

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 082**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05767845 .0**
96 Fecha de presentación: **30.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1765411**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **Conjugados de resto de Factor IX y polímeros**

30 Prioridad:
30.06.2004 US 584505 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.11.2012

73 Titular/es:
NEKTAR THERAPEUTICS (100.0%)
455 Mission Bay Boulevard South Suite 100
San Francisco CA 94158 , US

72 Inventor/es:
BOSSARD, MARY, J. y
STEPHENSON, GAYLE

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 390 082 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de resto de Factor IX y polímeros

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a conjugados que comprenden un resto de Factor IX (es decir, un resto que tiene actividad de Factor IX) y a un polímero. A demás, la presente invención se refiere a las composiciones que comprenden los conjugados, los métodos para la síntesis de los conjugados, los métodos para el suministro de los conjugados, y los métodos para el tratamiento de los pacientes.

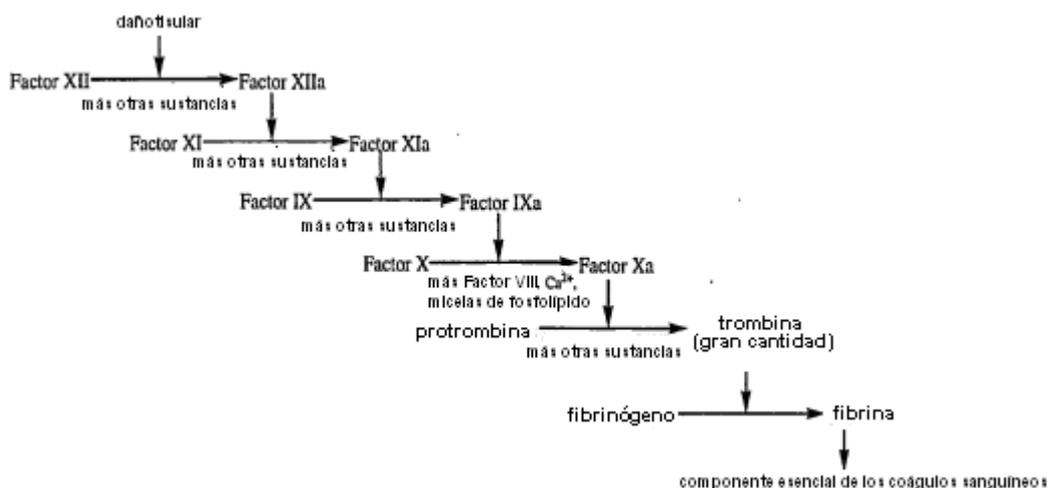
Antecedentes de la invención

La hemostasis es el proceso de detener el flujo de sangre desde un vaso sanguíneo lesionado. Para los mamíferos, así como para otros muchos organismos, el proceso hemostático es de importancia crítica para la supervivencia continuada. Los defectos del proceso hemostático pueden provocar, por ejemplo, la incapacidad de formar de manera eficaz coágulos sanguíneos que sirven para detener la pérdida de sangre después de una lesión vascular. En los seres humanos, los individuos que padecen una incapacidad para formar coágulos sanguíneos se denominan hemofílicos. Es de particular interés para los hemofílicos el riesgo que amenaza su vida, ya que una vez iniciado, el sangrado nunca cesará.

Generalmente, los hemofílicos carecen de la capacidad de producir cantidades eficaces de una o más sustancias que se requieren, en última instancia, para la transformación del fibrinógeno soluble en fibrina. Por ejemplo, los hemofílicos que padecen la hemofilia B (también llamada "deficiencia congénita del factor IX" y "enfermedad de Navidad") tienen la incapacidad de producir niveles eficaces de Factor IX. El factor IX es un componente clave de una de las varias "cascadas" de reacciones que dan como resultado la formación de coágulos sanguíneos. El factor IX, crítico para la cascada de reacciones mencionadas como la "vía intrínseca", influye en última instancia en la conversión del fibrinógeno en el componente principal de los coágulos sanguíneos, la fibrina.

Aunque el proceso a través del cual se forman los coágulos sanguíneos es relativamente complejo, el papel del Factor IX en la vía intrínseca se puede describir brevemente. Cuando la sangre entra en contacto con superficies con carga negativa y/o tejidos conectivos subendoteliales (como resultado de, por ejemplo, el daño tisular asociado con una laceración), el Factor XII (o factor de Hageman) en presencia de otras sustancias se transforma en el Factor XIIa. El factor XIIa (junto con otras sustancias) transforma el Factor XI en el Factor XIa. A su vez, el Factor XIa (junto con otras sustancias) transforma el Factor IX en el Factor IXa. El Factor VIII, el Factor IXa, los iones de calcio y las micelas fosfolipídicas forman un complejo de lipoproteína con el Factor X y lo activan para formar el Factor Xa. A partir de entonces, el Factor Xa (junto con otras sustancias) convierte la protrombina en trombina, dando como resultado la producción en el tiempo de una cantidad relativamente grande de trombina. Cantidades relativamente grandes de trombina convierten el fibrinógeno en fibrina. La fibrina, a su vez, forma la matriz o la red que es responsable de la formación de los coágulos sanguíneos.

Se muestra esquemáticamente a continuación el papel del Factor IX en la vía intrínseca de la coagulación sanguínea.



Afectando a uno de cada 34500 hombres, la hemofilia B puede provenir de una diversidad de mutaciones del gen del Factor IX, que se encuentra en el cromosoma X. Dependiendo de la mutación en particular, la hemofilia B se puede

manifiestar en sí misma como grave, moderada o leve. Los individuos que padecen las formas más graves de hemofilia B carecen totalmente de la capacidad de expresar las formas activas del Factor IX. Clínicamente, los individuos afectados con hemofilia B padecen sangrados nasales, fácil aparición de hematomas, hemorragia en las articulaciones, y sangrado prolongado de las heridas. El tratamiento actual de la hemofilia B indica la infusión de concentrado de Factor IX exógeno recogido a partir de plasma humano o preparado a través de técnicas de ADN recombinante. Debido a que sus tratamientos sólo sirven para complementar la carencia de los niveles eficaces de Factor IX, los individuos que padecen las formas graves de hemofilia B necesitan inyecciones regulares (tan a menudo como tres veces a la semana) de concentrado de Factor IX a lo largo de sus vidas. Los pacientes que padecen incluso las formas más moderadas de hemofilia B a menudo necesitan la inyección de concentrado de Factor IX antes y/o a continuación de la cirugía y del trabajo dental.

Están disponibles varias formas comerciales de concentrados de Factor IX para proporcionar la terapia de sustitución para los pacientes que padecen hemofilia B. Por ejemplo, los productos de complejo de Factor IX derivados de la sangre (que contienen otros factores) se comercializan con las marcas BEBULIN VH® (Baxter Healthcare, Viena, Austria), KONYNE 80® (Bayer Corporation, Elkhart IN), PROFILNINE SD™ (Alpha Therapeutic Corporation, Los Angeles CA), y PROPLEX T® (Baxter Healthcare, Glendale CA). Las formas algo más purificadas de productos del Factor IX se comercializan como las marcas ALPHANINE SD® (Alpha Therapeutic Corporation, Los Angeles CA) e IVIONONINE® (Aventis Behring, Kankakee IL). Con respecto a los concentrados de Factor IX preparados de manera recombinante, actualmente está disponible un producto con la marca BENEFIX® (Wyeth/Genetics Institute, Cambridge IVIA).

Generalmente, la fuente recombinante de concentrado de Factor IX se favorece sobre las fuentes derivadas de la sangre ya que las últimas implican el riesgo de transmisión de virus y/o otras enfermedades. Además, a menudo la pureza es más alta con la fuente recombinante, evitando de ese modo los problemas potenciales que surgen de la administración de factores de sangre no deseados y de otras proteínas generalmente presentes en fuentes derivadas de la sangre.

