclorometano (100 ml), se lavó con disolución saturada de bicarbonato de sodio (2x50 ml) y disolución de salmuera (1x50 ml). Después de secar sobre sulfato de sodio, se evaporó la fase orgánica recogida hasta sequedad y se secó a vacío a temperatura ambiente. Rendimiento: 92% (sólido blanco).

Producto intermedio 2: éster metílico del ácido 16-metilsulfonilhexadecanoico



35 A una disolución enfriada (0°C) del producto intermedio 1 (2807 mg, 9,80 mmol) en diclorometano (40 ml) se le añadió trietilamina (1,502 ml, 10,78 mmol), luego se le añadió una disolución preenfriada (0°C) de cloruro de mesilo (0,834 ml, 10,78 mmol) en diclorometano (5 ml) gota a gota en el plazo de 10 minutos a 0°C. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 0°C y durante 2,75 horas a temperatura ambiente. Luego se diluyó la mezcla con diclorometano (150 ml), se lavó con agua (1x100 ml), disolución saturada de bicarbonato de sodio (2x100 ml) y disolución de salmuera (1x100 ml). Después de secar sobre sulfato de sodio, se evaporó la fase orgánica recogida hasta sequedad y se secó a vacío a temperatura ambiente. Rendimiento: 95% (sólido blanco amarillado).

Producto: éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminoxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexadecanoico



45 A una disolución de 3,6,9-triaoxaundecano-1,11-dioxiamina (517 mg, 2,30 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra (22 ml) se le añadió una disolución de producto intermedio 2 (70 mg, 0,19 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra (7 ml) gota a gota durante 1 hora a temperatura ambiente bajo una atmósfera de Ar; se agitó la mezcla durante 2 días a diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 50°C, 80°C) para completar la reacción. Se evaporó luego la mezcla hasta sequedad, se purificó el producto bruto por cromatografía en columna usando gel de sílice como agente de separación y una mezcla de disolventes de diclorometano/metanol. Rendimiento: 31% (aceite blanco incoloro parcialmente solidificado).

50 Espectrometría de masas (ESI): $m/z = 493,3824$ para $[M + H]^+$

55 Ejemplo 6

Acoplamiento de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexa-decanoico al resto de hidrato de carbono del factor VIII de la coagulación

5 Se prepara FA-rFVIII usando un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, se oxida rFVIII con NaIO_4 y se purifica por cromatografía de intercambio aniónico (AEC). Posteriormente, el rFVIII oxidado se modifica con el reactivo FA-aminooxilo.

10 Se oxida rFVIII (material de partida de 45 mg) con NaIO_4 (concentración final 200 μM). Después de un tiempo de incubación de 30 minutos (22°C), se detiene la reacción de oxidación añadiendo una disolución acuosa de L-cisteína 1 M (concentración final: 10 mM). Se purifica el rFVIII oxidado por cromatografía de intercambio aniónico en EMD TMAE(M). Luego, se añaden 25 μl de una disolución al 10% (p/v) de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexadecanoico (preparado según el ejemplo 3) en DMSO al eluato (concentración de proteína 2 mg/ml) y se realiza la reacción de acoplamiento durante 18 horas a 4°C. Luego, se purifica el conjugado FA-rFVIII adicionalmente por HIC en Phenyl Sepharose 4 FF. Finalmente, se concentra el eluato por UF/DF usando una membrana de 30 kD (MILLIPORE).

Ejemplo 7

Acoplamiento de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexa-decanoico al resto de hidrato de carbono del factor IX de la coagulación

20 Se disuelven 10 mg de rFIX en tampón de reacción (L-histidina 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0) para dar una concentración final de 2,5 mg/ml. A esta disolución, se le añadió una disolución acuosa de NaIO_4 para obtener una concentración final de 100 μM . Se incubó la mezcla de reacción durante 1 hora a 4°C con agitación suave en la oscuridad. Luego, se carga la mezcla en columnas de desalación PD-10 preequilibradas para retirar el exceso de NaIO_4 . A esta mezcla, se le añaden 8 μl de una disolución al 10% (p/v) de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexa-decanoico (preparado según el ejemplo 3) en DMSO y se lleva a cabo la reacción de acoplamiento a pH 6,0 durante 18 h a 4°C. Luego, se purifica adicionalmente el conjugado por IEX en Q-Sepharose FF. Finalmente, se concentra el eluato por UF/DF usando dispositivos Vivaspín.

