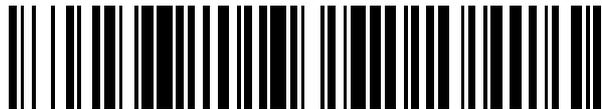


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 679**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2010 PCT/GB2010/001422**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11012850**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2010 E 10739386 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2459226**

54 Título: **Glicopolisialilación de proteínas diferentes a proteínas de coagulación de la sangre**

30 Prioridad:

27.07.2009 US 228828 P
21.05.2010 US 347136 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2016

73 Titular/es:

LIPOXEN TECHNOLOGIES LIMITED (33.3%)
London BioScience Innovation Centre 2 Royal
College Street
London NW1 0NH, GB;
BAXALTA GMBH (33.3%) y
BAXALTA INCORPORATED (33.3%)

72 Inventor/es:

JAIN, SANJAY;
GREGORIADIS, GREGORY;
DWIVEDI, ARCHANA;
NATH, SRIJIT;
SIEKMANN, JUERGEN;
HAIDER, STEFAN;
ROTTENSTEINER, HANSPETER y
TURECEK, PETER

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 590 679 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

Glicopolisialilación de proteínas diferentes a proteínas de coagulación de la sangre

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con materiales y métodos para conjugar ácido polisiálico, a glicoproteínas que contienen carbohidratos diferentes a proteínas de coagulación de la sangre, y con los conjugados obtenidos.

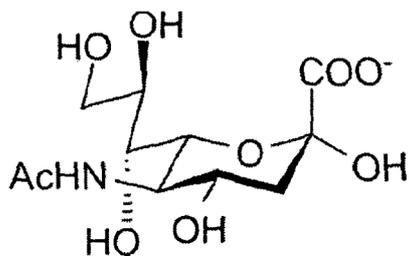
Antecedentes de la invención

10 La conjugación de fármacos polipeptídicos tales como la PEGilación o polisialilación los protege de la degradación en la circulación sanguíneos y mejora así sus perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos (Harris and Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003;2:214-21; S. Jain, D. Hreczuk-Hirst, P. Laing and G. Gregoriadis, Drug Delivery Systems and Sciences, 4 (No 1): 3-9, 2004.). El proceso de PEGilación une unidades repetitivas de etilenglicol (polietilen glicol (PEG)) a un fármaco polipeptídico. Las moléculas de PEG tienen un volumen hidrodinámico grande (5-10 veces el tamaño de las proteínas globulares), son altamente solubles en agua e hidratadas, no tóxicas, no inmunogénicas y se eliminan rápidamente del cuerpo. La PEGilación de las moléculas puede llevar a resistencia incrementada de los fármacos a la degradación enzimática, vida media *in vivo* o incrementada, frecuencia de dosificación reducida, inmunogenicidad disminuida, estabilidad física y térmica incrementada, solubilidad incrementada, estabilidad en líquido incrementada y agregación reducida. Los primeros fármacos PEGilados fueron aprobados por la FDA al inicio de la década de 1990. Desde entonces, la FDA ha aprobado varios fármacos PEGilados para administración oral, inyectable y tópica.

20 Los ácidos siálicos (también llamados ácidos N-acetil neuramínicos) y los ácidos polisiálicos se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos animales y en un menor grado en otras especies que varían desde plantas y hongos hasta levaduras y bacterias, principalmente en glicoproteínas y gangliosidos.

La abreviatura "PSA" usada aquí se refiere al término "ácido polisiálico". De la misma manera el término "mPSA" utilizado aquí se refiere al término "ácido polisiálico modificado".

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



Ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac)

Estructura del ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico)

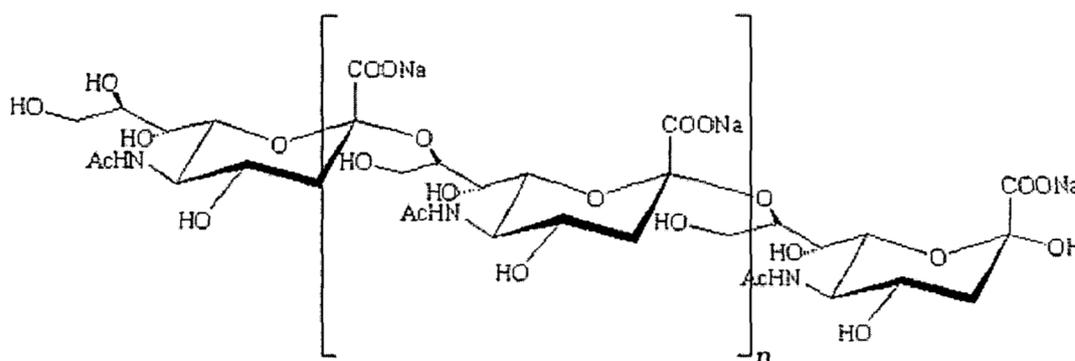
30 Los PSAs y mPSAs comprenden en general polímeros lineales que consisten esencialmente de unidades estructurales de ácido N-acetilneuramínico enlazadas por uniones 2,8- o 2,9-glicosídicas o combinaciones de estas (por ejemplo, alternando uniones 2,8- y 2,9-). En PSAs y mPSAs particularmente preferidos, los enlaces glicosídicos son α -2,8. Tales PSAs y mPSAs son derivados convenientemente de ácidos colomínicos, y se denominan aquí como "CAs" y mCAs". Los PSAs y mPSAs típicos comprenden al menos 2, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10 y lo más preferiblemente al menos 20 unidades estructurales de ácido N-acetilneuramínico. Así, pueden comprender de 5 a 500 unidades estructurales de ácido N-acetilneuramínico, preferiblemente de 10 a 300 unidades estructurales de ácido N-acetilneuramínico. Los PSAs y CAs pueden ser polímeros que comprenden diferentes unidades estructurales azúcar. Pueden ser copolímeros. Los PSAs y CAs preferiblemente están libres esencialmente de unidades estructurales azúcar diferentes al ácido N-acetilneuramínico. Los PSAs y CAs comprenden preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 98% de unidades estructurales de ácido N-acetilneuramínico.

Cuando los PSAs y CAs comprenden unidades estructurales diferentes a ácido N-acetilneuramínico (como, por

ejemplo en mPSAs y mCAs) están localizadas preferiblemente en uno o en ambos de los extremos de la cadena polimérica. Tales "otras" unidades estructurales pueden, por ejemplo, ser unidades estructurales derivadas de unidades estructurales de ácido N-acetilneuramínico terminales por oxidación o reducción.

5 Por ejemplo, la WO-A-0187922 describe tales mPSAs y mCAs en los cuales la unidad de ácido N-acetilneuramínico terminal no reductora es convertida a un grupo aldehído por reacción con peryodato de sodio. Adicionalmente, la WO 2005/016974 describe tales mPSAs y mCAs en los cuales la unidad de ácido N-acetilneuramínico terminal reductora es sometida a reducción para abrir reductivamente el anillo en la unidad de ácido N-acetilneuramínico terminal reductora, con lo cual se forma un grupo diol vecinal, seguido por oxidación para convertir el grupo diol vecinal a un grupo aldehído.

10 Las glicoproteínas ricas en ácido siálico se enlazan a la selectina en humanos y otros organismos. Juegan un papel importante en las infecciones por influenza humanas. Por ejemplo, el ácido siálico puede ocultar antígenos de la manosa sobre la superficie de las células huésped o bacterias de la lectina que se enlaza a la manosa. Esto evita la activación del complemento. Los ácidos siálicos también ocultan el penúltimo residuo de galactosa evitando así la eliminación rápida de la glicoproteína por el receptor de galactosa sobre las células parenquimales hepáticas.



15

Estructura del ácido colomínico (homopolímero del ácido N-acetilneuramínico)

Los CAs son producidos, *inter alia*, por cepas particulares de *Escherichia coli* que poseen el antígeno K1. Los CAs tienen muchas funciones fisiológicas. Son importantes como materia prima para fármacos y cosméticos.

20 Estudios comparativos *in vivo* con aspariginasa polisialilada y no modificada revelaron que la polisialilación incrementa la vida media de la enzima (Fernandes and Gregoriadis, *Biochimica Biophysica Acta* 1341: 26-34, 1997).

25 La preparación de conjugados mediante la formación de un enlace covalente entre el polímero soluble en agua y la proteína terapéutica puede llevarse a cabo mediante una variedad de métodos químicos. Una metodología para acoplar PSA a las proteínas terapéuticas es la conjugación de los polímeros a través de las unidades estructurales carbohidrato de la proteína. Los grupos hidroxilo (OH) vecinales de los carbohidratos en las proteínas pueden ser oxidados fácilmente con peryodato de sodio (NaIO_4) para formar grupos aldehído activos (Rothfus and Smith, *J Biol Chem* 1963; 238:1402-10; van Lenten and Ashwell, *J Biol Chem* 1971;246:1889-94). Subsecuentemente, el polímero puede ser acoplado a los grupos aldehído del carbohidrato mediante el uso de reactivos que contienen, por ejemplo, un grupo hidrazida activo (Wilchek M and Bayer EA, *Methods Enzymol* 1987;138:429-42). Una tecnología más reciente es el uso de reactivos que contienen grupos aminooxi que reaccionan con aldehídos para formar enlaces oxima (WO 96/40662, WO2008/025856).

30 Ejemplos adicionales que describen la conjugación de un PSA a una proteína terapéutica están descritos en la publicación de los Estados Unidos No. 2009/0076237 la cual enseña la oxidación de RFVIII y el acoplamiento subsecuente a PSA y otros polímeros solubles en agua (por ejemplo, PEG, HES, dextrano) utilizando química de hidrazida; la WO 2008/025856 que enseña la oxidación de diferentes factores de coagulación, por ejemplo rFIX, FVIII y FVIIa y el acoplamiento subsecuente a un polímero, por ejemplo, PEG; la WO 2006/016168 que enseña la conjugación de PSA que tiene un grupo N-hidroxisuccinimida a grupos amino de proteínas; la WO 2008/012540 que enseña la conjugación de PSA oxidado al grupo amino N-terminal de proteínas.