A pesar de los beneficios de la administración de una formulación basada en recombinante, el procesamiento de los productos basados en recombinantes a menudo necesita la presencia de determinadas proteínas tales como la albúmina, que puede estar presente en la formulación final administrada al paciente. Como resultado, los pacientes que reciben tales formulaciones desarrollan reacciones alérgicas a estas proteínas extrañas. En cualquier caso, tanto los productos derivados de la sangre como los basados en recombinantes sufren la desventaja de la administración repetida.

La PEGilación, o la unión de un derivado de poli(etilenglicol) a una proteína, se ha descrito como un medio para reducir la inmunogenicidad así como un medio para prolongar la vida media *in vivo* de una proteína. Con respecto al Factor IX, sin embargo, los enfoques previos para la formación de conjugados proteína-polímero sufrieron diversas deficiencias.

Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de América N° 5.969.040 describe un proceso que comprende la etapa de oxidación de los dioles vecinales de los restos de hidrato de carbono en la región de activación del Factor IX para formar aldehídos. Después de la etapa de oxidación, el proceso que se ha descrito incluye la etapa de unión covalente de uno o más polímeros no antigénicos [tales como un derivado de poli(etilenglicol) que soporta hidrazina] a los restos oxidados de hidrato de carbono. Sin embargo, un problema con este enfoque, es la complejidad aumentada atribuida a las etapas adicionales necesarias para obtener una forma oxidada del Factor IX. Además, cualquier oxidante que pueda permanecer después de la etapa de oxidación puede degradar el polímero asociado con el conjugado. Finalmente, este enfoque se limita a la conjugación usando polímeros específicos (es decir, polímeros que contienen hidrazida) y regiones específicas en el Factor IX (es decir, dioles vecinales de los restos hidrato de carbono en la región de activación del Factor IX).

La presencia de oxidantes (presentes como resultado del proceso que se ha descrito en la Patente de los Estados Unidos de América N° 5.969.040, o por otras causas) presenta desafíos adicionales con respecto a proporcionar un producto farmacéuticamente aceptable de un polímero conjugado con el Factor IX. Específicamente, la metionina y otros aminoácidos que contienen hidroxilo se pueden someter a una oxidación no deseada en presencia de oxidantes, introduciendo de ese modo grupos aldehído. Cualquier aldehído residual que no reaccionó con el reactivo polimérico será reactivo y puede dañar potencialmente la proteína. Para abordar este problema, los aldehídos sin reaccionar necesitan una protección con glicina u otra molécula pequeña para estabilizar la proteína. Al hacerlo, sin embargo, surge un problema analítico en el que, a efectos de regulación, un producto se debería definir fácilmente; la introducción de componentes adicionales puede frustrar la definición del producto de otra manera sencilla. En particular, el uso de agentes protectores presentaría un desafío particularmente difícil.

La Patente de los Estados Unidos de América N° 6.037.452 describe la unión de un poli(óxido de alquileno) al Factor IX, en el que la unión al Factor IX se efectúa a través de un poli(óxido de alquileno) que soporta uno de los siguientes grupos reactivos: triazina, acetilo, hidrazina, diazonio, amino, y éster de succinimidilo. Una vez más, sin embargo, la referencia carece de la divulgación de llevar a cabo una unión a través de polímeros que soportan grupos reactivos distintos de triazina, acetilo, hidrazina, diazonio, amino, o éster de succinimidilo.

El documento US-A-6037452, el documento WO94/18247, el documento WO03/040211 y el documento WO 97/11957 describen, todos, la unión teórica de polietilenglicol al Factor IX.

5 De este modo, sigue habiendo una necesidad en la técnica para proporcionar conjugados adicionales entre polímeros solubles en agua y restos que tienen actividad de Factor IX. En particular, hay una necesidad para proporcionar procesos más sencillos para la conjugación de un polímero con un resto que tiene actividad de Factor IX. La presente invención se dirige por lo tanto a tales conjugados así como a las composiciones que comprenden los conjugados y los métodos relacionados como se ha descrito en el presente documento, que se cree que son nuevos y no se sugieren totalmente en la técnica.

Sumario de la invención

15 Por consiguiente, en una o más realizaciones de la presente invención, se proporciona un conjugado, conjugado que comprende un resto de Factor IX unido covalentemente, a través de una unión amida directamente o a través de un resto espaciador compuesto de uno o más átomos, a un polímero soluble en agua, en el que el peso molecular promedio en peso del polímero soluble en agua es de 6000 daltons a 100000 daltons, en el que el conjugado no incluye más de 6 polímeros solubles en agua y en el que el polímero fuente de agua es poli(etilenglicol).

20 En una o más realizaciones de la presente invención, se proporciona un conjugado, conjugado que comprende un resto de Factor IX unido covalentemente a través de una unión amida directamente o a través de un resto espaciador compuesto de uno o más átomos a un polímero soluble en agua no lineal que es poli(etilenglicol).

25 En una o más realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición, composición que comprende una pluralidad de conjugados, en la que al menos aproximadamente el 80% de cada uno de todos los conjugados en la composición está compuesto de un resto de Factor IX unido covalentemente a uno, dos, tres o cuatro polímeros solubles en agua, cada polímero soluble en agua en el conjugado tiene un peso molecular promedio en peso de desde 6000 a 100000 daltons y en el que adicionalmente para cada polímero soluble en agua en el conjugado, el resto de Factor IX está unido a través de un enlace amida directamente o a través de un resto espaciador compuesto de uno o más átomos en el que el polímero soluble en agua válido se selecciona entre un poli(óxido de alquileo), poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), polioxazolina, poli(poliol oxetilado), alcohol poliolefinico, poli(hidroalquilmetacrilamida), poli(hidroalquilmetacrilato), polisacáridos, poli(α-hidroxiácido), polifosfazeno, polioxazolina, y poli(acrilolmorfolina). Las composiciones incluyen todos los tipos de formulaciones y en particular aquéllas que son adecuadas para la inyección tales como los polvos que se pueden reconstituir, así como los líquidos (por ejemplo, suspensiones y soluciones).

40 En una o más realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para la preparación de un conjugado como se ha descrito anteriormente, comprendiendo el método la adición de una composición de reactivo polimérico a una composición de Factor IX en condiciones suficientes para dar como resultado un conjugado que comprende un resto de Factor IX unido covalentemente, directamente o a través de un resto espaciador compuesto de uno o más átomos, a un polímero soluble en agua.

45 También se describe en el presente documento un método para proporcionar el suministro de un conjugado, comprendiendo el método la administración al paciente de una composición que comprende un conjugado como se ha descrito en el presente documento. La etapa de administración del conjugado se puede efectuar por inyección (por ejemplo, inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, etcétera) u otro enfoque.

Breve descripción de las figuras

50 La Figura 1 y la Figura 2 son copias de geles que resultan del análisis de muestras por electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) descritas en los Ejemplos 1 a 4.

La Figura 3 es una copia de un gel que resulta del análisis SDS-PAGE de muestras descritas en los Ejemplos 5, 6, 10 y 11.

55 La Figura 4 es una copia de un gel que resulta del análisis SDS-PAGE de muestras descritas en los Ejemplos 2, 9 y 12 a 16.

La Figura 5 es una representación gráfica que corresponde a la solución de conjugación resultante del Ejemplo 1.

60 La Figura 6 es una representación gráfica que corresponde a la solución de conjugación resultante del Ejemplo 2.

La Figura 7 es una representación gráfica que corresponde a la solución de conjugación resultante del Ejemplo 3.

65 La Figura 8 es una representación gráfica que corresponde a la solución de conjugación resultante del Ejemplo 4.

La Figura 9 es una representación gráfica que corresponde a la solución de conjugación resultante del Ejemplo 12.