Ejemplo 8

Acoplamiento de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexa-decanoico al resto de hidrato de carbono del factor VIIa de la coagulación

35 Se disuelven 10 mg de rFVIIa en tampón de reacción ((Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para dar una concentración final de 2,0 mg/ml. A esta disolución se le añade una disolución acuosa de NaIO_4 5 mM para obtener una concentración final de 50 μM . Se incuba la mezcla de reacción durante 1 h a 4°C con agitación suave en la oscuridad. Luego, se carga la mezcla en columnas de desalación PD-10 preequilibradas para retirar el exceso de NaIO_4 . A esta mezcla, se le añaden 8 μl de una disolución al 10% (p/v) de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexa-decanoico (preparado según el ejemplo 3) en DMSO y se lleva a cabo la reacción de acoplamiento a pH 6,0 durante 18 h a 4°C. Luego, se purifica adicionalmente el conjugado por IEX en Q-Sepharose FF. Finalmente, se concentra el eluato por UF/DF usando dispositivos Vivaspín.

Ejemplo 9

Acoplamiento de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexa-decanoico al resto de hidrato de carbono del factor VIII de la coagulación

50 Se disuelven 10 mg de rFVIII en tampón Hepes (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para dar una concentración de proteína de 2 mg/ml. Luego, se añaden 10 μl de una disolución al 10% (p/v) de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexadecanoico (preparado según el ejemplo 3) en DMSO a la disolución de FVIII. Posteriormente, se prepara una disolución acuosa del catalizador nucleófilo m-toluidina (50 mM) y se añade a la mezcla 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 minutos en la oscuridad a una temperatura de 22°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 minutos. Posteriormente, se carga la mezcla de reacción en una columna IEX cargada con Q-Sepharose FF (1,6 x 8 cm). Se lava la columna con 20 volúmenes de tampón de equilibrio de columna (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,4) y se eluye el conjugado FA-rFVIII con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4). Finalmente, se somete el producto a UF/DF con dispositivos Vivaspín usando tampón Hepes, 7,4 (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,4) como tampón de diafiltración.

Ejemplo 10

65

Acoplamiento de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminoxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexa-decanoico al resto de hidrato de carbono del factor IX de la coagulación

5 Se disuelven 7 mg de rFIX en tampón His (His 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,0) para dar una concentración de proteína de 2 mg/ml. Luego se añaden 7 µl de una disolución al 10% (p/v) de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminoxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexa-decanoico (preparado según el ejemplo 3) en DMSO a la disolución de FIX. Luego se prepara una disolución acuosa del catalizador nucleófilo m-toluidina (50 mM) y se añade a la mezcla 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 250 µM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 minutos en la oscuridad a una temperatura de 22°C con agitación suave. Posteriormente, se extingue la reacción mediante la adición de L-cisteína (concentración final: 5 mM) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

15 Se purifica el conjugado FA-rFIX por cromatografía de intercambio aniónico. Se diluye la mezcla de reacción con 10 ml de tampón A (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5) y se carga en una columna HiTrap Q FF de 5 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) equilibrada con el tampón A. Se lava la columna con 5 VC usando el mismo tampón. Luego, se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, CaCl₂ 5 mM pH 7,5). Se concentran las fracciones que contienen conjugado por UF/DF usando una membrana de 10 kD compuesta por celulosa regenerada. Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes 20 mM, pH 7,2 que contenía NaCl 150 mM y CaCl₂ 5 mM.

Ejemplo 11

Acoplamiento de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminoxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexa-decanoico al resto de hidrato de carbono del factor VIIa de la coagulación

25 Se disuelven 10 mg de rFVIIa en tampón Hepes (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0). Luego, se añaden 10 µl de una disolución al 10% (p/v) de éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminoxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexa-decanoico (preparado según el ejemplo 3) en DMSO a la disolución de FVIIa. Posteriormente, se prepara una disolución acuosa del catalizador nucleófilo m-toluidina (50 mM) y se añade a la mezcla 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 250 µM. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 minutos en la oscuridad a una temperatura de 22°C con agitación suave. Posteriormente, se extingue la reacción mediante la adición de L-cisteína (concentración final: 5 mM) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se purifica el conjugado FA-rFVIIa por cromatografía de intercambio aniónico. Se diluye la mezcla de reacción con 10 ml de tampón A (Hepes 50 mM, pH 7,4) y se carga en una columna HiTrap Q FF de 5 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT) equilibrada con el tampón A. Se lava la columna con 5 VC usando mismo tampón. Luego, se eluye la columna con tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, CaCl₂ 5 mM pH 7,4). Se concentran las fracciones que contienen conjugado por UF/DF usando una membrana de 10 kD compuesta por celulosa regenerada. Se realiza la etapa de diafiltración final contra tampón Hepes 20 mM, pH 7,2 que contenía NaCl 150 mM y CaCl₂ 5 mM.