35 Recientemente, se ha descrito un método mejorado que comprende oxidación moderada con peryodato de ácidos siálicos para generar aldehídos seguida por reacción con un reactivo que contiene el grupo aminooxi en la presencia de cantidades catalíticas de anilina (Dirksen A and Dawson PE, *Bioconjugate Chem.* 2008;19,2543-8; and Zeng Y et al., *Nature Methods* 2009;6:207-9). Los catalizadores de anilina aceleran dramáticamente la ligación de la oxima,

40

permitiendo el uso de concentraciones muy bajas de reactivos.

Independientemente de los métodos disponibles para conjugar polímeros solubles en agua a proteínas terapéuticas, se mantiene una necesidad por el desarrollo de materiales y métodos para conjugar polímeros solubles en agua a compuestos que contienen carbohidratos diferentes a proteínas de coagulación de la sangre que mejoren las propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas de los compuestos a la vez que minimizan los costes asociados con los diversos reactivos.

Resumen de la invención

La presente invención provee materiales y métodos para conjugar un polímero soluble en agua a un compuesto que contiene carbohidrato diferente a una proteína de coagulación de la sangre que mejora las propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas del compuesto a la vez que minimiza los costes asociados con los diversos reactivos.

Así, la invención provee un método para conjugar PSA o mPSA una unidad estructural de carbohidrato oxidado de una glicoproteína diferente a una proteína de coagulación de la sangre, que comprende poner en contacto la unidad estructural carbohidrato oxidada con el PSA o mPSA bajo condiciones que permiten la conjugación, en donde dicho PSA o mPSA contiene un grupo aminooxi y se forma un enlace oxima entre la unidad estructural carbohidrato oxidada y el grupo aminooxi sobre el PSA o el mPSA, en donde el mPSA es PSA que comprende una unidad estructural derivada de una unidad estructural de ácido N-acetilneuramínico terminal por oxidación o reducción.

La unidad estructural carbohidrato puede ser oxidada utilizando una enzima oxidante específica para azúcares (por ejemplo, galactosa o glucosa oxidasa) o por incubación con un regulador que comprende un agente oxidante seleccionado de peryodato de sodio (NaIO₄) tetraacetato de plomo (Pb(OAc)₄) y perrutenato de potasio (KRuO₄).

La unidad estructural carbohidrato puede ser oxidada en un residuo de ácido siálico, manosa, galactosa o glucosa.

El polímero soluble en agua usado en la invención es PSA, mPSA, CA o mCA.

En ejemplos de referencia más adelante, el polímero soluble en agua es PEG o PEG ramificado.

En realizaciones particulares adicionales de la invención ilustrada en los ejemplos más adelante, el polímero soluble en agua es ácido polisialico (PSA) o un PSA modificado (mPSA). El PSA o el mPSA pueden tener un rango de peso molecular de 350 Da a 120,000 Da, 500 Da a 100,000 Da, 1000 Da a 80,000 Da, 1500 Da a 60,000 Da, 2,000 Da a 45,000 Da o 3,000 Da a 35,000 Da.

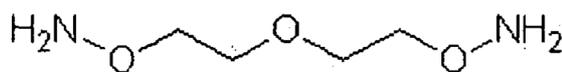
El PSA o el mPSA pueden ser ácido colomínico o un ácido colomínico modificado.

En otra realización de la invención, el PSA o el mPSA están comprendidos desde aproximadamente 2-500 o 10-300 unidades de ácido siálico. En aun otra realización, se provee el método antes mencionado en donde el agente oxidante es peryodato de sodio (NaIO₄).

El método de la invención puede comprender oxidar el polímero soluble en agua para formar un grupo aldehído sobre una unidad de ácido siálico terminal del polímero soluble en agua, y haciendo reaccionar el polímero soluble en agua oxidado con un enlazante aminooxi.

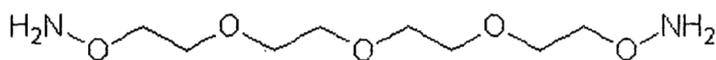
En aún otra realización de la invención, se provee el método antes mencionado en donde el polímero soluble en agua es preparado haciendo reaccionar un enlazante aminooxi activado con polímero soluble en agua oxidado en donde el enlazante es un enlazante homobifuncional o heterobifuncional. El enlazante homobifuncional puede tener la fórmula general NH₂[OCH₂CH₂]_nONH₂, en donde n=1-50, preferiblemente 1-11, más preferiblemente 1-6. El enlazante puede ser seleccionado específicamente de:

Un enlazante 3-oxa-pentano-1,5-dioxamina de la fórmula:



y

un enlazante 3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxamina de la fórmula:



El PSA o el mPSA pueden ser oxidados por incubación con un agente oxidante para formar un grupo aldehído terminal en el extremo no reductor del PSA.

- 5 El método puede comprender oxidar el polímero soluble en agua para formar un grupo aldehído sobre una unidad terminal del polímero soluble en agua, por ejemplo, una unidad de ácido siálico terminal del PSA o el mPSA, y haciendo reaccionar el polímero soluble en agua oxidado con un enlazante aminooxi. En todavía otra realización, se provee un método antes mencionado en donde el enlazante aminooxi es 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina. En una realización relacionada, el agente oxidante es NaIO_4 .
- 10 En otra realización de la invención, se provee el método antes mencionado en donde poner en contacto con la unidad estructural de carbohidrato oxidado con el polímero soluble en agua activado ocurre en un regulador que comprende un catalizador nucleofílico seleccionado del grupo consistente de anilina y derivados de anilina.
- Un grupo hidrazida puede ser formado sobre el polímero soluble en agua haciendo reaccionar el polímero soluble en agua oxidado con un enlazante hidrazida. El enlazante hidrazida puede ser adecuadamente dihidrazida o hidrazina de ácido adípico.
- 15 En aun otra realización de la invención, se provee un método antes mencionado que comprende adicionalmente la etapa de reducir un enlace oxima en la proteína conjugada, por ejemplo, incubando la proteína conjugada en un regulador que comprende un compuesto reductor seleccionado del grupo consistente de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3) y ácido ascórbico (vitamina C). En una realización relacionada el compuesto reductor es cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3).
- 20 En otra realización de la invención, se provee una glicoproteína conjugada producida por cualquier método antes mencionado. En todavía otra realización de la invención, una glicoproteína conjugada diferente a una proteína de coagulación de la sangre comprende (a) la dicha glicoproteína; y (b) al menos un aminooxi-PSA o -mPSA enlazado a la glicoproteína de (a), en donde dicho aminooxi-PSA o -mPSA está unido a la glicoproteína a través de una o más unidades estructurales carbohidrato, en donde mPSA es PSA que comprende una unidad estructural derivada de una
- 25 unidad estructural de ácido N-acetilneuramínico terminal por oxidación o reducción.

Figuras

La figura 1 muestra la síntesis de enlazantes di-aminooxi solubles en agua 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina y 3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina.

La figura 2 muestra la preparación de aminooxi-PSA.

30 Descripción detallada de la invención

- Las propiedades farmacológicas e inmunológicas de los compuestos que contienen carbohidratos, tales como glicoproteínas diferentes a proteínas de coagulación de la sangre pueden mejorarse mediante la modificación química y conjugación con polímeros solubles en agua, en particular PEG o PSA o mPSA. Las propiedades de los conjugados
- 35 resultantes en general fuertemente dependen de la estructura y el tamaño del polímero. Así, los polímeros con una distribución de tamaño definida y estrecha son preferidos usualmente. Los PSA y mPSA, usados en los ejemplos específicos, pueden ser purificados de manera tal que da como resultado una preparación de PSA final con una distribución de tamaño estrecha.

Glicoproteínas

- 40 Como se describen aquí, las glicoproteínas diferentes a proteínas de coagulación de la sangre que influyen, citoquinas, tales como interleucinas, alfa, beta y gamma-interferones, factores estimuladores de colonias incluyendo factores estimuladores de colonias de granulocitos, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de plaquetas, proteína activadora de fosfolipasa (PUP), insulina, proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas, factores de necrosis tumoral y alelos relacionados, formas solubles de receptores de factores de necrosis tumoral,
- 45 receptores de interleucina y formas solubles de receptores de interleucinas, factores de crecimiento, factores de crecimiento de tejidos, factores de crecimiento transformante, tales como TGF α s o TGF β s y factores de crecimiento epidérmico, hormonas, somatomedinas, hormonas pigmentarias, factores de liberación hipotalámicos, activadores de plasminógeno en tejidos e inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, anticuerpos monoclonales, eritropoyetina (EPO), factores sanguíneos diferentes a proteínas de coagulación de la sangre, galactosidasas, α -galactosidasas, β -galactosidasas, ADNasas, fetuina, fragmentos de los mismos, y cualquier proteína de fusión que
- 50 comprende cualquiera de las proteínas antes mencionadas o fragmentos de las mismas junto con glicoproteínas

terapéuticas en general son contemplados por la invención. En una realización la glicoproteína es EPO. En una realización adicional la glicoproteína es una galactosidasa. En todavía una realización adicional la glicoproteína es una ADNasa. En una realización aun adicional la glicoproteína es fetuina. Finalmente, en una realización todavía aún adicional la glicoproteína es un factor estimulador de colonias de granulocitos.

5 Tal como se utiliza aquí “derivado biológicamente activo” o “variante biológicamente activa” incluye cualquier derivado o variante de una molécula que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas de dicha molécula, tales como propiedades de enlazamiento, y/o la misma base estructural, tal como un esqueleto peptídico o una unidad polimérica básica.

10 Un “análogo”, “variante” o “derivado” es un compuesto sustancialmente similar en estructura y que tiene la misma actividad biológica, excepto en ciertos casos hasta un grado diferente, que una molécula de origen natural. Por ejemplo, un polipéptido variante se refiere a un polipéptido que comparte sustancialmente una estructura similar y tiene la misma actividad biológica que un polipéptido de referencia. Variantes o análogos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos en comparación con el polipéptido de origen natural a partir del cual se deriva el análogo, con base en una o más mutaciones que involucran (i) eliminación de uno o más residuos de aminoácidos en uno o más terminales del polipéptido y/o una o más regiones internas de la secuencia de polipéptidos de origen natural (por ejemplo, fragmentos), (ii) inserción o adición de uno más aminoácidos en uno o más terminales (típicamente una “adición” o “fusión”) del polipéptido y/o una o más regiones internas (típicamente una “inserción”) de la secuencia de polipéptidos de origen natural o (iii) sustitución de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de origen natural. A manera de ejemplo, un “derivado” se refiere a un polipéptido que comparte la misma o muy similar estructura que un polipéptido de referencia que ha sido modificado, por ejemplo, químicamente.