La Figura 10 es una representación gráfica que corresponde a la solución de conjugación resultante del Ejemplo 13.

5 La Figura 11 es una representación gráfica que corresponde a la solución de conjugación resultante del Ejemplo 14.

La Figura 12 es una representación gráfica que corresponde a la solución de conjugación resultante del Ejemplo 15.

Descripción detallada de la invención

10 Se debe indicar que, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas en singular "un," "una," "uno," y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un polímero" incluye un polímero único así como dos o más de los mismos o diferentes polímeros, la referencia a "un excipiente opcional" se refiere a un excipiente opcional único así como a dos o más de los mismos o de diferentes excipientes opcionales.

Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que se describen a continuación.

20 "PEG," "polietilenglicol" y "poli(etilenglicol)", como se usa en el presente documento, son intercambiables. Típicamente, PEG para su uso de acuerdo con la presente invención comprende la siguiente estructura $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ en la que (n) es de 2 a 4000. Como se usa en el presente documento, PEG también incluye $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ y $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{O}-$, dependiendo de si se han desplazado o no los oxígenos terminales. A lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, se debería recordar que el término "PEG" incluye las estructuras que tienen diversos grupos terminales o "protectores terminales" etcétera. El término "PEG" también significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, más de un 50%, de subunidades de repetición $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$. Con respecto a las formas específicas, el PEG puede adoptar cualquier número de una diversidad de pesos moleculares, así como las estructuras o las geometrías tales como "ramificada," "lineal," "bifurcada," "multifuncional," que se describirán con mayor detalle a continuación.

30 Los términos "terminación protegida" y "protegido terminalmente" se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a una parte terminal o a un extremo de un polímero que tiene un resto con protección terminal. Típicamente, aunque no necesariamente, el resto de protección terminal comprende un grupo hidroxilo o alcoxi C_{1-20} , más preferentemente un grupo alcoxi C_{1-10} , y aún más preferentemente un grupo alcoxi C_{1-5} . De este modo, los ejemplos de restos de protección terminal incluyen alcoxi (por ejemplo, metoxi, etoxi y benciloxi), así como arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo. Se debe recordar que el resto de protección terminal puede incluir uno o más átomos del monómero terminal en el polímero [por ejemplo, el resto de protección terminal "metoxi" en $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$] o no [por ejemplo, "CH₃" en $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$]. Además, se prevén las formas saturada, insaturada, sustituida y no sustituida de cada uno de los anteriores. Además, el grupo de protección terminal también puede ser un silano. El grupo de protección terminal también puede comprender ventajosamente un marcador detectable. Cuando el polímero tiene grupo de protección terminal que comprende un marcador detectable, se puede determinar la cantidad o la posición del polímero y/o del resto (por ejemplo, agente activo) al que se acopla el polímero usando un detector adecuado. Tales marcadores incluyen fluorescentes, quimioluminiscentes, restos usados en marcado enzimático, restos colorimétricos (por ejemplo, colorantes), iones metálicos, restos radiactivos. Los detectores adecuados incluyen fotómetros, películas, espectrómetros. El grupo de protección terminal también puede comprender ventajosamente un fosfolípido. Cuando el polímero tiene un grupo de protección terminal que comprende un fosfolípido, se confieren propiedades únicas al polímero y a cualquier conjugado resultante. Los fosfolípidos ejemplares incluyen aquellos seleccionados entre la clase de fosfolípidos denominados fosfatidilcolinas. Los fosfolípidos específicos incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en dilaurilfosfatidilcolina, dioleilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diesteroilfosfatidilcolina, behenoilfosfatidilcolina, araquidilfosfatidilcolina, y lecitina.

55 "De origen no natural" con respecto a un polímero que se ha descrito en el presente documento, significa un polímero que no se encuentra en la naturaleza en su totalidad. Un polímero de origen no natural puede contener, sin embargo, uno o más monómeros o segmentos de monómeros que son de origen natural, siempre que la estructura global del polímero no se encuentre en la naturaleza.

60 El término "soluble en agua" como en un "polímero soluble en agua" es cualquier polímero que es soluble en agua a temperatura ambiente. Típicamente, un polímero soluble en agua transmitirá al menos aproximadamente el 75%, más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, de la luz transmitida a través de la misma solución después de la filtración. En base al peso, un polímero soluble en agua será preferentemente soluble en agua en al menos aproximadamente un 35% (en peso), más preferentemente soluble en agua en al menos aproximadamente un 50% (en peso), aún más preferentemente soluble en agua en aproximadamente un 70% (en peso), y aún más preferentemente soluble en agua en aproximadamente un 85% (en peso). Sin embargo, es más preferente, que el polímero soluble en agua sea soluble en agua en aproximadamente un 95% (en peso) o totalmente soluble en agua.

- 5 Peso molecular en el contexto de un polímero soluble en agua, tal como PEG, se puede expresar como un peso molecular promedio en número o un peso molecular promedio en peso. A menos que se indique lo contrario, en el presente documento todas las referencias al peso molecular se refieren al peso molecular promedio en peso. Tanto las determinaciones de peso molecular, promedio en número como promedio en peso, se pueden medir usando la cromatografía de exclusión molecular u otras técnicas de cromatografía líquida. También se pueden usar otros métodos para la medida de los valores del peso molecular, tales como el uso del análisis del grupo terminal o la medida de las propiedades coligativas (por ejemplo, disminución del punto de congelación, elevación del punto de ebullición, o presión osmótica) para determinar el peso molecular promedio en número o el uso de técnicas de dispersión de la luz, ultracentrifugación o viscosimetría para determinar el peso molecular promedio en peso. Los polímeros de la presente invención son típicamente polidispersos (es decir, el peso molecular promedio en número y el peso molecular promedio en peso de los polímeros no es el mismo), teniendo bajos valores de polidispersión preferentemente menores que aproximadamente 1,2, más preferentemente menores que aproximadamente 1,15, aún más preferentemente menores que aproximadamente 1,10, todavía aún más preferentemente menores que aproximadamente 1,05, y más preferentemente menores que aproximadamente 1,03. Como se usa en el presente documento, las referencias a veces se harán para un polímero soluble en agua único que tiene un peso molecular promedio en peso o un peso molecular promedio en número; se entenderá que tales referencias significan que el polímero soluble en agua único se obtuvo a partir de una composición de polímeros solubles en agua que tienen el peso molecular indicado.
- 10 Los términos "activo" o "activado" cuando se usan en conjunto con un grupo funcional en particular, se refieren a un grupo funcional reactivo que reacciona rápidamente con un electrófilo o con un nucleófilo o con otra molécula. Ésto sucede en contraste con aquellos grupos que requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción muy poco prácticas para reaccionar (es decir, un grupo "no reactivo" o "inerte").
- 15 Como se usa en el presente documento, el término "grupo funcional" o cualquier sinónimo del mismo significa que incluye las formas protegidas del mismo así como las formas no protegidas.
- 20 Los términos "resto espaciador," "enlace" y "engarce" se usan en el presente documento para referirse a un átomo o a un conjunto de átomos usados opcionalmente para unir restos de interconexión tales como una parte terminal de un polímero soluble en agua y un resto del Factor IX o un resto electrófilo o nucleófilo de un Factor IX. El resto espaciador puede ser hidrolíticamente estable o puede incluir un enlace fisiológicamente hidrolizable o enzimáticamente degradable.
- 25 "Alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburos, que oscila típicamente de aproximadamente 1 a 15 átomos de longitud. Tales cadenas de hidrocarburos son preferentemente, pero no necesariamente, saturadas y pueden ser de cadena ramificada o lineal, aunque típicamente se prefiere la cadena lineal. Los grupos alquilo ejemplares incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo, y similares. Como se usa en el presente documento, "alquilo" incluye cicloalquilo así como alquilo que contiene cicloalquileo.
- 30 "Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, y puede ser de cadena lineal o ramificado, como se ejemplifica a través de metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, y t-butilo.
- 35 "Cicloalquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo cíclico saturado o insaturado, que incluye compuestos cíclicos con puente, condensados, o espiro, compuestos preferentemente de 3 a aproximadamente 12 átomos de carbono, más preferentemente de 3 a aproximadamente 8 átomos de carbono. "Cicloalquileo" se refiere a un grupo cicloalquilo que se inserta en una cadena de alquilo a través del enlace de la cadena a cualquiera de los dos carbonos en el sistema de anillo cíclico.
- 40 "Alcoxi" se refiere a un grupo -O-R, en el que R es alquilo o alquilo sustituido, preferentemente alquilo C₁₋₆ (por ejemplo, metoxi, etoxi, propiloxi, etcétera).
- 45 El término "sustituido" como en, por ejemplo, "alquilo sustituido," se refiere a un resto (por ejemplo, un grupo alquilo) sustituido con uno o más sustituyentes que no interfieren, tales como, pero no limitados a: alquilo, cicloalquilo C₃₋₈, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo; halo, por ejemplo, flúor, cloro, bromo, y yodo; ciano; alcoxi, fenilo inferior; fenilo sustituido; "Ariilo sustituido" es un ariilo que tiene uno o más grupos que no interfieren como un sustituyente. Para las sustituciones de un anillo de fenilo, los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (es decir, orto, meta, o para).
- 50 "Sustituyentes que no interfieren" son aquellos grupos que, cuando están presentes en una molécula, son típicamente no reactivos con otros grupos funcionales contenidos en la molécula.
- 55 "Ariilo" significa uno o más anillos aromáticos, cada uno con 5 ó 6 átomos de carbono en el núcleo. Ariilo incluye múltiples anillos ariilo que pueden estar condensados, como en naftilo o sin condensar, como en bifenilo. Los anillos ariilo también pueden estar condensados o sin condensar con uno o más anillos de hidrocarburo cíclico, heteroarilo, o heterocíclico. Como se usa en el presente documento, "ariilo" incluye heteroarilo.
- 60
- 65