Ejemplo 12

Acoplamiento de un derivado de FA que contiene un grupo aminoóxido activo a un resto de hidrato de carbono oxidado en presencia de un catalizador nucleófilo

45 También se proporciona el acoplamiento de un derivado de FA que contiene un grupo aminoóxido activo a una proteína terapéutica oxidada (tal como las proteínas expuestas en la tabla 1 en el presente documento).

50 Para el acoplamiento de un derivado de FA que contiene un grupo aminoóxido, se oxidan en primer lugar los restos de hidrato de carbono (predominantemente N-glicanos) de una proteína terapéutica (por ejemplo, EPO, G-CSF o insulina; véase la tabla 1; concentración: 0,5-3 mg/ml) con NaIO₄ (concentración: 200 µM). Luego, se detiene la reacción mediante la adición de L-cisteína (concentración final: 5 mM) y se separan los reactivos por UF/DF. Después de la diafiltración, se añade el reactivo aminoóxido de FA (es decir, el derivado de FA) usando un exceso de 25 M y se realiza la reacción de acoplamiento a pH 6,0 durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave en presencia del catalizador nucleófilo m-toluidina (concentración: 10 mM). Posteriormente, se carga la mezcla de reacción en una columna de intercambio iónico (IEX). Se lava la columna con > 5 VC de tampón de lavado y se eluye el conjugado con un gradiente lineal de NaCl. Finalmente, se someten las fracciones que contienen conjugado a UF/DF.

Ejemplo 13

Acoplamiento de un derivado de FA que contiene un grupo aminoóxido activo a un resto de hidrato de carbono oxidado en presencia de un catalizador nucleófilo

65 Para el acoplamiento de un derivado de FA que contiene un grupo aminoóxido con el resto de hidrato de carbono de una proteína terapéutica, se incuba la proteína (por ejemplo, EPO, G-CSF o insulina; véase la tabla 1; concentración: 0,5-3 mg/ml) a pH 6,0 con NaIO₄ (concentración: 300 µM) durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia del

catalizador nucleófilo m-toluidina (concentración: 10 mM). Luego, se detiene la reacción mediante la adición de L-cisteína (concentración final: 5 mM) y se carga la mezcla de reacción en una columna de intercambio iónico (IEX). Se lava la columna con > 5 VC de tampón de lavado y se eluye el conjugado con un gradiente lineal de NaCl. Finalmente, se someten las fracciones que contienen conjugado a UF/DF.

5

Ejemplo 14

Acoplamiento de un derivado de FA que contiene un grupo aminoóxilo activo con una proteína de la coagulación sanguínea oxidada en presencia de un catalizador nucleófilo

10

Puede llevarse a cabo el acoplamiento de un derivado de FA que contiene un grupo aminoóxilo activo a una proteína de la coagulación sanguínea oxidada (tal como FIX, FVIII y FVIIa tal como se describe en los ejemplos anteriores) en presencia de un catalizador nucleófilo tal como m-toluidina en un intervalo de concentración de 2-20 mM.

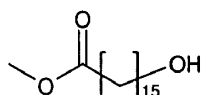
Ejemplo 15

Preparación de un ligador de ácido graso de MAL soluble en agua

20

Se prepara un ligador de ácido graso que contiene una cadena de PEG soluble en agua en posición ω y un grupo MAL activo en una síntesis de dos etapas:

Etapa 1: preparación de éster metílico del ácido 16-hidroxihexadecanoico:

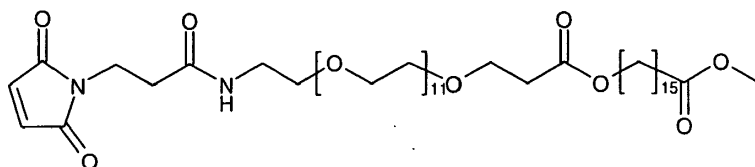


25

Se esterifica ácido 16-hidroxihexadecanoico disponible comercialmente con cloruro de acetilo en metanol durante 5 h a temperatura ambiente según el ejemplo 3 para dar el éster metílico correspondiente (Hang *et al.*, Chemical probes for the rapid detection of fatty-acylated proteins in mammalian cells, JACS 2007; 129: 2744-5).