15 Polipéptidos variantes o análogos incluyen variantes de inserción, en donde uno más residuos de aminoácidos son agregados a una secuencia de aminoácidos de una proteína de la invención. Las inserciones pueden estar localizadas bien en cualquiera o ambos terminales de la proteína, y/o pueden estar posicionadas dentro de las regiones internas de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Las variantes de inserción, con residuos adicionales en cualquiera o ambos 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 opcionalmente contiene una Met N-terminal, especialmente cuando la molécula se expresa de manera recombinante en una célula bacteriana tal como *E. coli*.

25 En variantes de eliminación, uno o más residuos de aminoácidos en una proteína o polipéptido tal como se describen aquí son eliminados. Las eliminaciones pueden efectuarse en uno o ambos terminales de la proteína o polipéptido y/o con eliminación de uno más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Las variantes de eliminación, por lo tanto, incluyen fragmentos de una proteína o secuencia de polipéptidos.

30 En variantes de sustitución, uno o más residuos de aminoácidos de una proteína o polipéptido son eliminados o reemplazados con residuos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son conservadoras en su naturaleza y las sustituciones conservadoras de este tipo son bien conocidas en el arte. Alternativamente, la invención abarca sustituciones que son no conservadoras. Sustituciones conservadoras de ejemplo se describen en Lehninger, [Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc., New York (1975), pp 71-77] y se establecen inmediatamente a continuación.

Sustituciones conservadoras

Características de la cadena lateral	Aminoácido
40 No polar (hidrófoba):	
A. Alifática	A L I V P
B. Aromática	F W
C. Que contiene azufre	M
D. Delimitante	G
45 Polar no cargada:	
A. Hidroxilo	S T Y
B. Amidas	N Q

C. Sulfhidrido	C
D. Delimitante	G
Cargada positivamente (básica)	K R G
Cargada negativamente (ácida)	D E

5 Alternativamente, sustituciones conservadoras de ejemplo son establecidas inmediatamente a continuación.

Sustituciones conservadoras II

	Residuo original	Sustitución de ejemplo
10	Ala (A)	Val, Leu, Ile
	Arg (R)	Lys, Gln, Asn
	Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
	Asp (D)	Glu
	Cys (C)	Ser
15	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
20	Lys (K)	Arg, Gln, Asn
	Met (M)	Leu, Phe, Ile
	Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
	Pro (P)	Gly
	Ser (S)	Thr
25	Thr (T)	Ser
	Trp (W)	Tyr
	Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
	Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

Administración

30 En una realización un compuesto conjugado de la presente invención puede ser administrado por inyección, tal como inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal. Las composiciones pueden ser útiles como agentes terapéuticos, diagnósticos y/o similares.

35 Para administrar composiciones que comprenden un compuesto conjugado de la presente invención a humanos o animales de prueba, en un aspecto, las composiciones comprenden uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los términos "farmacéuticamente" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas tales como agregación y productos de escisión, y además no producen reacciones alérgicas u otras adversas cuando se administran utilizando rutas bien conocidas en el arte, como se describe más adelante. "Vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retardo isotónico y de absorción y similares clínicamente útiles, incluyendo aquellos agentes divulgados más arriba.

40 Tal como se utiliza aquí, "cantidad efectiva" incluye una dosis adecuada para tratar un mamífero que tiene un trastorno clínicamente definido.

45 Las composiciones pueden ser administradas oralmente, por vía tópica, transdérmica, parenteral, por aspersion para inhalación, por vía vaginal, rectal o por inyección intracraneal. El término parenteral tal como se utiliza aquí incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intracisternal o técnicas de infusión. La administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o implantación quirúrgica en un sitio particular se contempla también. Generalmente, las composiciones están esencialmente libres de pirógenos, así como otras impurezas que podrían ser nocivas para el receptor.

50 Las administraciones individuales o múltiples de las composiciones pueden llevarse a cabo con los niveles de dosis y patrones que son seleccionados por el médico tratante. Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada dependerá del tipo de enfermedad que va a ser tratada, tal como se describe más arriba, la severidad y transcurso de la enfermedad, si el fármaco es administrado para propósitos preventivos o terapéuticos,

terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al fármaco, y la discreción del médico tratante.

5 La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto conjugado o proteína tal como se define aquí. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un vehículo, diluyente, sal, regulador o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser utilizada para tratar trastornos clínicamente definidos. La composición farmacéutica de la invención puede ser una solución o un producto liofilizado. Las soluciones de las composiciones farmacéuticas pueden ser sometidas a cualquier proceso de liofilización adecuado.

10 Como aspecto adicional, la invención incluye kits que comprenden una composición de la invención empacada de una manera que facilita su uso para administración a sujetos. En una realización, tal kit incluye un compuesto o composición descritos aquí (por ejemplo, una composición que comprende una proteína conjugada), empacado en un contenedor tal como una botella o recipientes sellados, con una etiqueta fijada al contenedor o incluida dentro del paquete que describe el uso del compuesto o composición en la práctica del método. En una realización, el kit contiene un primer contenedor que tiene una composición que comprende una proteína conjugada y un segundo contenedor que tiene una solución para reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición en el primer contenedor. En un aspecto, el compuesto o composición esta empacado en una forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir adicionalmente un dispositivo adecuado para administrar la composición de acuerdo con una ruta específica de administración. Preferiblemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de la proteína terapéutica o composición peptídica.

20 En una realización, el derivado retiene la actividad funcional completa de los compuestos terapéuticos originales, y provee una vida media extendida *in vivo*, en comparación con compuestos terapéuticos originales. En otra realización, el derivado retiene al menos, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, o 150 por ciento (%) de actividad biológica con respecto al compuesto original.

25 Ácido siálico y PSA

Tal como se utiliza aquí, "unidades estructurales de ácido siálico" incluye monómeros o polímeros de ácido siálico ("polisacáridos") los cuales son solubles en una solución o suspensión acuosa y tienen poco o ningún efecto negativo, tales como efectos laterales, en mamíferos por administración del conjugado PSA-proteína en una cantidad farmacéuticamente efectiva. El PSA y el mPSA son caracterizados, en un aspecto, por tener 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, o 500 de unidades de ácido siálico. En ciertos aspectos, diferentes unidades de ácido siálico se combinan en una cadena.

35 En una realización de la invención, la porción de ácido siálico del compuesto de PSA o mPSA es altamente hidrofílica, y en otras realizaciones el compuesto completo es altamente hidrofílico. La hidrofiliidad es conferida primariamente por los grupos carboxilo pendiente de las unidades de ácido siálico, así como los grupos hidroxilo. La unidad sacárido puede contener otros grupos funcionales, tales como grupos amina, hidroxilo o sulfato, o combinaciones de los mismos. Estos grupos pueden estar presentes en compuestos sacáridos de origen natural, o ser introducidos en compuestos polisacáridos derivados. El PSA y el mPSA usados en los métodos y conjugados de la invención pueden ser caracterizados adicionalmente como se describe más arriba en los Antecedentes de la Invención.

40 El polímero PSA de origen natural está disponible como una preparación polidispersa que muestra una distribución de tamaño amplio (por ejemplo, Sigma C-5762) y alta polidispersidad (PD). Debido a que los polisacáridos son producidos usualmente en bacterias que portan un riesgo inherente de copurificar endotoxinas, la purificación de las cadenas poliméricas largas de ácido siálico puede elevar la probabilidad de un contenido de endotoxinas incrementado. Las moléculas de PSA cortas con 1-4 unidades de ácido siálico también pueden ser preparadas sintéticamente (Kang SH et al., Chem Commun. 2000;227-8; Ress DK and Linhardt RJ, Current Organic Synthesis. 2004;1:31-46), minimizando así el riesgo de altos niveles de endotoxinas. Sin embargo las preparaciones de PSA con una distribución de tamaño estrecha y baja polidispersidad, que también están libres de endotoxinas, pueden ser manufacturadas ahora. Los compuestos polisacáridos de uso particular para la invención son, en un aspecto, aquellos producidos por bacterias. Algunos de estos polisacáridos de origen natural son conocidos como glicolípidos. En una realización, los compuestos polisacáridos están sustancialmente libres de unidades galactosa terminales.

50 En diversas realizaciones, el compuesto está enlazado a o asociado con el compuesto PSA o mPSA 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 unidades de PSA y/o de mPSA están enlazadas al compuesto. 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 unidades de PSA y/o mPSA están enlazadas al compuesto.

55 Opcionalmente, el compuesto es modificado para introducir sitios de glicosilación (esto es, sitios diferentes a los sitios

de glicosilación originales). Tal modificación puede ser lograda utilizando técnicas de biología molecular estándar conocidas en el arte. Además, el compuesto antes de la conjugación a través de una o más unidades carbohidrato, puede ser glicosilado *in vivo* o *in vitro*.

Enlace aminooxi

5 En una realización de la invención, la reacción de la hidroxilamina o derivados de hidroxilamina con aldehídos (por ejemplo, sobre una unidad estructural carbohidrato después de la oxidación con peryodato de sodio) para formar un grupo oxima se aplica a la preparación de conjugados del compuesto. Por ejemplo, una glicoproteína es oxidada primero con un agente oxidante tal como peryodato de sodio (NaIO₄) (Rothfus JA et Smith EL., J Biol Chem 1963, 238, 1402-10; y Van Lenten L y Ashwell G., J Biol Chem 1971, 246, 1889-94). La oxidación con peryodato de, por ejemplo, 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 de tal agente oxidante son tetraacetato de plomo (Pb(OAc)₄), acetato de manganeso (MnO(Ac)₃), acetato de cobalto (Co(OAc)₂), acetato de talio (TlOAc), sulfato de cerio (Ce(SO₄)₂) (US 4,367,309) o perrutenato de potasio (KRuO₄) (Marko et al., J Am Chem Soc 1997, 119, 12661-2). Por "agente oxidante" se entiende un compuesto oxidante moderado que es capaz de oxidar dioles vecinales en carbohidratos, generando por lo tanto grupos aldehído activos bajo condiciones de reacción fisiológica.