"Heteroarilo" es un grupo arilo que contiene de uno a cuatro heteroátomos, preferentemente azufre, o oxígeno, o nitrógeno, o una combinación de los mismos. Los anillos de heteroarilo también pueden estar condensados con uno o más anillos de hidrocarburo cíclico, heterocíclico, arilo, o heteroarilo.

5 "Heterociclo" o "heterocíclico" significa uno o más anillos de 5-12 átomos, preferentemente de 5-7 átomos, con o sin insaturación o carácter aromático y que tienen al menos un átomo en el anillo que no es carbono. Los heteroátomos preferentes incluyen azufre, oxígeno, y nitrógeno.

10 "Heteroarilo sustituido" es un heteroarilo que tiene uno o más grupos que no interfieren como sustituyentes.

"Heterociclo sustituido" es un heterociclo que tiene una o más cadenas laterales formadas a partir de sustituyentes que no interfieren.

15 Un "radical orgánico" como se usa en el presente documento incluirá alquilo, alquilo sustituido, arilo y arilo sustituido.

"Electrófilo" y "grupo electrofílico" se refieren a un ion o átomo o conjunto de átomos, que pueden ser iónicos, que tienen un centro electrofílico, es decir, un centro que busca electrones, capaz de reaccionar con un nucleófilo.

20 "Nucleófilo" y "grupo nucleofílico" se refieren a un ion o átomo o conjunto de átomos, que pueden ser iónicos, que tienen un centro nucleofílico, es decir, un centro que busca un centro electrofílico o capaz de reaccionar con un electrófilo.

25 Un enlace "fisiológicamente escindible" o "hidrolizable" es un enlace que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no sólo del tipo general de enlace que une los dos átomos principales sino también de los sustituyentes unidos a éstos átomos principales. Los enlaces hidrolíticamente inestables o débiles apropiados incluyen éster de carboxilato, éster de fosfato, anhídridos, acetales, cetales, aciloxialquil éter, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos.

30 Un "enlace enzimáticamente degradable" significa un enlace que es objeto de degradación mediante una o más enzimas.

35 Un enlace o unión "hidrolíticamente estable" se refiere a un enlace químico, típicamente un enlace covalente, que es básicamente estable en agua, es decir, no experimenta hidrólisis en condiciones fisiológicas en ningún grado apreciable durante un periodo prolongado de tiempo. Los ejemplos de enlaces hidrolíticamente estables incluyen los siguientes: enlaces carbono-carbono (por ejemplo, en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretano. Generalmente, un enlace hidrolíticamente estable es el que presenta una tasa de hidrólisis de menos de aproximadamente el 1-2% por día en condiciones fisiológicas. Las tasas de hidrólisis de los enlaces químicos representativos se pueden encontrar en la mayoría de los libros de texto de química estándar.

40 "Excipiente farmacéuticamente activo" se refiere a un excipiente que puede estar opcionalmente incluido en las composiciones de la presente intención y que no produce efectos toxicológicos adversos significativos en el paciente.

45 "Cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en el presente documento para significar la cantidad de un conjugado polímero-resto de Factor IX que se necesita para proporcionar un nivel deseado del conjugado (o el correspondiente resto de Factor IX no conjugado) en la corriente sanguínea o en el tejido diana. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, por ejemplo, el resto de Factor IX en particular, los componentes y las características físicas de la composición terapéutica, población de pacientes pretendida, del modo de suministro, consideraciones del paciente individual, y se pueden determinar rápidamente por un experto en la materia, en base a la información que se ha proporcionado el presente documento.

50 "Multifuncional" significa un polímero que tiene tres o más grupos funcionales contenidos en el mismo, en el que los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes. Los reactivos poliméricos multifuncionales contendrán típicamente aproximadamente 3-100 grupos funcionales, o 3-50 grupos funcionales, o 3-25 grupos funcionales, o 3-15 grupos funcionales, o de 3 a 10 grupos funcionales, o contendrán 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 grupos funcionales en la estructura polimérica.

60 El término "resto de Factor IX," como se usa en el presente documento, se refiere a un resto que tiene actividad de Factor IX. El resto de Factor IX también tendrá al menos un grupo electrofílico o grupo nucleofílico adecuado para la reacción con un reactivo polimérico. Típicamente, aunque no necesariamente, el resto de Factor IX es una proteína. Además, el término "resto de Factor IX" incluye tanto al resto de Factor IX anterior a la conjugación como al residuo del resto de Factor IX que sigue a la conjugación. Como se explicará con más detalle posteriormente, un experto en la materia puede determinar si cualquier resto dado tiene actividad de Factor IX. Una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a SEC ID N° 1 es un resto de Factor IX, así como cualquier proteína o polipéptido básicamente homólogo a esto, cuyas propiedades biológicas dan como resultado la actividad de Factor IX. Como se usa en el presente documento, el término "resto de Factor IX" incluye proteínas modificadas de forma

deliberada, como por ejemplo, a través de mutagénesis dirigida al sitio o accidentalmente a través de mutaciones. El término "resto de Factor IX" también incluye derivados que tienen de 1 a 6 sitios de glicosilación adicionales, derivados que tienen al menos un aminoácido adicional en la parte terminal carboxi de la proteína en la que el aminoácido o aminoácidos adicionales incluyen al menos un sitio de glicosilación, y derivados que tienen una secuencia de aminoácidos que incluyen al menos un sitio de glicosilación.