30

Etapa 2: preparación del ligador de ácido graso de MAL:



35

Se hace reaccionar éster metílico del ácido 16-hidroxihexadecanoico con MAL-PEG-COOH disponible comercialmente (mal-Peg (12)-COOH/IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Alemania) empleando una reacción de Mitsunobu en THF a temperatura ambiente durante la noche (Toyokuni *et al.*, Synthesis of a New Heterobifunctional Linker, N-[4-(Aminoxy)butyl]-maleimide, for Facile Access to a Thiol-Reactive 18F-Labeling Agent, Bioconjugate Chem 2003; 14: 1253-9).

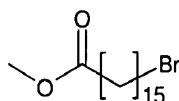
Ejemplo 16

Preparación de un ligador de ácido graso de NHS soluble en agua

45

Se prepara un ligador de ácido graso que contiene una cadena de PEG soluble en agua en posición ω y un éster de NHS activo terminal mediante el uso de una síntesis de cuatro etapas:

Etapa 1: preparación de éster metílico del ácido 16-bromohexadecanoico

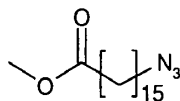


50

Se esterifica ácido 16-bromohexadecanoico disponible comercialmente con metanol y una cantidad catalítica de ácido sulfúrico concentrado durante la noche a temperatura de reflujo para dar el éster metílico correspondiente (Zinic *et al.*, Positionally Isomeric Organic gelators: Structure-Gelation Study, Racemic versus Enantiomeric Gelators, and Solvation Effects, Chem Eur J 2010; 16: 3066-82).

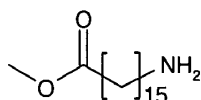
55

Etapa 2: preparación de éster metílico del ácido 16-azidohexadecanoico



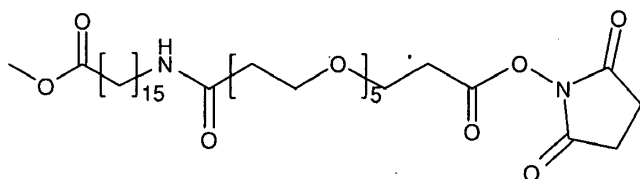
5 Se hace reaccionar éster metílico del ácido 16-bromohexadecanoico con azida de sodio en acetonitrilo durante cuatro días a temperatura de reflujo para dar la azida correspondiente (Zinic *et al.*, Positionally Isomeric Organic Gelators: Structure-Gelation Study, Racemic versus Enantiomeric Gelators, and Solvation Effects, Chem. EUR. J. 2010; 16: 3066-82).

10 Etapa 3: preparación de éster metílico del ácido 16-aminohexadecanoico



15 Se hidrogena catalíticamente éster metílico del ácido 16-azidohexadecanoico con paladio/carbón activado en metanol a 3 bares durante tres horas para dar la amina correspondiente (Zinic *et al.*, Positionally Isomeric Organic Gelators: Structure-Gelation Study, Racemic versus Enantiomeric Gelators, and Solvation Effects, Chem. EUR. J. 2010; 16: 3066-82).

20 Etapa 4: preparación del ligador de ácido graso de NHS



25 Se hace reaccionar éster metílico del ácido 16-aminohexadecanoico de NHS-PEG-NHS disponible comercialmente (NHS-dPEG (4)-NHS/IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Alemania) en 1,4-dioxano a temperatura ambiente durante tres días para dar el ligador de ácido graso de NHS (Cline *et al.*, The Aminolysis of N-Hydroxysuccinimide Esters. A Structure-Reactivity Study, JACS 1987; 109: 3087-91).

Ejemplo 17

30 Caracterización analítica de conjugados de proteínas FA

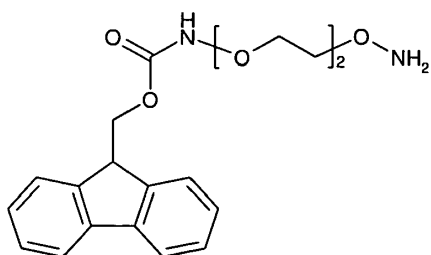
35 Las propiedades de unión a albúmina de las muestras de FA-rFVIII, rFIX o FVIIa preparadas según los ejemplos en el presente documento se verifican *in vitro* mediante el uso de sistemas de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se recubre una placa de 96 pocillos con un anticuerpo policlonal dirigido contra la albúmina sérica humana (HSA). La siguiente etapa es el bloqueo de la placa de ELISA con un tampón de gelatina-PBS. Luego, se une HSA al anticuerpo seguido de la unión de la muestra de proteína FA, que se diluye a diferentes concentraciones. Finalmente, la muestra de proteína-HSA se detecta mediante un anticuerpo anti-VIII, anti-FIX o anti-FVIIa marcado con peroxidasa. La actividad peroxidasa se detecta usando tetrametilbencidina (TMB) como sustrato. La intensidad de color desarrollada se mide con un lector de ELISA a 450 nm. La unión de la muestra de proteína FA a HSA se evalúa trazando las diferentes concentraciones de muestra en el eje x y sus valores de absorbancia correspondientes en el eje y.