La segunda etapa es el acoplamiento del polímero que contiene un grupo aminooxi a la unidad estructural carbohidrato oxidada para formar un enlace oxima. En una realización de la invención, esta etapa puede ser llevada a cabo en la presencia de cantidades catalíticas del catalizador nucleofílico anilina o derivados de anilina (Dirksen A et Dawson PE, Bioconjugate Chem. 2008; Zeng Y et al., Nature Methods 2009;6:207-9). El catalizador de anilina acelera dramáticamente el enlace de la oxima permitiendo el uso de concentraciones muy bajas de los reactivos. En otra realización de la invención el enlace oxima es estabilizado por reducción con NaCNBH₃ para formar un enlace alcoxiamina.

25 En una realización de la invención, las etapas de reacción para conjugar PSA o mPSA a una proteína se llevan a cabo separada y secuencialmente (esto es, materiales de partida (por ejemplo, proteína, polímero, etc.), reactivos (por ejemplo agentes oxidantes, anilina, etc.) y productos de reacción (por ejemplo, carbohidrato oxidado sobre una proteína, polímero aminooxi activado) son separados entre etapas de reacción individuales).

Información adicional sobre la tecnología aminooxi puede encontrarse en las siguientes referencias: EP 1681303A1 (eritropoyetina HA-Silada); WO 2005/014024 (conjugados de un polímero y una proteína enlazada por un grupo enlazante oxima); WO96/40662 (compuestos enlazantes que contienen aminooxi y su aplicación y conjugado); WO 2008/025856 (proteínas modificadas); Peri F et al., Tetrahedron 1998, 54, 12269-78; Kubler-Kielb J and Pozsgay V., J Org Chem 2005, 70, 6987-90; Lees A et al., Vaccine 2006, 24(6), 716-29; y Heredia KL et al., Macromolecules 2007, 40(14), 4772-9.

35 Ventajas de la invención incluyen alta recuperación de conjugado, alta retención de actividad de la glicoproteína conjugada en comparación con proteína no conjugada y alta eficiencia de conjugación.

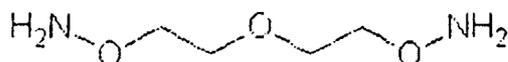
La invención se ilustra ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Los Ejemplos 1-3, 9 y 11-20 ilustran realizaciones específicas de la invención. Los ejemplos 4-8, 10 y 21-25 se incluyen como ejemplos de referencia por su relevancia para la preparación de conjugados correspondientes de la invención.

Ejemplos

40 Ejemplo 1

Preparación del enlazante homobifuncional NH₂[OCH₂CH₂]₂ONH₂

El enlazante homobifuncional NH₂[OCH₂CH₂]₂ONH₂

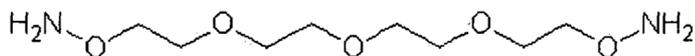


45 (3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina) que contiene dos grupos aminooxi activos fue sintetizada de acuerdo con Boturny et al. (Tetrahedron 1997;53:5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas que emplea una síntesis de Gabriel modificada de aminas primarias. La primera etapa, una molécula de 2,2-clorodietiléter se hizo reaccionar con dos moléculas de Endo-N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida en dimetilformamida (DMF). El producto homobifuncional deseado fue preparado a partir del intermedio resultante por hidrazinólisis en etanol. Excepto donde se especifica otra cosa, este se denomina como el enlazante diaminooxi en los ejemplos a continuación.

Ejemplo 2

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

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



5 (3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina) que contiene dos grupos aminoxi activos fue sintetizado de acuerdo con Boturny et al. (Tetrahedron 1997;53:5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas empleando una síntesis de Gabriel modificada de aminas primarias. En la primera etapa una molécula de Bis-(2-(2-cloretoxi)-etil)-éter se hizo reaccionar con dos moléculas de Endo-Nhidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida en DMF. El producto homobifuncional deseado fue preparado a partir del intermedio resultante por hidrazinólisis en etanol.

10 Ejemplo 3

Preparación de aminooxi-PSA

500 mg de PSA oxidado (PM=18.8 kD) obtenido del Serum Institute of India (Pune, India) fue disuelto en 8 ml de regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 5.5. A continuación, se agregaron 100 mg de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina. Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, se agregaron 44 mg de cianoborohidruro de sodio. Después de agitar durante otras 4 horas a 4°C, la mezcla de reacción fue cargada en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer (Pierce, Rockford, IL) (membrana de 3.5 kD, celulosa regenerada) y se dializó contra PBS pH 7.2 durante 4 días. El producto fue congelado a -80°C. La preparación del aminooxi-PSA de acuerdo con este procedimiento está ilustrada en la figura 2.

Ejemplo 4

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

A 12.6 mg de rFIX, disueltos en 6.3 ml de regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 6.0, se agregaron 289 µl de una solución acuosa de peryodato de sodio (10 mM). La mezcla fue agitada en la oscuridad durante 4 horas a 4°C y fue detenida durante 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 6.5 µl de glicerol 1M. Los contaminantes de peso molecular bajo fueron eliminados por ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) empleando concentradores Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Alemania) (membrana de 30 kD, celulosa regenerada). A continuación, se agregaron 43 mg de aminooxi-PSA al retenido en UF/DF y la mezcla fue agitada durante 18 horas a 4°C. El reactivo PSA en exceso fue eliminado por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). La conductividad de la mezcla de reacción enfriada fue elevada hasta 180 mS/cm y cargada sobre una columna HIC HiTrap Butil FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) de 5 ml (1.6 x 2.5 cm), preequilibrada con HEPES 50 Mm, cloruro de sodio 3M, cloruro de calcio 6.7 mM, Tween 80 al 0.01%, pH 6.9. El conjugado fue eluido con 2.4 volúmenes de columna (CV) con HEPES 50 Mm, cloruro de calcio 6.7 mM, Tween 80 al 0.005%, pH 7.4 a una rata de flujo de 5 ml/minuto. La preparación fue caracterizada analíticamente midiendo la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica FIX. Para el conjugado PSA-rFIX se determinó una actividad específica de 80.2 IU/mg de proteína (56.4% en comparación con el rFIX nativo). Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Ítem	BCA [mg/ml]	FIX:Crom [IU/ml]	Actividad específica [IU FIX: Crom/mg BCA]	Actividad específica [%]
rFIX	8.58	1221	142.3	100
PSA-rFIX	1.15	92.2	80.2	56.4

Ejemplo 5

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

40 A 3.0 mg de rFIX, disuelto en 1.4 ml de regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 6.0, se agregaron 14.1 µl de una solución acuosa de peryodato de sodio (10 mM). La mezcla fue agitada en la oscuridad durante 1 hora a 4°C y se

5 detuvo durante 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 1.5 µl de glicerol 1M. Los contaminantes de bajo peso molecular fueron eliminados por medio de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) empleando columnas desalinizadoras PD-10 (GE Healthcare, Fairfield, CT). Se mezclaron 1.2 mg de rFIX oxidado, disueltos en 1.33 ml de regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 6.0 con 70 µl de anilina (solución de reserva acuosa 200 mM) y se agitó durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 4.0 mg de aminooxi-PSA y la mezcla fue agitada durante 2 horas a temperatura ambiente y otras 16 horas a 4°C. Las muestras fueron extraídas durante 1 hora, después de 2 horas y al final de la reacción después de 18 horas. A continuación, se eliminó el exceso de reactivo PSA y el rFIX libre por medio de HIC. La conductividad de la mezcla de reacción enfriada fue elevada a 180 mS/cm y fue cargada sobre una columna HIC HiTrap Butil FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) de 5 ml (1.6 x 2.5 cm), preequilibrada con HEPES 50 mM, cloruro de sodio 3M, cloruro de calcio 6.7 mM, Tween 80 al 0.01%, pH 6.9. El conjugado fue eluido con un gradiente lineal a HEPES 50 mM, cloruro de calcio 6.7 mM, Tween 80 al 0.005%, pH 7.4 en 20 CV con una rata de flujo de 5 ml/minuto.

Ejemplo 6

Acoplamiento de aminooxi-PSA a rFIX y reducción con NaCNBH₃

15 A 10.5 mg de rFIX, disueltos en 5.25 ml de regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 6.0, se agregaron 53 µl de una solución acuosa de peryodato de sodio (10 mM). La mezcla fue agitada en la oscuridad durante 1 hora a 4°C y se detuvo durante 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 5.3 µl de glicerol 1M. Los contaminantes de bajo peso molecular fueron eliminados por medio de UF/DF empleando concentrados Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Alemania) (membrana de 30 kD, celulosa regenerada). A continuación, se agregaron 35.9 mg de aminooxi-PSA al retenido por UF/DF y la mezcla fue agitada durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se agregaron 53 µl de solución acuosa de cianoborohidruro de sodio (5M) y la reacción se dejó proceder durante otras 16 horas. Luego el exceso de reactivo de PSA fue retirado por medio de HIC. La conductividad de la mezcla de reacción enfriada fue elevada a 180 mS/cm y cargada sobre una columna HiTrap Butil FF HIC (GE Healthcare, Fairfield, CT) de 5 ml (1.6 x 2.5 cm), preequilibrada con HEPES 50 mM, cloruro de sodio 3M, cloruro de calcio 6.7 mM, Tween 80 al 0.01%, pH 6.9. El conjugado fue eluido con 2.4 CV con HEPES 50 mM, cloruro de calcio 6.7 mM, Tween 80 al 0.005%, pH 7.4 a una rata de flujo de 5 ml/minuto.

Ejemplo 7

Acoplamiento de aminooxi-PSA (enlazante: NH₂[OCH₂CH₂]₄ONH₂) a rFIX y purificación del conjugado

30 A 5.6 mg de rFIX, disueltos en 2.8 ml de regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 6.0, se agregaron 102 µl de una solución acuosa de peryodato de sodio (10 mM). La mezcla fue agitada en la oscuridad durante 1 hora a 4°C y detenida durante 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 2.9 µl de glicerol 1M. Los contaminantes de bajo peso molecular fueron eliminados por medio de UF/DF empleando concentradores Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Alemania) (membrana de 30 kD, celulosa regenerada). Luego se agregaron 19 mg de aminooxi-PSA al retenido por UF/DF y la mezcla fue agitada durante 18 horas a 4°C. El exceso de reactivo PSA fue eliminado por medio de HIC. La conductividad de la mezcla de reacción enfriada fue elevada a 180 mS/cm y se cargó sobre una columna HiTrap Butil FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) de 5 ml (1.6 x 2.5 cm), se preequilibró con HEPES 50 mM, cloruro de sodio 3M, cloruro de calcio 6.7, Tween 80 al 0.01%, pH 6.9. El conjugado fue eluido con 2.4 CV con HEPES 50 mM, cloruro de calcio 6.7 mM, Tween 80 al 0.005%, pH 7.4 a una rata de flujo de 5 ml/minuto.