El término "básicamente homólogo" significa que una secuencia objeto en particular, por ejemplo, una secuencia mutante, varía a partir de una secuencia de referencia mediante una o más sustituciones, eliminaciones, o adiciones, cuyo efecto neto no da como resultado una disimilitud funcional adversa entre las secuencias de referencia y objeto. Para los propósitos de la presente invención, las secuencias que tienen más del 95 por ciento de homología, propiedades biológicas equivalentes (aunque grados potencialmente diferentes de actividad), y características de expresión equivalentes se consideran básicamente homólogas. Para los propósitos de determinación de la homología, se debería descartar el truncamiento de la secuencia madura. Las secuencias que tienen menores grados de homología, bioactividad comparable, y características de expresión equivalentes se consideran básicamente equivalentes. Los restos de Factor IX ejemplares para su uso en el presente documento incluyen aquellas proteínas que tienen una secuencia que es básicamente homóloga a SEC ID N° 1.

El término "fragmento" significa cualquier proteína o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una porción de un resto de Factor IX que mantiene algún grado de actividad de Factor IX. Los fragmentos incluyen proteínas o polipéptidos producidos a través de la degradación proteolítica de la proteína del Factor IX o producidas a través de síntesis químicas a través de métodos rutinarios en la técnica. La determinación de si un fragmento en particular tiene la actividad biológica de Factor IX se puede llevar a cabo a través de ensayos convencionales, bien conocidos, utilizados para tales fines en una o más especies de mamíferos. Se describe en el presente documento un ensayo apropiado que se puede utilizar para demostrar tal actividad biológica.

Una "variante de supresión" de un resto de Factor IX es el péptido o la proteína en los que se ha suprimido un resto de aminoácidos del resto de Factor IX y los restos de aminoácidos que preceden y que siguen al resto de aminoácidos están conectados a través de un enlace amida (excepto en los casos en los que el resto de aminoácido suprimido estaba situado en una parte terminal del péptido o de la proteína). Las variantes de supresión incluyen los casos en los que solamente un único resto de aminoácido se ha suprimido, así como en los casos en los que se suprimen dos aminoácidos, se suprimen tres aminoácidos, se suprimen cuatro aminoácidos, etcétera. Cada variante de supresión debe, sin embargo, mantener algún grado de actividad de Factor IX.

Una "variante de sustitución" de un resto de Factor IX es el péptido o la proteína en los que se ha suprimido un resto de aminoácido del resto de Factor IX y un resto de aminoácido distinto ha ocupado su lugar. Las variantes de sustitución incluyen los casos en los que solamente se ha sustituido un resto de aminoácido único, así como los casos en los que se sustituyen dos aminoácidos, se sustituyen tres aminoácidos, se sustituyen cuatro aminoácidos, etcétera. Cada variante de sustitución debe tener, sin embargo, algún grado de actividad de Factor IX.

Una "variante de adición" de un resto de Factor IX es el péptido o proteína en los que se ha añadido un resto de aminoácido al resto de Factor IX en una secuencia de aminoácidos y los restos de aminoácidos adyacentes están unidos al resto de aminoácido a través de enlaces amida (excepto los casos en los que el resto de aminoácido añadido está situado en una parte terminal del péptido o de la proteína, en el que sólo un enlace amida se une al resto de aminoácido añadido). Las variantes de adición incluyen los casos en los que sólo se ha añadido un resto de aminoácido único, así como los casos en los que se añaden dos aminoácidos, se añaden tres aminoácidos, se añaden cuatro aminoácidos, etcétera. Cada variación de adición debe tener, sin embargo, algún grado de actividad de Factor IX.

El término "paciente," se refiere a un organismo vivo que padece o que es propenso a una afección que se puede prevenir o tratar a través de la administración de un agente activo (por ejemplo, un conjugado), e incluye tanto seres humanos como animales.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia descrita posteriormente puede suceder o no suceder, de manera que la distinción incluye los casos en los que la circunstancia ocurre y los casos en los que no lo hace.

"Básicamente" (a menos que se defina específicamente para un contexto en particular en otro lugar o el contexto claramente indique lo contrario) significa casi totalmente o completamente, por ejemplo, satisfaciendo uno o más de los siguientes casos: mayor que el 50%, 51% o superior, 75% o superior, 80% o superior, 90% o superior, y 95% o superior de la condición.

A menos que el contexto indique claramente lo contrario, cuando el término "aproximadamente" precede a un valor numérico, se entiende que valor numérico significa $\pm 10\%$ del valor numérico indicado.

Los restos de aminoácidos en los péptidos se abrevian como sigue: Fenilalanina es Phe o F; Leucina es Leu o L; Isoleucina es Ile o I; Metionina es Met o M; Valina es Val o V; Serina es Ser o S; Prolina es Pro o P; Treonina es Thr o T; Alanina es Ala o A; Tirosina es Tyr o Y; Histidina es His o H; Glutamina es Gln o Q; Asparagina es Asn o N;

Lisina es Lys o K; Ácido Aspártico es Asp o D; Ácido Glutámico es Glu o E; Cisteína es Cys o C; Triptófano es Trp o W; Arginina es Arg o R; y Glicina es Gly o G.

Volviendo a una o más de las realizaciones de la presente invención, se proporciona un conjugado, conjugado que comprende un resto de Factor IX unido covalentemente a través de un enlace amida, bien directamente o bien a través de un resto espaciador que comprende uno o más átomos, a un polímero soluble en agua como se ha definido anteriormente. Los conjugados de la presente invención tendrán una o más de las siguientes características.

El Resto de Factor IX

Como se ha indicado previamente, el término "resto de Factor IX" incluirá el resto de Factor IX anterior a la conjugación así como el resto de Factor IX que sigue a la unión con un polímero soluble en agua. Se entiende, sin embargo, que cuando un resto de Factor IX está unido a un polímero soluble en agua no peptídico, el resto de Factor IX se altera ligeramente debido a la presencia de uno o más enlaces covalentes asociados con el enlace al polímero (o al resto espaciador que está unido al polímero). A menudo, esta forma ligeramente alterada del resto de Factor IX unido a otra molécula se denomina "residuo" del resto de Factor IX.

El resto de Factor IX se puede obtener a partir de métodos no recombinantes o a partir de métodos recombinantes. Además, el resto de Factor IX se puede obtener a partir de fuentes humanas o a partir de fuentes animales.

El resto de Factor IX se puede obtener de manera no recombinante. Por ejemplo, el resto de Factor IX se puede obtener a partir de fuentes derivadas de la sangre. En particular, el Factor IX se puede fraccionar a partir del plasma humano usando técnicas de precipitación y de centrifugación conocidas por los expertos habituales en la materia. Véase, por ejemplo, Wickerhauser (1976) *Transfusion* 16(4):345-350 y Slichter et al. (1976) *Transfusion* 16(6):616-626. El Factor IX también se puede aislar a partir de los granulocitos humanos. Véase Szmikowski et al. (1977) *Haematologia (Budap.)* 11(1-2):177-187.

El resto de Factor IX se puede obtener a partir de métodos recombinantes. Por ejemplo, se ha aislado, caracterizado, y clonado en vectores de expresión el ADNc que codifican para el Factor IX nativo, que es un resto de Factor IX. Véase, por ejemplo, Choo et al. (1982) "Molecular Cloning of the Gene for Human Anti-hemophilic Factor IX," *Nature*, Vol. 299: 178-180, and Kurachi et al. (1982) "Isolation and Characterization of a cDNA Coding for Human Factor IX," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 79:6461-65.

Una vez expresado, el Factor IX nativo es una glicoproteína de cadena única de aproximadamente 55000 daltons. Se puede considerar estructuralmente que tiene cuatro dominios: el dominio rico en Glu o gamma carboxiglutamato; las regiones de tipo EGF; el péptido de activación; y el sitio activo. La secuencia de aminoácidos expresada se proporciona como SEC ID N° 1. A menos que se indique de forma específica, todas las asignaciones de una ubicación numérica de un resto de aminoácido como se ha proporcionado el presente documento son en base a la SEC ID N° 1.