Ejemplo 18

45 Preparación de un ligador de ácido graso pegilado soluble en agua que contiene un grupo aminoóxilo

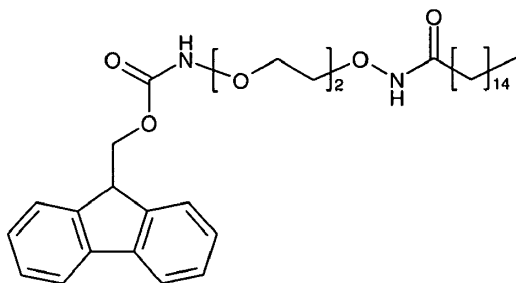
50 Se prepara un ligador de ácido graso que contiene una cadena de PEG soluble en agua con un resto aminoóxilo en posición ω conectada al grupo carboxilo de ácido graso en una síntesis de tres etapas usando 3-oxapentano-1,5-dioxiamina tal como se describe en el ejemplo 1.

Etapa 1: preparación de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-3-oxapentano-1,5-dioxiamina



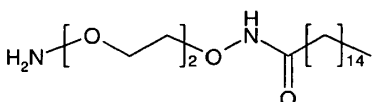
Se hizo reaccionar 3-oxapentano-1,5-dioxiamina con cloroformiato de 9-fluorenilmetilo en 1,4-dioxano a temperatura ambiental durante 1 hora. Se evaporó la disolución a presión reducida y se purificó el producto bruto empleando cromatografía en gel de sílice con diclorometano/metanol 20/1 (v/v) como la mezcla de disolventes para dar dioxiamina pura protegida con mono-FMOC (Boturn *et al.*, Synthesis of Fluorescent Probes for the Detection of Abasic Sites in DNA, Tetrahedron 1997; vol. 53, n.º 15, 5485-92).

Etapas 2: preparación de (2-(2-(N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoxietoxi)etoxi)etoxi)amida de ácido hexadecanoico



Se hace reaccionar N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-3-oxapentano-1,5-dioxiamina con éster de N-hidroxisuccinimida de ácido palmítico disponible comercialmente en THF a temperatura ambiente durante la noche para dar el conjugado de ácido graso-aminoxilo protegido con mono-FMOC (Jong *et al.*, Synthesis of ceramides using N-hydroxysuccinimide esters, Journal of Lipid Research 1972; Vol. 13, 819-22).

Etapas 3: preparación de (2-(2-aminoxietoxi)etoxi)amida de ácido hexadecanoico



Se hace reaccionar conjugado de ácido graso-aminoxilo protegido con mono-FMOC con piperidina en diclorometano a temperatura ambiental para dar el ligador de ácido graso-aminoxilo desprotegido como producto final (Boturn *et al.*, Synthesis of Fluorescent Probes for the Detection of Abasic Sites in DNA, Tetrahedron 1997; vol. 53, n.º 15, 5485-92).

Ejemplo 19 (ejemplo de referencia)

Acoplamiento de un ligador de ácido graso de MAL con A1PI

Se prepara un ligador de ácido graso que contenía un grupo MAL tal como se describe en el ejemplo 15 por reacción de éster metílico del ácido 16-hidroxihexadecanoico con MAL-PEG-COOH disponible comercialmente (mal-Peg (12)-COOH/IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Alemania) empleando una reacción de Mitsunobu. Se acopla este ligador al grupo SH libre de A1PI.

Se disuelven 10 mg de A1PI purificado (concentración: 1 mg/ml) en tampón de reacción (fosfato 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7,0) y se añaden 10 µl de una disolución al 5% (p/v) del ligador de ácido graso de MAL en DMSO a la disolución de A1PI. Se realiza la reacción de modificación durante 2 horas a temperatura ambiente seguido de una etapa de enfriamiento usando L-cisteína (concentración final: 10 mM). Después de la adición de L-cisteína, se incuba la mezcla de reacción con agitación suave durante una hora adicional a la misma temperatura. Se diluye el A1PI modificado con tampón de equilibrio (fosfato 25 mM, pH 6,5) para corregir la conductividad de las disoluciones a <4,5 mS/cm y se carga en una columna HiTrap Q FF (GE-Healthcare) precargada con un volumen de columna (VC) de 5 ml. Luego se equilibra la columna con 10 VC de tampón de equilibrio (velocidad de flujo: 2 ml/min). Finalmente, se eluye el PEG-A1PI con un gradiente lineal con tampón de elución (Na₂HPO₄ 25 mM, NaCl 1 M, pH 6,5).