Ejemplo 8

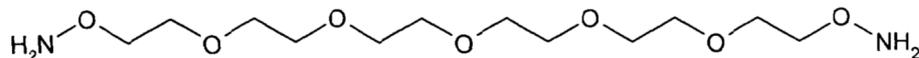
40 Acoplamiento de aminooxi-PSA a rFVIII

45 A 11 mg de rFVIII, disueltos en 11 ml de regulador Hepes pH 6 (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, Tween al 0.01%) se agregaron 57 µl de peryodato de sodio 10 mM. La mezcla fue agitada en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C y detenida durante 30 minutos a 4°C mediante la adición de 107 µl de una solución acuosa de glicerol 1M. Luego se agregaron 19.8 mg de aminooxi-PSA (18.8 kD) y la mezcla se agitó durante la noche a 4°C. Se incrementó la fuerza iónica agregando un regulador que contenía acetato de amonio 8M (acetato de amonio 8M, Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 350 mM, Tween 80 al 0.01%, pH 6.9) para obtener una concentración final de acetato de amonio de 2.5 M. A continuación, la mezcla de reacción fue cargada sobre una columna HiTrap Butil FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) la cual fue equilibrada con el regulador de equilibrio (acetato de amonio 2.5 M, Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 350 mM, Tween 80 al 0.01%, pH 6.9). El producto fue eluido con regulador de elución (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, Tween 80 al 0.01%, pH 7.4), y el eluido fue concentrado por filtración centrífuga utilizando dispositivos Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Alemania) con 30,000 MWCO.

Ejemplo 9

Preparación del enlazante homobifuncional NH₂[OCH₂CH₂]₆ONH₂

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



(3,6,9,12,15-penatoxa-heptadecano-1,17-dioxiamina) que contenía dos grupos aminooxi activos fue sintetizada de acuerdo con Boturny et al. (Tetrahedron 1997;53:5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas empleando una síntesis de Gabriel modificada de aminas primarias. En la primera etapa se hizo reaccionar una molécula de dicloruro de hexaetilen glicol con dos moléculas de Endo-N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida en DMF. El producto homobifuncional deseado fue preparado a partir del intermedio resultante por hidrazinólisis en etanol.

Ejemplo 10

Polisialilación de rFIX empleando un sistema de enlazante maleimido/aminooxi

10 A. Preparación del reactivo de modificación

Se prepara un reactivo de aminooxi-PSA mediante el uso de un sistema enlazador maleimido/aminooxi (Toyokuni et al., Bioconjugate Chem 2003; 14, 1253-9). PSA-SH (20 kD) que contiene un grupo terminal SH- usando un procedimiento de dos etapas: a) Preparación de PSA-NH₂ por aminación reductiva de PSA oxidado con NH₄Cl de acuerdo con la WO05016973A1 y b) introducción de un grupo sulfhidrilo por reacción del grupo amino primario terminal con 2-iminotiolano (reactivo de Traut/Pierce, Rockford, IL) como se describe en US7645860. El PSA-SH es acoplado al grupo maleimido del enlazante a pH 7.5 en regulador de PBS utilizando un exceso molar de 10 veces del enlazante y una concentración de PSA-SH de 50 mg/ml. La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas bajo agitación suave a temperatura ambiente. Cuando el reactivo de enlazamiento en exceso es eliminado y el aminooxi-PSA es intercambiado por regulador hacia un regulador de oxidación (fosfato de sodio 50 mM, pH 6.0) por filtración. El regulador es intercambiado 25 veces empleando una membrana de celulosa regenerada Pellicon XL5 kD (Millipore, Billerica, MA).

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

El rFIX es oxidado en regulador de fosfato de sodio 50 mM, pH 6.0 empleando 100 μM de peryodato de sodio en el regulador. La mezcla fue agitada en la oscuridad durante 1 hora a 4°C y detenida durante 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de glicerol hasta una concentración final de 5 mM. Los contaminantes de bajo peso molecular fueron eliminados por medio de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) empleando columnas desalinizadoras PD-10 (GE Healthcare, Fairfield, CT). El rFIX oxidado fue tratado entonces con anilina para obtener una concentración final de 10 mM y se mezcló con el reactivo de aminooxi-PSA para alcanzar un exceso molar de 5 veces de PSA. La mezcla de reacción fue incubada durante 2 horas bajo agitación suave en la oscuridad a temperatura ambiente.

C. Purificación de los conjugados

El exceso de reactivo de PSA y el rFIX libre son eliminados por medio de HIC. La conductividad de la mezcla de reacción es elevada hasta 180 mS/cm y cargada sobre una columna llena con 48 ml de Butil-Sepharosa FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, cloruro de sodio 3M, cloruro de calcio 6.7 mM, Tween 80 al 0.01%, pH 6.9. Subsecuentemente el conjugado es eluido con un gradiente lineal de regulador de elusión al 60% (Hepes 50 mM, cloruro de calcio 6.7 mM, pH 7.4) en 40 CV. Finalmente las fracciones que contenían PSA-rFIX fueron recolectadas y sometidas a UF/DF mediante el uso de una membrana 30 kD hecha de celulosa regenerada (Millipore). La preparación es caracterizada analíticamente midiendo la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica de FIX. Para los conjugados de PSA-rFIX preparados con ambas variantes se determinó una actividad específica de >50% en comparación con el rFIX nativo.

Ejemplo 11

Preparación del reactivo aminooxi-PSA

Se preparó un reactivo aminooxi-PSA de acuerdo con el Ejemplo 3. El producto final fue diafiltrado contra regulador pH 7.2 (Hepes 50 mM) utilizando una membrana de 5 kD (celulosa regenerada, Millipore), congelado a -80°C y liofilizado. Después de la liofilización el reactivo fue disuelto en el volumen apropiado de agua y utilizado para preparar los conjugados de PSA-proteína a través de modificación con carbohidratos.

Ejemplo 12

Síntesis detallada del reactivo de aminooxi-PSA

Se sintetizó la 3-oxa-pentano-1,5 dioxiamina de acuerdo con Botyryn et al (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) en una síntesis orgánica de dos etapas como se delinea en el Ejemplo 1.

Etapas 1:

- 5 A una solución de Endo-N-hidroxi-5-norboneno-2,3-dicarboxiimida (59.0 g; 1.00 eq) en 700 ml de N,N-dimetilformamida anhidra, se agregaron K_2CO_3 anhidro (45.51 g; 1.00 eq) y 2,2-diclorodietiléter (15.84 ml; 0.41 eq). La mezcla de reacción fue agitada durante 22 horas a 50°C. La mezcla fue evaporada hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo fue suspendido en 2 L de diclorometano y se extrajo dos veces con solución acuosa saturada de NaCl (1 L cada una). La capa de diclorometano fue secada sobre Na_2SO_4 y luego evaporada hasta sequedad bajo presión reducida y secada en alto vacío para dar 64.5 g de 3-oxapentano-1,5dioxi-endo-2',3'-dicarboxidiimidnanorborneno en forma de un sólido blanco amarillento (intermediario 1):

Etapas 2:

- 15 A una solución del intermediario 1 (64.25 g; 1.00 eq) en 800 ml de etanol anhidro, se agregaron 31.0 ml de hidrato de hidracina (4.26 eq). La mezcla de reacción fue sometida a reflujo entonces durante 2 horas. La mezcla fue concentrada a la mitad del volumen de partida evaporando el solvente bajo presión reducida. El precipitado que apareció fue retirado por filtración. La capa de etanol remanente fue evaporada hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo que contenía el producto crudo 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina fue secado al vacío para producir 46.3 g. El producto crudo fue purificado adicionalmente mediante cromatografía de columna (sílica gel 60; elusión isocrática con mezcla diclorometano/metanol, 9+1) para producir 11.7 g del producto final puro 3-oxapentano-1,5-dioxiamina.

20 Ejemplo 13

Preparación del polímero de aminooxi-PSA

- 25 Se disolvieron 1.3 g del ácido colomínico oxidado (23 kDa) en 18 ml de acetato de sodio 50 mM pH 5.5±0.02. Se disolvió un exceso molar de 20 veces de 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecano (también denominado como 3,6,9-trioxaundecano-1,1-dioxiamina) en una cantidad mínima de acetato de sodio 50 mM (pH 5.5±0.02) y se agregó a la solución de PSA. La concentración final de ácido colomínico fue de 62.5 mg/ml. Esta mezcla de reacción fue incubada durante 2±0.1 horas a 22±1.0°C sobre un mezclador suave (22 oscilaciones por minuto). Después de esto, se agregaron 0.65 ml de solución de $NaCNBH_3$ 160 mg/ml a la mezcla de reacción anterior de tal manera que se logro la concentración final de 5.00 mg/ml. Esta fue incubada durante 3.0±0.20 horas a 4.0±1.0°C sobre un agitador (22 oscilaciones por minuto) en un contenedor hermético al aire libre de endotoxina con espacio de cabeza suficiente para mezclar. Para la purificación, la muestra fue diluida con trietanolamina 2 mM, pH 8.0±0.02 para hacer una concentración final de ácido colomínico de 20 mg/ml. La mezcla de reacción fue desalada para eliminar el exceso de 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecano, $NaCNBH_3$ y subproductos de la reacción. Esto fue seguido por la desalinización sobre una columna Sephadex G25 utilizando regulador de trietanolamina 20 mM (pH 8.0±0.02). El pH de la muestra desalinizada fue ajustada a pH 7.8-8.0 y fue ultrafiltrado/diafiltrado con TEA 20 mM pH 8.0 una vez y trietanolamina (TEA) 2 mM pH 8.0 dos veces. La muestra fue liofilizada y almacenada a -80°C.