Los métodos recombinantes ejemplares usados para preparar un resto de Factor IX (ya sea Factor IX nativo o una proteína diferente que tiene la actividad de Factor IX) se pueden describir brevemente. Tales métodos implican la construcción del ácido nucleico que codifica el polipéptido o fragmento deseado, la clonación del ácido nucleico en un vector de expresión, la transformación en una célula huésped (por ejemplo, planta, bacterias tales como *E. coli*, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, o células de mamífero tales como células ováricas de hamster Chino o células de riñón de cría de hamster), y la expresión del ácido nucleico para producir el polipéptido o fragmento deseado. La expresión puede ocurrir a través de la expresión exógena (cuando la célula huésped contiene de forma natural la codificación genética deseada) o a través de la expresión endógena. Los métodos para la producción y la expresión de los polipéptidos recombinantes *in vitro* en células huésped procariontas y eucariotas se conocen por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de los Estados Unidos de América N° 4.868.122.

Para facilitar la identificación y la purificación de un polipéptido recombinante, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para una marca de epítipo u otra secuencia de afinidad de unión se pueden insertar o añadir en el marco con secuencia de codificación, produciendo de ese modo una proteína de fusión que comprende el polipéptido deseado y un polipéptido adecuado para la unión. Las proteínas de fusión se pueden identificar y purificar mediante un primer procesado de una mezcla que contiene la proteína de fusión a través de una columna de afinidad que soporta restos de unión (por ejemplo, anticuerpos) dirigidos contra la marca del epítipo u otra secuencia de unión en las proteínas de fusión, uniéndose de ese modo la proteína de fusión a la columna. A partir de entonces, se puede recuperar la proteína de fusión lavando la columna con la solución apropiada (por ejemplo, ácido) para el liberar la proteína de fusión unida. También se puede identificar el polipéptido recombinante y purificar lisando las células huésped, separando el polipéptido, por ejemplo, a través de cromatografía de exclusión por tamaño, y recogiendo el polipéptido. Estos y otros métodos de identificación y tipificación de los polipéptidos recombinantes se conocen por los expertos habituales en la materia. En una o más realizaciones de la presente invención, sin embargo, se prefiere que el resto de Factor IX no esté formando por una proteína de fusión.

Dependiendo del sistema usado para expresar las proteínas que tienen actividad de Factor IX, el resto de Factor IX puede estar glicosilado o no glicosilado y se pueden usar cualquiera de los dos. Es decir, el resto de Factor IX puede estar no glicosilado o el resto de Factor IX puede estar glicosilado. En una o más realizaciones de la presente invención, se prefiere que el resto de Factor IX esté glicosilado.

5 El resto que tiene actividad de Factor IX se puede modificar ventajosamente para incluir uno o más restos de aminoácidos tales como, por ejemplo, lisina, cisteína y/o arginina, para facilitar la unión de un polímero a un átomo dentro de un aminoácido. Además, el resto de Factor IX se puede modificar para incluir restos de aminoácidos de origen no natural. Las técnicas para la dirección de restos de aminoácidos y de restos de aminoácidos de origen no natural son bien conocidas por los expertos habituales en la materia. Se hace referencia a J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4ª Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992).

15 Además, el resto de Factor IX se puede modificar ventajosamente para incluir la unión de un grupo funcional (diferente que mediante la adición de un resto de aminoácido que contiene un grupo funcional). Por ejemplo, el resto de Factor IX se puede modificar para incluir un grupo tiol. Además, el resto de Factor IX se puede modificar para incluir un carbono alfa N-terminal. Además, el resto de Factor IX se puede modificar para incluir uno o más restos de hidrato de carbono. También se pueden usar los restos de Factor IX modificados para contener un amina, aldehído u otro grupo funcional.

20 Los Ejemplos de restos de Factor IX incluyen los siguientes: Factor IX; Factor IXa; versiones truncadas del Factor IX; proteínas híbridas, y peptidomiméticos que tengan actividad de Factor IX. También pueden servir como resto de Factor IX los fragmentos biológicamente activos, las variantes de supresión, las variantes de sustitución o las variantes de adición de cualquiera de los anteriores que mantengan al menos algún grado de actividad de Factor IX.

25 Para cualquier resto dado, es posible determinar si el resto tiene actividad de Factor IX. Por ejemplo, se han criado intencionadamente varias líneas de animales con la mutación genética para la hemofilia de manera que un animal criado a partir de tal línea tiene unos niveles muy bajos e insuficientes de Factor IX. Tales líneas están disponibles a partir de una diversidad de fuentes tales como, sin limitación, la División de Laboratorios e Investigación, Departamento de Salud Pública de Nueva York, Albany, NY y el Departamento de Patología, Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, NC. Ambas fuentes, por ejemplo, proporcionan perros que padecen la hemofilia B canina. Para ensayar la actividad de Factor IX de cualquier resto dado en cuestión, el resto se inyecta en el animal enfermo, se hace una pequeña incisión y se compara el tiempo de hemorragia con un control sano. Otro método útil para determinar la actividad del Factor IX es determinar el cofactor y la actividad pro-coagulante. Véase, por ejemplo, Mertens et al. (1993) *Brit. J. Haematol.* 85: 133-42. También se pueden usar otros métodos conocidos por los expertos en la materia para determinar si un resto dado tiene una actividad de Factor IX. Tales métodos son útiles para determinar la actividad de Factor IX tanto de un resto de Factor IX propuesto como del conjugado de polímero-resto de Factor IX correspondiente.

40 El Polímero Soluble en Agua

Como se discutió anteriormente, cada conjugado comprende un resto de Factor IX unido a un polímero soluble en agua. Con respecto al polímero soluble en agua, el polímero soluble en agua es no peptídico, no tóxico, de origen no natural y biocompatible. Con respecto a la biocompatibilidad, una sustancia se considera biocompatible si los efectos beneficiosos asociados con el uso de la sustancia sola o con otra sustancia (por ejemplo, un agente activo tal como un resto de Factor IX) en contacto con los tejidos vivos (por ejemplo, administración a un paciente) tienen más peso que cualquier efecto perjudicial según la evaluación de un clínico, por ejemplo, un médico. Con respecto a la no inmunogenicidad, una sustancia se considera no inmunogénica si el uso no previsto de la sustancia *in vivo* no produce una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, la formación de anticuerpos) o, si se produce una respuesta inmune, lo hace de modo que tal respuesta no se considera clínicamente significativa o importante según la evaluación de un clínico. Se prefiere particularmente que el polímero soluble en agua sea biocompatible y no inmunogénico.

55 Adicionalmente, el polímero se caracteriza típicamente porque tiene de 2 a aproximadamente 300 extremos y en particular se selecciona entre poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y de propilenglicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroalquilmetacrilamida), poli(hidroalquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxilácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolona, poli(N-acrilolmorfolina), y las combinaciones de cualquiera de los anteriores.

60 El polímero no se limita a una estructura en particular y puede ser lineal (por ejemplo, alcoxil PEG o PEG funcional), o no lineal tal como ramificado, bifurcado, de ramas múltiples (por ejemplo, PEG unido a un núcleo de polioliol), y dendrítico. Además, la estructura interna del polímero se puede organizar con cualquier número de patrones diferentes y se puede seleccionar del grupo que consiste en homopolímero, copolímero alternante, copolímero aleatorio, copolímero en bloque, tripolímero alternante, tripolímero aleatorio, y tripolímero en bloque.

65 Típicamente, el PEG activado y otros polímeros solubles en agua activados (es decir, reactivos poliméricos) se activan con un grupo activador adecuado apropiado para el acoplamiento a un sitio deseado en el resto de Factor IX.