Ejemplo 20 (ejemplo de referencia)

Acoplamiento de un ligador de ácido graso del NHS con factor de la coagulación VIII

- 5 Se prepara un ligador de ácido graso que contenía un grupo NHS tal como se describe en el ejemplo 16 por reacción de éster metílico del ácido 16-hidroxihexadecanoico de NHS-PEG-NHS disponible comercialmente (NHS-dPEG (4)-NHS (IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Alemania). Se acopla este ligador a los grupos amino libres de residuos de lisina del factor VIII de la coagulación.
- 10 Se disuelven 10 mg de rFVIII en tampón Hepes (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) para dar una concentración de proteína de 2 mg/ml. Luego se añaden 10 µl de una disolución al 10% (p/v) de ligador de ácido graso de NHS en DMSO a la disolución de FVIII. Se incuba la mezcla de reacción durante 120 minutos en la oscuridad a una temperatura de 22°C con agitación suave. Luego, se detiene la reacción mediante la adición de una disolución acuosa de glicina (1 M) para dar una concentración final de 20 mM en la mezcla de reacción.
- 15 Se incuba la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y posteriormente se carga en una columna IEX cargada con Q-Sepharose FF (1,6 x 8 cm). Se lava la columna con 20 volúmenes de tampón de equilibrio de columna (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4) y se eluye el conjugado FA-rFVIII con tampón B (Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4). Finalmente, se somete el producto a UF/DF con dispositivos Vivaspin usando tampón Hepes, 7,4 (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4) como tampón de diafiltración.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de un derivado de ácido graso soluble en agua y una proteína terapéutica, en el que el derivado de ácido graso soluble en agua comprende un ácido graso o éster de ácido graso unido a un ligador soluble en agua, y en el que el derivado de ácido graso soluble en agua se une de manera estable a la proteína terapéutica mediante una unión oxima formada entre un grupo aminoóxilo en el ligador soluble en agua y un grupo aldehído de un hidrato de carbono oxidado en la proteína terapéutica.
2. Conjugado según la reivindicación 1, que une albúmina sérica humana (HSA) *in vitro* o *in vivo*, tiene semivida aumentada en relación con una proteína terapéutica nativa, y en el que el ácido graso es un ácido graso saturado o ácido graso insaturado.
3. Conjugado según la reivindicación 2, en el que el ácido graso es un ácido graso de cadena ramificada.
4. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el ácido graso comprende una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 y C24.
5. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido graso se une al ligador soluble en agua a un grupo en el ácido graso seleccionado del grupo que consiste en: grupo carboxilo terminal y grupo ω, en el que el grupo ω se selecciona del grupo que consiste en: hidroxilo, amino, tio y carboxilo.
6. Conjugado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el ácido graso es ácido 16-hidroxihexadecanoico o el éster de ácido graso es éster metílico del ácido 16-hidroxihexadecanoico.
7. Conjugado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el éster de ácido graso es éster metílico o éster etílico.
8. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el ligador soluble en agua comprende un polímero soluble en agua y al menos un grupo aminoóxilo unido a la proteína terapéutica.
9. Conjugado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el derivado de ácido graso soluble en agua es
- a) sal de sodio del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiimino)-hexadecanoico de fórmula:
- $$\text{Na}^+ \text{O}^- \text{C}(=\text{O}) \text{---} \left[\text{CH}_2 \right]_{14} \text{---} \text{C}(\text{N}(\text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{O})_4 \text{---} \text{NH}_2) \text{---} \text{H}$$
- b) éster metílico del ácido 16-(2-(2-(2-(2-aminooxietoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxiamino)-hexadecanoico,
- $$\text{CH}_3 \text{O} \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \left[\text{CH}_2 \right]_{15} \text{---} \text{N}(\text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{O})_4 \text{---} \text{NH}_2$$
10. Método de preparación de una proteína terapéutica conjugada que comprende poner en contacto un resto de hidrato de carbono oxidado en la proteína terapéutica con el derivado de ácido graso soluble en agua según la reivindicación 1, en condiciones que permitan la conjugación;
- 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 una unión oxima se forma entre el resto de hidrato de carbono oxidado y un grupo aminoóxilo activo en el derivado de ácido graso;
- y en el que dicha formación de unión oxima se cataliza por un catalizador nucleófilo seleccionado del grupo que consiste en anilina, ácido o-aminobenzoico, ácido m-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido sulfanílico, o-aminobenzamida, o-toluidina, m-toluidina, p-toluidina, o-anisidina, m-anisidina y p-anisidina.
11. Método de preparación de una proteína terapéutica conjugada según la reivindicación 10, que comprende además un método de preparación del derivado de ácido graso soluble en agua según la reivindicación 1, que comprende:
- a) oxidar un grupo ω-hidroxilo en un ácido graso para generar un grupo aldehído en el ácido graso; y

b) acoplar un ligador soluble en agua que comprende un grupo aminooxilo activo al grupo aldehído para formar una unión oxima estable;