Alternativamente, se hizo purificación en presencia de elevada concentración de sal durante las etapas de desalinización y ultrafiltración/diafiltración (UF/DF). También se utilizó cromatografía de intercambio aniónico en concentración alta de sal para obtener aminooxi-PSA altamente puro. Por analogía, se sintetizaron diferentes pesos moleculares de aminooxi-PSA.

40 Ejemplo 14

Acoplamiento de diaminooxi (3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina)-PSA a β -galactosidasa

- 45 Para la oxidación de la β -galactosidasa (β -Gal), se utilizaron diferentes concentraciones de $NaIO_4$ (variando desde 0.157 mM a 2 mM). Se oxidaron 0.5 mg de β -Gal bajo pH ácido de 5.75 a 4°C durante 30 minutos en la oscuridad. La oxidación fue detenida agregando $NaHSO_3$ hasta una concentración final de 5 mM. La reacción de conjugación fue llevada a cabo usando el β -Gal oxidado con polímero de diaminooxi PSA (22 kDa). La concentración final del polímero en la mezcla de reacción fue de 1.25 mM mientras que la concentración de β -Gal variaba desde 0.125 mg/ml a 0.76 mg/ml. Todas las reacciones se hicieron a pH 5.75. Se agregó el cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La reacción fue llevada a cabo a 4°C y se recolectaron muestras en intervalos de tiempo de 1, 2 y 24 horas. Los conjugados fueron caracterizados utilizando SDS PAGE e inmunotransferencia western. Un desplazamiento en la banda fue observado para el conjugado en SDS PAGE y este también fue confirmado por inmunoprecipitación western.

5 Con base en las mejores condiciones de reacción, se oxidaron 1.9 mg de β -Gal con 1.5 mM de NaIO_4 durante 30 minutos a 4°C y luego la oxidación fue detenida usando NaHSO_3 hasta una concentración final de 5 mM. La reacción de conjugación fue llevada a cabo utilizando la β -Gal oxidado con el polímero de diaminooxi PSA. Las concentraciones finales de polímero y proteína en la mezcla de reacción fueron 1.25 mM y 0.76 mg/ml respectivamente. El pH final de la mezcla de reacción estuvo alrededor de 5.75. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La reacción fue llevada a cabo a 4°C durante 2 horas. Se caracterizaron los conjugados purificados y no purificados utilizando SDS PAGE e inmunoprecipitación western. Un desplazamiento en la banda fue visto para el conjugado en SDS PAGE y esto fue confirmado por inmunoprecipitación western utilizando anticuerpo anti-PSA. La actividad *in vitro* de los conjugados de PSA- β -Gal fueron comparable a la proteína nativa utilizando AII en uno (kit de ensayo 3Ga1) Pierce). Se observó menos de 50% de actividad en conjugados comparables hechos utilizando química de enlazamiento de aldehídos. Adicionalmente, el proceso global fue escalado hasta 3 veces.

Ejemplo 15

Acoplamiento de diaminooxi-PSA a fetuina

15 La fetuina fue oxidada con NaIO_4 10 mM durante 60 minutos a 4°C en la oscuridad y la oxidación fue detenida agregando NaHSO_3 hasta una concentración final de 10 mM. La reacción de conjugación fue llevada a cabo utilizando la fetuina oxidada con el polímero diaminooxi PSA (23 kDa). La concentración final del polímero en la mezcla de reacción fue de 2.5 mM a pH 5.75. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La concentración final de proteína en la reacción fue de 0.714 mg/ml y la reacción fue llevada a cabo a 4°C durante 2 horas. Estos conjugados fueron caracterizados utilizando SDS PAGE e inmunoprecipitación western. Un desplazamiento en la banda fue observado para los conjugados en SDS PAGE y esto también fue confirmado por inmunoprecipitación western.

25 Para una reacción a escala superior, se oxidaron 5 mg de fetuina con NaIO_4 10 mM durante 60 minutos a 4°C en la oscuridad y luego la oxidación fue detenida agregando NaHSO_3 hasta una concentración final de 10 mM. La reacción de conjugación fue llevada a cabo utilizando la fetuina oxidada con el polímero diaminooxi PSA (23 kDa). La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue 2.5 mM a pH de 5.75. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La reacción fue llevada a cabo a 4°C y se recolectó muestra después de 2 horas. Los conjugados purificados y no purificados fueron caracterizados utilizando SDS PAGE e inmunoprecipitación western. Un desplazamiento en la banda fue observado para el conjugado SDS PAGE y esto también fue confirmado por la inmunoprecipitación western.

Ejemplo 16

Acoplamiento de diaminooxi-PSA a fetuina con anilina que actúa como un catalizador nucleofílico

35 Se oxidaron 0.2 mg de fetuina con NaIO_4 10 mM durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad y luego la oxidación fue detenida agregando NaHSO_3 hasta una concentración final de 5 mM. La reacción de conjugación fue llevada a cabo utilizando la fetuina oxidada con polímero de diaminooxi PSA (23 kDa). La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue 1.25 mM. El pH final de la mezcla de reacción fue de 5.75. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La concentración de proteína final en la reacción fue de 0.125 mg/ml. Se agregaron entonces 84.21 μl de solución de anilina 200 mM a los 1.6 ml de la mezcla de reacción. La reacción fue llevada a cabo a 4°C durante la noche.

Ejemplo 17

Acoplamiento de diaminooxi-PSA a eritropoyetina (EPO)

45 Se oxidaron 0.2 mg de EPO con NaIO_4 10 mM durante 30 minutos a 4°C . La oxidación fue detenida agregando NaHSO_3 hasta una concentración final de 5 mM. La reacción de conjugación fue llevada a cabo utilizando el EPO oxidado con polímero de diaminooxi de 23 kDa) La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue 1.25 mM. La concentración final de EPO en la mezcla de reacción fue de 0.125 mg/ml. El pH final de la mezcla de reacción estaba alrededor de 5.75. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La reacción fue llevada a cabo a 4°C durante 24 horas. El conjugado no purificado fue caracterizado utilizando SDS PAGE. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE.

Ejemplo 18

Acoplamiento de diaminooxi-PSA a EPO con anilina que actúa como catalizador nucleofílico

50 Se oxidaron 0.2 mg de EPO con NaIO_4 10 mM durante 30 minutos a 4°C . La oxidación fue detenida agregando

5 NaHSO₃ hasta una concentración final de 5 mM. La reacción de conjugación fue llevada a cabo utilizando el EPO oxidado con el polímero de diaminooxi PSA (22 kDa) La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue 1.25 mM. El pH final de la mezcla de reacción estuvo alrededor de 5.75. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La concentración de proteína final en la reacción fue de 0.125 mg/ml. Se agregaron entonces 84.21 µl de la solución de anilina 200 mM a los 1.6 ml de la mezcla de reacción. La reacción fue llevada a cabo a 4°C durante la noche. Los conjugados fueron caracterizados usando SDS PAGE. Se observó un desplazamiento en la banda en los conjugados. No se observó efecto adverso de la anilina sobre la actividad de los conjugados.

Ejemplo 19

10 Acoplamiento de diaminooxi-PSA a ADNasa

15 Para la glicopolisialilación de ADNasa, se utilizó ADNasa de páncreas bovino para la reacción de conjugación. Esta fuente de ADNasa fue suministrada como un polvo liofilizado, el cual fue almacenado a -20°C. Antes de la reacción, el polvo liofilizado fue disuelto en regulador de acetato de sodio (pH 5.75). El polímero usado para la glicopolisialilación tenía un peso en el rango de 10 kDa a 22 kDa. Para la oxidación de la unidad estructural glicon de la ADNasa, se utilizó NaIO₄, como agente oxidante hasta una concentración final de 1 mM. La ADNasa fue oxidada al pH ácido de 5.75 a 4°C durante 30 minutos. La oxidación fue detenida agregando NaHSO₃ hasta una concentración final de 2 mM. Después de que se completó la oxidación, la reacción de conjugación fue llevada cabo mediante la adición de polímero de diaminooxi PSA hasta una concentración final de 1.25 mM. Se agregó NaCNBH₃ a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 50 mM o 3.17 mg/ml y la polisialilación de la ADNasa fue llevada a cabo a 4.0±1.0°C durante al menos 2 horas. La reacción fue detenida con exceso molar de 25 de Tris con respecto al polímero. Los conjugados fueron caracterizados usando SDS PAGE e inmunoprecipitación western. Un desplazamiento en la banda fue visto para el conjugado en SDS PAGE y se obtuvo resultado positivo a partir de inmunoprecipitación western. La acidez fue medida como 95% (en comparación con menos del 50% observada en conjugados comparables hechos utilizando la química de enlazantes aldehído).

25 Ejemplo 20

Acoplamiento de diaminooxi (enlazante 3 oxa-pentano-1,5-dioxiamina)-PSA a β-galactosidasa

30 Para la oxidación de la β-galactosidasa, se utilizó NaIO₄ a una concentración de 2 mM. Se oxidaron 3 mg de β-galactosidasa a pH ácido de 5.75 a 4°C durante 30 minutos y luego la oxidación fue detenida agregando NaHSO₃ hasta una concentración final de 2 mM. La reacción de conjugación fue llevada a cabo utilizando la β-galactosidasa oxidada con el polímero de diaminooxi PSA (23 kDa). La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue de 1.5 mM. La concentración final de β-galactosidasa en la mezcla de reacción fue 0.867 mg/ml. El pH final de la mezcla de reacción fue alrededor de 5.75. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La reacción se llevó a cabo a 4°C durante 2 horas. Los conjugados fueron caracterizados utilizando SDS PAGE e inmunoprecipitación western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE y se obtuvo resultado positivo a partir de inmunoprecipitación western.

Ejemplo de referencia 21

Preparación de hidrazida-ácido colomínico

Se utilizó el siguiente protocolo para preparar un PSA-hidrazida (ácido colomínico-hidrazida) utilizando hidrazida de ácido adípico. Se utilizaron métodos análogos para hacer otras PSA-hidrazidas.

40 1. Se disuelve 1 g de ácido colomínico activado en ~10 ml de acetato de sodio 20 mM pH 5.5±0.02. La concentración final de ácido colomínico debería ser 62.5 mg/ml.

2. Se disuelve un exceso molar 25 veces (con respecto al ácido colomínico oxidado "CAO") de ácido adípico de dihidrazida (PM=174.2 g) en una cantidad mínima de acetato de sodio 20 mM (pH 5.5±0.02) y se agrega a la solución del punto 1.