Por lo tanto, un reactivo polimérico será un grupo reactivo para la reacción con el resto de Factor IX. Los reactivos poliméricos y los métodos representativos para la conjugación de estos polímeros con un resto activo se conocen en la técnica y se describen adicionalmente en Zaiipsky, S., et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" en Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992), y en Zaiipsky (1995) Advanced Drug Reviews 16: 157-182.

Típicamente, el peso molecular promedio en peso del polímero soluble en agua en el conjugado está en el intervalo de 6000 daltons a 90000 daltons, en el intervalo de 10000 daltons a 85000 daltons, en el intervalo de mayor que 10000 daltons a 85000 daltons, en el intervalo de 20000 daltons a 85000 daltons, en el intervalo de 53000 daltons a 85000 daltons, en el intervalo de 25000 daltons a 120000 daltons, en el intervalo de 29000 daltons a 120000 daltons, en el intervalo de 35000 daltons a 120000 daltons, y en el intervalo de 40000 daltons a 120000 daltons. Para cualquier polímero soluble en agua, se prefieren los PEG que tienen un peso molecular dentro de uno o más de estos intervalos.

Los pesos moleculares promedio en peso ejemplares para el polímero soluble en agua incluyen aproximadamente 6000 daltons, aproximadamente 7000 daltons, aproximadamente 7500 daltons, aproximadamente 8000 daltons, aproximadamente 9000 daltons, aproximadamente 10000 daltons, aproximadamente 11000 daltons, aproximadamente 12000 daltons, aproximadamente 13000 daltons, aproximadamente 14000 daltons, aproximadamente 15000 daltons, aproximadamente 20000 daltons, aproximadamente 22500 daltons, aproximadamente 25000 daltons, aproximadamente 30000 daltons, aproximadamente 35000 daltons, aproximadamente 40000 daltons, aproximadamente 45000 daltons, aproximadamente 50000 daltons, aproximadamente 55000 daltons, aproximadamente 60000 daltons, aproximadamente 65000 daltons, aproximadamente 70000 daltons, y aproximadamente 75000 daltons. También se pueden usar las versiones ramificadas del polímero soluble en agua (por ejemplo, un polímero ramificado soluble en agua de 40000 daltons compuesto de dos polímeros de 20000 daltons) que tiene un peso molecular total de cualquiera de los anteriores. En una o más realizaciones, el conjugado no tendrá ningún resto de PEG unido, directa o indirectamente, con un PEG que tenga un peso molecular promedio en peso inferior a aproximadamente 6000 daltons.

Cuando se usan como el polímero, los PEG comprenderán típicamente un determinado número de monómeros de $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)$ [o monómeros de $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$, dependiendo de cómo se defina el PEG]. Como se ha usado a lo largo de la descripción, el número de unidades de repetición se identifica a través del subíndice "n" en $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$. De este modo, el valor de (n) entra típicamente dentro de uno o más de los siguientes intervalos: de 2 a aproximadamente 3400, de aproximadamente 100 a aproximadamente 2300, de aproximadamente 100 a aproximadamente 2270, de aproximadamente 136 a aproximadamente 2050, de aproximadamente 225 a aproximadamente 1930, de aproximadamente 450 a aproximadamente 1930, de aproximadamente 1200 a aproximadamente 1930, de aproximadamente 568 a aproximadamente 2727, de aproximadamente 660 a aproximadamente 2730, de aproximadamente 795 a aproximadamente 2730, de aproximadamente 795 a aproximadamente 2730, de aproximadamente 909 a aproximadamente 2730, y de aproximadamente 1200 a aproximadamente 1900. Para cualquier polímero dado en el que se conoce el peso molecular, es posible determinar el número de unidades de repetición (es decir, "n") dividiendo el peso molecular promedio en peso del polímero entre el peso molecular del monómero que se repite.

Un polímero particularmente preferente para su uso en la presente invención es un polímero con la parte terminal protegida, es decir, un polímero que tiene al menos un extremo protegido con grupo relativamente inerte, tal como un grupo alcoxi C_{1-6} inferior, aunque también se puede usar un grupo hidroxilo. Cuando el polímero es PEG, por ejemplo, se prefiere usar un metoxi-PEG (denominado comúnmente mPEG), que es una forma lineal de PEG en el que un extremo del polímero tiene un grupo metoxi $(-\text{OCH}_3)$, mientras que el otro extremo es un grupo hidroxilo u otro grupo funcional que opcionalmente puede estar químicamente modificado.

En una forma útil de la presente invención, el PEG libre o no unido es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos hidroxilo:



en los que (n) oscila típicamente de cero a aproximadamente 4000.

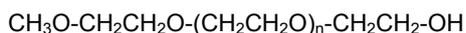
El polímero que se ha mencionado anteriormente, alfa, omega-dihidroxipoli(etilenglicol), se puede representar de una forma breve como HO-PEG-OH en el que se entiende que el símbolo -PEG- puede representar la siguiente unidad estructural:



en la que (n) es como se ha definido anteriormente.

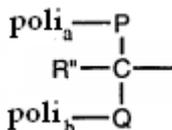
Otro tipo de PEG útil en la presente invención es metoxi-PEG-OH, o abreviado mPEG, en el que un extremo es el

grupo metoxi relativamente inerte, mientras que el otro extremo es un grupo hidroxilo. La estructura de mPEG se proporciona a continuación.



5 en la que (n) es como se ha descrito anteriormente.

10 También se pueden usar como polímero las moléculas de PEG con ramas múltiples o ramificadas, tales como las descritas en el documento de Patente de los Estados Unidos de América N° 5.932.462. Por ejemplo, PEG puede tener la estructura:



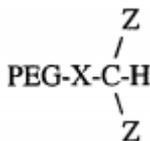
15 en la que:

poli_a y poli_b son cadenas principales de PEG (iguales o diferentes), tales como metoxi poli(etilenglicol);

R'' es un resto no reactivo, tal como H, metilo o un esqueleto de PEG; y

20 P y Q son enlaces no reactivos. En una o más realizaciones, el polímero de PEG ramificado es lisina disustituida con metoxi poli(etilenglicol). Dependiendo del resto de Factor IX específico usado, se puede modificar de forma adicional el grupo funcional éster reactivo de la lisina disustituida para formar un grupo funcional adecuado para la reacción con el grupo diana dentro del resto de Factor IX.

25 Además, el PEG puede comprender un PEG bifurcado. Un ejemplo de un PEG bifurcado se representa mediante la siguiente estructura:



30 en la que X es un resto espaciador de uno o más átomos y cada Z es un grupo terminal activado unido a CH a través de una cadena de átomos de una longitud definida. El documento de Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US99/05333, desvela diversas estructuras de PEG bifurcado que se pueden usar en una o más realizaciones de la presente invención. La cadena de átomos que une los grupos funcionales Z con el átomo de carbono de la ramificación sirven como un grupo de anclaje y puede comprender, por ejemplo, cadenas de alquilo, cadenas de éter, cadenas de éster, cadenas de amida y las combinaciones de las mismas.

35 El polímero de PEG puede comprender una molécula de PEG lateral que tiene grupos reactivos, tales como carboxilo, unidos covalentemente a lo largo de la cadena de PEG en vez de en el extremo de la cadena de PEG. Los grupos reactivos laterales se pueden unir al PEG directamente o a través de un resto espaciador, tal como un grupo alquileo.