5 en el que dicho derivado de ácido graso es soluble en agua; en el que el grupo ω -hidroxilo se oxida por un reactivo de oxidación seleccionado del grupo que consiste en: reactivo de peryodinano de Dess Martin, reactivo Tempo, cloruro de oxalilo/DMSO, perrutenato de tetrapropilamonio (TPAP) y reactivos de cromo VI (reactivo de Collins, clorocromato de piridinio (PCC) y dicromato de piridinio); en el que el ácido graso es un ácido graso saturado o ácido graso insaturado.

10 12. Método de preparación de una proteína terapéutica conjugada según la reivindicación 10, que comprende además un método de preparación del derivado de ácido graso soluble en agua según la reivindicación 1, que comprende:

15 a) esterificar un grupo carboxilo en un ácido graso para generar un éster en el ácido graso;

b) activar un grupo ω -hidroxilo en un ácido graso para generar un grupo mesilo en el ácido graso de la etapa a); y

20 c) acoplar un ligador soluble en agua que comprende un grupo aminooxilo activo sustituyendo el grupo mesilo de la etapa b) formando así un enlace de oximina-metileno estable;

25 en el que dicho derivado de ácido graso es soluble en agua; en el que el grupo carboxilo se esterifica por un agente de esterificación seleccionado del grupo que consiste en: cloruro de acetilo, metanol en presencia de ácido, etanol en presencia de ácido, diazometano y yoduro de metilo;

30 en el que el grupo ω -hidroxilo se activa por un agente de activación seleccionado del grupo que consiste en: cloruro de mesilo, cloruro de tosilo y cloruro de nosilo; y en el que el ácido graso es un ácido graso saturado o ácido graso insaturado.

35 13. Método según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que el ácido graso es un ácido graso de cadena ramificada.

40 14. Método según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que el ácido graso comprende una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 y C24, en el que opcionalmente el ácido graso es ácido 16-hidroxihexadecanoico.

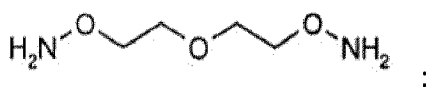
45 15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el ligador soluble en agua comprende un polímero soluble en agua y al menos un grupo aminooxilo.

50 16. Conjugado según la reivindicación 8 o método según la reivindicación 15, en el que el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en: polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, poli(ácido siálico) (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, carboximetildextrano, poli(óxido de alquileo) (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolina, poli(acrilil)morfolina, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico, y poli(1-hidroximetil-etileno-hidroximetil-formal) (PHF).

55 17. Conjugado o método según la reivindicación 16, en el que el polímero soluble en agua es PEG y comprende una longitud de cadena seleccionada del grupo que consiste en O3, O5, O7, O9, O11, O13 y O15.

60 18. Conjugado o método según la reivindicación 17, en el que el ligador soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en:

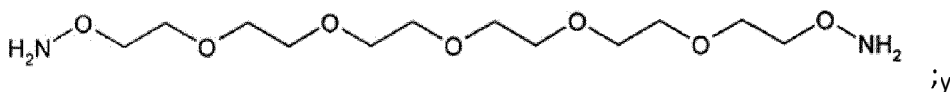
a) 3-oxapentano-1,5-dioxiamina de fórmula:



b) 3,6,9-trioxaundecano-1,11-dioxiamina de fórmula:



c) 3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecano-1,17-dioxamina de fórmula:



5

d) 3,6,9,12,15,18,21-heptaotricosano-1,23-dioxamina de fórmula:



- 10 19. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y 16-18 o método según cualquiera de las
 reivindicaciones 10 y 16-18, en el que la proteína terapéutica se selecciona del grupo que consiste en: factor
 15 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, tromboplastina tisular (TF),
 proteasa ADAMTS 13, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor estimulante de colonias 1
 20 (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 similar a angiopoyetina 1 (ANGPTL1), polipéptido similar a
 25 angiopoyetina 2 (ANGPTL2), polipéptido similar a angiopoyetina 3 (ANGPTL3), polipéptido similar a
 angiopoyetina 4 (ANGPTL4), polipéptido similar a angiopoyetina 5 (ANGPTL5), polipéptido similar a
 angiopoyetina 6 (ANGPTL6), polipéptido similar a angiopoyetina 7 (ANGPTL7), vitronectina, factor de
 crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína morfogénica
 ósea 1, proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 3, proteína morfogénica ósea 4, proteína
 30 morfogénica ósea 5, proteína morfogénica ósea 6, proteína morfogénica ósea 7, proteína morfogénica ósea
 8, proteína morfogénica ósea 9, proteína morfogénica ósea 10, proteína morfogénica ósea 11, proteína
 morfogénica ósea 12, proteína morfogénica ósea 13, proteína morfogénica ósea 14, proteína morfogénica
 ósea 15, receptor IA de proteínas morfogénicas óseas, receptor IB de proteínas morfogénicas óseas, receptor
 II de proteínas morfogénicas óseas, factor neurotrófico derivado del cerebro, cardiotrofina 1, factor
 35 neurotrófico ciliar, receptor del factor neurotrófico ciliar, cripto, críptico, factor quimiotáctico de neutrófilos
 inducido por citocinas 1, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 α , factor quimiotáctico de
 neutrófilos inducido por citocinas 2 β , factor de crecimiento de células endoteliales β , endotelina 1, factor de
 crecimiento epidérmico, Epigen, epirregulina, factor quimiotáctico para neutrófilos derivado de células
 40 epiteliales, factor de crecimiento de fibroblastos 4, factor de crecimiento de fibroblastos 5, factor de
 crecimiento de fibroblastos 6, factor de crecimiento de fibroblastos 7, factor de crecimiento de fibroblastos 8,
 factor de crecimiento de fibroblastos 8b, factor de crecimiento de fibroblastos 8c, factor de crecimiento de
 fibroblastos 9, factor de crecimiento de fibroblastos 10, factor de crecimiento de fibroblastos 11, factor de
 crecimiento de fibroblastos 12, factor de crecimiento de fibroblastos 13, factor de crecimiento de fibroblastos
 45 16, factor de crecimiento de fibroblastos 17, factor de crecimiento de fibroblastos 19, factor de crecimiento de
 fibroblastos 20, factor de crecimiento de fibroblastos 21, factor de crecimiento ácido de fibroblastos, factor de
 crecimiento básico de fibroblastos, receptor α 1 del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial,
 receptor α 2 del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, proteína relacionada con el crecimiento,
 proteína relacionada con el crecimiento α , proteína relacionada con el crecimiento β , proteína relacionada
 50 con el crecimiento γ , factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de
 hepatocitos, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado del hepatoma,
 factor de crecimiento similar a la insulina I, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, factor de
 crecimiento similar a la insulina II, proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, factor de
 crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de la leucemia, receptor α del factor inhibidor de la leucemia,
 factor de crecimiento nervioso, receptor del factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina 3,
 55 neurotrofina 4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento placentario 2,
 factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de
 plaquetas, cadena A del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de
 plaquetas AA, factor de crecimiento derivado de plaquetas AB, cadena B del factor de crecimiento derivado
 de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, receptor α del factor de crecimiento derivado
 de plaquetas, receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante del crecimiento
 60 de células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor del factor de células madre, TNF, TNF0, TNF1,
 TNF2, factor de crecimiento transformante α , factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento
 transformante β 1, factor de crecimiento transformante β 1.2, factor de crecimiento transformante β 2, factor de
 crecimiento transformante β 3, factor de crecimiento transformante β 5, factor de crecimiento transformante
 latente β 1, proteína I de unión al factor de crecimiento transformante β , proteína II de unión al factor de
 crecimiento transformante β , proteína III de unión al factor de crecimiento transformante β , linfopoyetina
 estromal tímica (TSLP), receptor de tipo I del factor de necrosis tumoral, receptor de tipo II del factor de

5 necrosis tumoral, receptor activador del plasminógeno de tipo urocinasa, proteína de activación de fosfolipasas (PUP), insulina, lectina, ricina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona foliculoestimulante, hormona estimulante del tiroides, activador tisular del plasminógeno, IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, α -galactosidasa, β -galactosidasa, ADNasa, fetuína, hormona luteinizante, estrógeno, albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, transferrina, trombopoyetina, urocinasa, integrina, trombina, leptina, Humira (adalimumab), Prolia (denosumab), Enbrel (etanercept), una proteína en la tabla 1, o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo de la misma.

FIGURA 1