45 3. Cantidad de ácido adípico dihidrazida para ser añadida

= Peso de CAO en gramos x 25 x PM de ácido adípico dihidrazida en g PM de CAO en Daltons

= $1 \times 25 \times 174.2$

15 x 10³

= 0.290 g

4. Después de agregar la solución de ácido adípico de hidrazida, completa el volumen de ácido colomínico con acetato de sodio hasta una concentración final de 62.5 mg/ml. Por lo tanto el volumen total de la reacción es 16 ml.
5. Incubar la mezcla de reacción durante 2 ± 0.1 horas a $22.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ sobre un agitador (22 oscilaciones por minuto).
- 5 6. Preparar solución concentrada de NaCNBH_3 (165 mg/ml) y agregar 0.5 ml a la solución del punto 1 de tal manera que la concentración final de este se hace 5.0 mg/ml en la mezcla de reacción final. Incubar la mezcla de reacción durante 3.0 ± 0.20 horas a $4.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ sobre el agitador (22 oscilaciones por minuto).
- 10 7. Mantener la mezcla de reacción en un contenedor hermético al aire libre de endotoxina con 50 ml en exceso de espacio de cabeza para una mezcla apropiada (debería haber espacio suficiente de tal manera que la mezcla de reacción no toque la tapa del contenedor).
8. Después de 3 horas de reacción a 4°C , diluir la mezcla con trietanolamina 2 mM (completar el volumen hasta 50 ml), a $\text{pH } 8.0 \pm 0.02$ para llevar la concentración final de ácido colomínico a 20 mg/ml.
- 15 9. Desalinizar la mezcla de reacción para eliminar el exceso de ácido adípico y dihidrazida, NaCNBH_3 , etc., no tratados del polímero. Esto puede hacerse mediante GPC (utilizando una matriz de medio XK 50 Sephadex G-25; ≤ 1.8 mg de matriz CA/ml; altura del lecho 35 cm; volumen de columna=687 ml) observando a UV 224 nm y conductividad. La desalinización se lleva a cabo con regulador de trietanolamina 20 mM ($\text{pH}=8.0 \pm 0.02$).
- 10 10. Después de desalinizar, el ácido colomínico hidrazida es sometido a un ciclo de ultrafiltración, un ciclo de diafiltración utilizando TEA 20 mM, $\text{pH } 8.0 \pm 0.02$ y al menos 3 ciclos de diafiltración utilizando TEA 2 mM, $\text{pH } 8.0 \pm 0.02$. Esto puede hacerse utilizando casetes Vivaflow de 3 kDa.
- 20 11. Ajustar el pH de la muestra desalinizada a $\text{pH } 7.8-8.0$. Opcionalmente, liofilizar la muestra y mantenerla consecutivamente durante un secado secundario para eliminar exceso de humedad.

Ejemplo de referencia 22

Acoplamiento de hidrazida-PSA a eritropoyetina

- 25 Para la oxidación de la eritropoyetina (EPO), se utilizó NaIO_4 a una concentración de 10 mM. Se oxidó EPO (1 mg) a $\text{pH } 5.75$ a 4°C durante 30 minutos y luego la oxidación fue detenida agregando NaHSO_3 hasta una concentración final de 5 mM. La reacción de conjugación fue llevada a cabo usando el EPO oxidado con polímero de hidrazida-PSA. El peso molecular de la hidrazida-PSA utilizada para la conjugación fue de 24.34 kDa. La concentración final de hidrazida-PSA en la mezcla de reacción fue de 1.25 mM. La concentración final de EPO en la mezcla de reacción fue de 0.125 mg/ml. El pH final de la mezcla de reacción estuvo alrededor de 5.75. Se agrega cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La reacción se llevó a cabo a 4°C durante 24 horas. Los conjugados fueron caracterizados utilizando SDS PAGE e inmunoprecipitación western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE y se obtuvo un resultado positivo de la inmunoprecipitación western.
- 30

Ejemplo de referencia 23

- 35 Acoplamiento de hidrazida-PSA a β -galactosidasa

- 40 Se oxidó β -galactosidasa (0.5 a 4.5 mg) con 0.625 ml 2 mM de NaIO_4 durante 30 minutos a 4°C . La oxidación fue detenida mediante la adición de NaHSO_3 hasta una concentración final de 5 mM. La reacción de conjugación fue llevada a cabo usando la β -galactosidasa oxidada con hidrazida-PSA que variaba desde 24.34 kDa hasta 27.9 kDa. La concentración final de hidrazida-PSA en la mezcla de reacción fue de 1.25 mM. La concentración final de β -galactosidasa en la mezcla de reacción estuvo en un rango desde 0.125 mg/ml hasta 0.76 mg/ml. El pH final de la mezcla de reacción debería estar alrededor de 5.75. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La reacción fue llevada a cabo a 4°C y las muestras fueron recolectadas a 1, 2 y 24 horas. El conjugado purificado y no purificado fue caracterizado utilizando SDS PAGE e inmunoprecipitación western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE y se obtuvo un resultado positivo de la inmunoprecipitación western. La actividad fue medida como 84%. Se observó menos de 50% de actividad en conjugados comparables hechos utilizando química de enlazante aldehído.
- 45

Ejemplo de referencia 24

Acoplamiento de hidrazida-PSA a fetuina

5 Se oxidó fetuina (0.25 mg) con NaIO_4 (5 o 10 mM) durante 30 o 60 minutos a 4°C . La oxidación fue detenida agregando NaHSO_3 hasta una concentración final de 5 o 10 mM según sea apropiado para coincidir con la concentración de NaIO_4 usada para la oxidación. Las reacciones de conjugación fueron llevadas a cabo utilizando la fetuina oxidada con el polímero de ácido adípico dihidrazida-PSA. La concentración final del polímero en la mezcla de reacción estuvo entre 1.25 y 2.5 mM. El pH final de la mezcla de reacción estuvo alrededor de 5.75. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La reacción se llevó a cabo a 4°C durante 1 hora a 4 horas. Los conjugados fueron caracterizados utilizando SDS PAGE e inmunoprecipitación western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE para cada conjunto de condiciones de reacción y se obtuvo un resultado positivo de la inmunoprecipitación western.

15 Se llevó a cabo una reacción escalada para 5 mg de fetuina seguida por purificación del conjugado resultante. Se oxidaron 5 mg de fetuina con NaIO_4 10 mM durante 60 minutos a 4°C y luego se detuvo la oxidación agregando NaHSO_3 hasta una concentración final de 10 mM. La reacción de conjugación fue llevada a cabo utilizando la fetuina oxidada con el polímero de ácido adípico dihidrazida-PSA. La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue 2.5 mM. El pH final de la mezcla de reacción estuvo alrededor de 5.75. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La reacción se llevó a cabo a 4°C y se recolectaron muestras a las 2 horas. El conjugado purificado y no purificado fue caracterizado utilizando SDS PAGE e inmunoprecipitación western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE y se obtuvo un resultado positivo de la inmunoprecipitación western.

20 Ejemplo de referencia 25

Acoplamiento de hidrazida-PSA a ADNasa

25 La ADNasa se oxidó con NaIO_4 a una concentración final que variaba de 0.2 mM a 2 mM durante 30 minutos a 4°C . La reacción de oxidación fue detenida agregando NaHSO_3 a una concentración final de entre 2 y 5 mM dependiendo de la concentración de NaIO_4 usada para la oxidación. La glicopolisialilación de la ADNasa oxidada fue llevada a cabo mediante la adición de polímero de hidrazida-PSA a una concentración final de 1.25 mM a la ADNasa oxidada. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración final de 50 mM o 3.17 mg/ml y la glicopolisialilación de la ADNasa se llevó a cabo a 4.0°C durante un período de tiempo que variaba de 1 hora a 2 horas. Las reacciones fueron detenidas con un exceso molar de 25 veces de Tris con respecto al polímero. Los conjugados fueron caracterizados usando SDS PAGE e inmunoprecipitación western. Se observó un desplazamiento en la banda para los conjugados en SDS PAGE y se obtuvo un resultado positivo de la inmunoprecipitación western. La actividad fue medida como 49%.

30 Ejemplo de referencia 26

PEGilación de β -galactosidasa utilizando enlazante aminooxi (3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina)

35 Se oxidó β -galactosidasa (1 mg) con NaIO_4 1.5 mg durante 30 minutos a 4°C . La oxidación fue detenida agregando NaHSO_3 hasta una concentración final de 1.5 mM.

40 La reacción de conjugación fue llevada a cabo usando la β -galactosidasa oxidada con polímero diaminooxi-PEG (20 kDa). La concentración final del polímero en la mezcla de reacción fue de 1.25 mM. La concentración final de β -galactosidasa en la mezcla de reacción fue de 1 mg/ml. El pH final de la mezcla de reacción debería estar alrededor de 5.75. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La reacción fue llevada a cabo a 4°C durante 2 horas. El conjugado no purificado fue caracterizado utilizando SDS PAGE y se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE. La actividad fue medida como 59%.

Ejemplo de referencia 27

PEGilación de eritropoyetina utilizando enlazante aminooxi

45 Se oxidó eritropoyetina (EPO; 0.2 mg) con NaIO_4 5 o 10 mM en acetato de sodio 50 mM a pH 5.75 durante 45 minutos a 4°C y luego la oxidación fue detenida agregando NaHSO_3 a una concentración final de 5 o 10 mM (para coincidir con la concentración de NaIO_4 usada para la oxidación). La reacción de conjugación fue llevada a cabo usando la EPO oxidada con el polímero de diaminooxi-PEG (20 kDa). La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue 1.5 mM. El pH final de la mezcla de reacción debería estar alrededor de 5.75. Se agregó cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3.17 mg/ml. La concentración final de proteína en la reacción fue de 0.4 mg/ml. La reacción de conjugación fue llevada a cabo durante la noche a 4°C .

50

La invención provee así conjugados de compuestos diferentes a proteínas de coagulación de la sangre con polímeros solubles en agua, en particular PSA y mPSA.

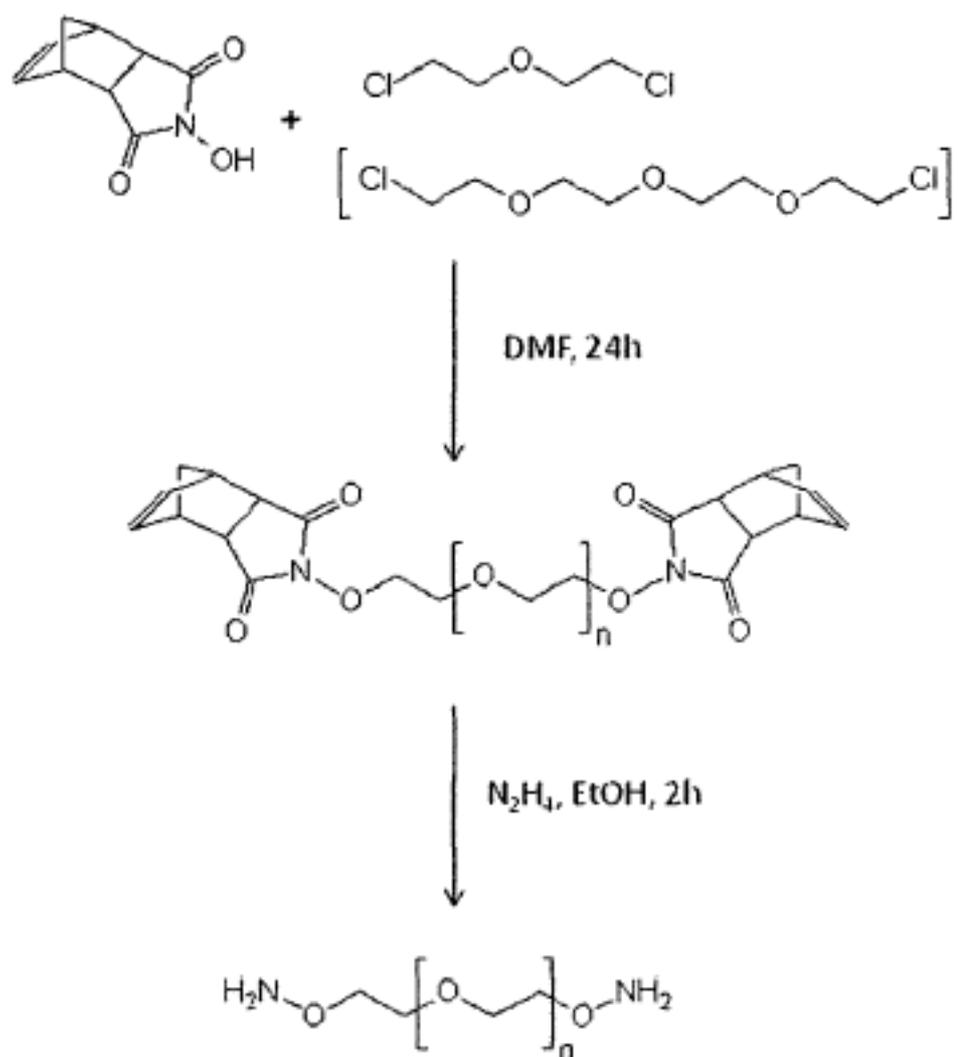
Reivindicaciones

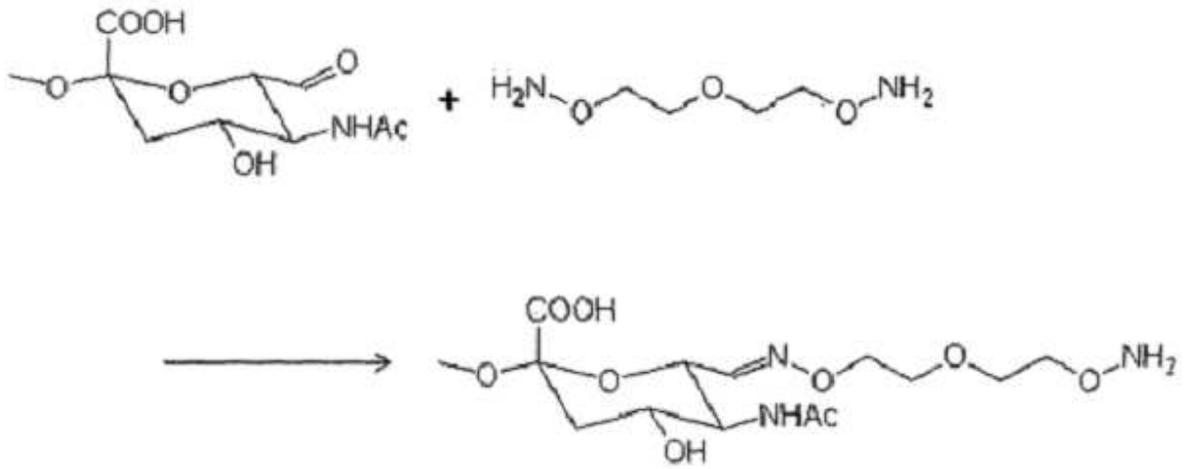
- 5 1. Un método para conjugar ácido polisiálico (PSA) o un PSA modificado (mPSA) a una unidad estructural oxidada de una glicoproteína diferente a una proteína de coagulación de la sangre que comprende un grupo carbohidrato, que comprende poner en contacto la unidad estructural carbohidrato oxidada con el PSA o el mPSA bajo condiciones que permite la conjugación, en donde dicho PSA o mPSA contiene un grupo aminooxi y se forma un enlace oxima entre la unidad estructural carbohidrato oxidada y el grupo aminooxi sobre el PSA o el mPSA, en donde el PSA modificado es PSA que comprende una unidad estructural derivada de una unidad estructural de ácido N-acetilneuramínico terminal por oxidación o reducción.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el PSA o el mPSA es ácido colomínico o ácido colomínico modificado.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en donde el PSA o mPSA comprende 2-500 unidades de ácido siálico.
- 15 4. El método de acuerdo con cualquier reivindicación previa en donde la glicoproteína es seleccionada de citoquinas tales como interleucinas, alfa, beta y gamma interferones, factores estimuladores de colonias que incluyen factores estimuladores de colonias de granulocitos, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de plaquetas, proteína activadora de fosfolipasa (PUP), insulina, proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas, factores de necrosis tumoral y alelos relacionados, formas solubles de receptores de factor de necrosis tumoral, receptores de interleucina y formas solubles de receptores de interleucina, factores de crecimiento, factores de crecimiento de tejidos, factores de crecimiento transformantes tales como TGF α s o TGF β s y factores de crecimiento epidérmico, hormonas, somatomedinas, hormonas pigmentarias, factores de liberación hipotalámica, hormonas antiidiuréticas, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimulante de folículo, hormona estimulante de tiroides, activador de plasminógeno en tejidos, inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, anticuerpos monoclonales, eritropoyetina (EPO), factores sanguíneos diferentes a proteínas de coagulación de la sangre, galactosidasas, α -galactosidasas, β -galactosidasas, ADNasas, fetuina, fragmentos de las mismas y proteínas de fusión que comprenden cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente o fragmentos de las mismas.
- 20 5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en donde la glicoproteína es seleccionada de factores de necrosis tumoral y alelos relacionados, formas solubles de receptores de factor de necrosis tumoral, inmunoglobulinas tales como las IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, anticuerpos monoclonales, eritropoyetina (EPO), ADNasas, fetuina, fragmentos de las mismas y proteínas de fusión que comprenden cualquiera de las proteínas antes mencionadas o fragmentos de las mismas.
- 25 6. El método de acuerdo con cualquier reivindicación previa que, comprende oxidar la unidad estructural carbohidrato incubando la glicoproteína con peryodato de sodio (NaIO $_4$).
- 30 7. El método de acuerdo con cualquier reivindicación previa que comprende oxidar el PSA o el mPSA para formar un grupo aldehído sobre una unidad terminal del PSA o el mPSA, y haciendo reaccionar el PSA o el mPSA oxidado con un enlazante aminooxi.
- 35 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende oxidar el PSA o el mPSA usando NaIO $_4$.
9. El método de acuerdo con cualquier reivindicación previa que comprende poner en contacto la unidad estructural carbohidrato oxidada con PSA o mPSA en un regulador que comprende un catalizador nucleofílico seleccionado de anilina y derivados de anilina.
- 40 10. El método de acuerdo con cualquier reivindicación previa en donde el grupo aminooxi es formado haciendo reaccionar PSA o mPSA oxidado con un enlazante aminooxi, y el enlazante aminooxi es 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina o 3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina.
11. El método de acuerdo con cualquier reivindicación previa que comprende adicionalmente reducir un enlace oxima en la glicoproteína conjugada por incubación en la presencia de un compuesto reductor.
- 45 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en donde el compuesto reductor es cianoborohidruro de sodio (NaCNBH $_3$) o ácido ascórbico (vitamina C):
13. Una glicoproteína conjugada obtenible por el método de acuerdo con cualquier reivindicación previa.
14. Una glicoproteína conjugada diferente a proteína de coagulación de la sangre que comprende:

(a) la glicoproteína; y

(b) al menos un aminooxi-PSA o aminooxi-mPSA enlazado a la glicoproteína de (a), en donde dicho aminooxi-PSA o aminooxi-mPSA esta unido a la glicoproteína a través de una o más unidades estructurales carbohidrato, en donde el mPSA es PSA que comprende una unidad estructural derivada de una unidad estructural de ácido N-acetilneuramínico terminal por oxidación o reducción.

5

**Fig.1**



Etapa de reducción para estabilizar la base de Schiff:

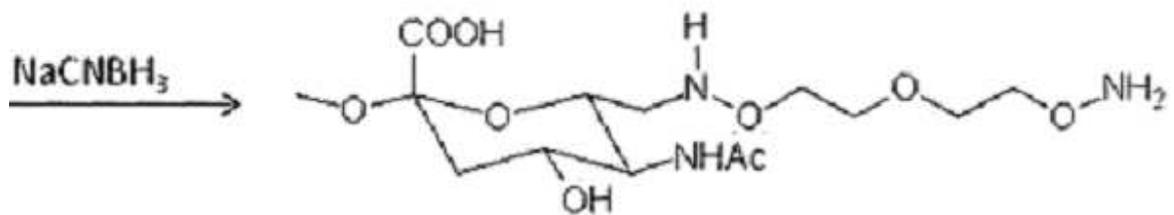


Fig.2