40 Además de las formas de PEG que se han descrito anteriormente, el polímero también se puede preparar con uno o más enlaces degradables o débiles (tal como un enlace hidrolíticamente degradable) en el polímero, incluyendo cualquiera de los polímeros que se han descrito anteriormente. Por ejemplo, se puede preparar el PEG con enlaces de éster en el polímero que se somete a hidrólisis. Como se muestra a continuación, esta hidrólisis da como resultado la escisión del polímero en fragmentos de menor peso molecular:



50 Otros enlaces hidrolíticamente degradables, útiles como un enlace degradable dentro de una cadena principal de polímero, incluyen: enlaces carbonato; enlaces imina que resultan, por ejemplo, a partir de la reacción de una amina y un aldehído (véase, por ejemplo, Ouchi et al. (1997) Polymer Preprints 38(1): 582-3); enlaces éster de fosfato formados, por ejemplo, por reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que se forman típicamente por reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que se forman típicamente por reacción entre un aldehído y un alcohol; enlaces ortoéster que se forman, por ejemplo, por reacción entre un formiato y un alcohol; enlaces amida formados por un grupo amina, por ejemplo, en el extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de otra cadena de PEG; enlaces uretano formados por reacción de, por ejemplo, un PEG con un

grupo terminal isocianato y un alcohol PEG; enlaces peptídicos formados por un grupo una amina, por ejemplo, en el extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleótido formados por, por ejemplo, un grupo fosforamidito, por ejemplo, en el extremo de un polímero, y el grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

5 Tales características opcionales del polímero conjugado, es decir, la introducción de uno o más enlaces degradables en la cadena del polímero, pueden proporcionar un control adicional sobre las propiedades farmacológicas finales deseadas del conjugado después de la administración. Por ejemplo, se puede administrar un conjugado grande y relativamente inerte (por ejemplo, que tiene una o más cadenas de PEG de alto peso molecular unidas a un resto de Factor IX, por ejemplo, una o más cadenas de PEG que tienen un peso molecular mayor de aproximadamente 10000, en el que el conjugado básicamente no posee bioactividad), que se hidrolizan para generar un conjugado bioactivo que posee una porción de la cadena de PEG original. De esta manera, las propiedades del conjugado se pueden adaptar de una manera más eficaz para equilibrar la bioactividad del conjugado con el tiempo.

15 Los expertos habituales en la materia reconocerán que la discusión anterior relativa básicamente a los segmentos de polímero solubles en agua no es de ninguna manera exhaustiva y es meramente ilustrativa, y que se contemplan todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades que se han descrito anteriormente. Como se usa en el presente documento, el término "reactivo polimérico" se refiere generalmente a una molécula completa, que puede comprender un segmento de polímero soluble en agua y un grupo funcional.

20 Conjugados

Como se ha descrito anteriormente, un conjugado de la presente invención comprende un polímero soluble en agua (como se ha descrito anteriormente) unido covalentemente a través de un enlace amida directamente o a través de un resto espaciador a un resto de Factor IX. Típicamente, para cualquier conjugado dado, habrá de uno a cuatro polímeros solubles en agua unidos covalentemente a un resto de Factor IX (en el que para cada polímero soluble en agua, el polímero soluble en agua se puede unir directamente al resto de Factor IX o a través de un resto espaciador). Además, el conjugado puede incluir no más de 6 polímeros solubles en agua unidos individualmente a un resto de Factor IX, no más de 5 polímeros solubles en agua unidos individualmente a un resto de Factor IX, no más de 4 polímeros solubles en agua unidos individualmente a un resto de Factor IX, y no más de 2 polímeros solubles en agua unidos individualmente a un resto de Factor IX.

35 El enlace en particular entre el resto de Factor IX y el polímero (o el resto espaciador que está unido al polímero) depende de una diversidad de factores. Tales factores incluyen, por ejemplo, el enlace químico en particular empleado, el resto de Factor IX en particular, los grupos funcionales disponibles dentro del resto de Factor IX (para la unión a un polímero o para la conversión en un sitio de unión adecuado), y la posible presencia de grupos funcionales reactivos adicionales dentro del resto de Factor IX.

40 En una o más realizaciones de la presente invención, el enlace entre el resto de Factor IX y el polímero (o el resto espaciador que está unido al polímero) es un enlace hidrolíticamente estable, tal como una amida. En una o más realizaciones, el enlace no resulta de la reacción del reactivo polimérico que soporta un grupo funcional triazina, acetilo, hidrazina, diazonio, amino, o éster de succinimidilo con el resto de Factor IX. El enlace no es un enlace carbamato y no es un enlace carbamida, y además, no se forma ningún enlace basado en la reacción de un derivado de polímero que soporta especies de isocianato o de isotiocianato con un resto de Factor IX. Una amida se puede preparar fácilmente por reacción de un grupo carboxilo contenido dentro del resto de Factor IX (por ejemplo, el grupo terminal carboxilo de un resto peptídico que tiene una actividad de Factor IX) con un polímero terminado en amino.

50 También se describe en el presente documento un conjugado en el que el enlace entre el resto de Factor IX y el polímero (o el resto espaciador que está unido al polímero) es un enlace degradable. De este modo, el enlace del polímero soluble en agua (y cualquier resto espaciador) es "escindible." Es decir, el polímero soluble en agua (y cualquier resto espaciador) se escinde (a través de hidrólisis, procesos enzimáticos, o de otra manera), resultando de ese modo el resto de Factor IX nativo o no conjugado. Preferentemente, los enlaces de escisión dan como resultado el polímero (y cualquier resto espaciador) separado del resto de Factor IX *in vivo* sin dejar ningún fragmento de polímero soluble en agua (ni cualquier resto espaciador). Los enlaces degradables ejemplares incluyen carbonato, éster de carboxilato, éster de fosfato, tioéster, anhídridos, acetales, cetales, aciloxialquil éter, iminas, y ortoésteres. Tales enlaces se pueden preparar fácilmente a través de una modificación apropiada del resto de Factor IX (por ejemplo, el extremo C del grupo carboxilo de la proteína o un grupo hidroxilo de la cadena lateral de un aminoácido tal como serina o treonina contenido dentro de la proteína) y/o el reactivo polimérico usando los métodos de acoplamiento empleados comúnmente en la técnica. Sin embargo, son más preferentes los enlaces hidrolizables que se forman fácilmente por la reacción de un polímero activado adecuadamente con un grupo funcional o modificado contenido dentro del resto que tiene actividad de Factor IX.

65 Los conjugados (en oposición a un resto de Factor IX no conjugado) puede no poseer un grado medible de actividad de Factor IX. Es decir, un conjugado de acuerdo con la presente invención poseerá en cualquier lugar de aproximadamente un 0% a aproximadamente un 100% o más de la bioactividad del resto de Factor IX original sin

modificar. Como se ha descrito en el presente documento en la que no es necesario de acuerdo con la presente invención, los compuestos que poseen poca o ninguna actividad de Factor IX contienen típicamente un enlace hidrolizable que conecta el polímero con el resto, de manera que independientemente de la falta de actividad del conjugado, la molécula original activa (o un derivado de la misma que tiene actividad de Factor IX) se libera después de la escisión del enlace inducida en medio acuoso. Tal actividad se puede determinar usando un modelo *in vivo* o *in vitro*, dependiendo de la actividad conocida del resto empleado en particular que tiene actividad de Factor IX.

De manera óptima, la escisión de cada porción de polímero soluble en agua se facilita a través del uso de enlaces fisiológicamente escindibles y/o enzimáticamente degradables tales como enlaces que contienen uretano, amida, carbonato o éster. De esta manera, la eliminación del conjugado [a través de la escisión del polímero o polímeros solubles en agua individuales] se puede modular a través de la selección del tamaño molecular y del tipo de grupo funcional que proporcionaría las propiedades de eliminación deseadas. Los expertos habituales en la materia pueden determinar el tamaño molecular apropiado del polímero así como el grupo funcional escindible. Por ejemplo, un experto habitual en la materia, usando experimentación de rutina, puede determinar el tamaño molecular apropiado y el grupo funcional escindible preparando primero una diversidad de conjugados de polímero-Factor IX con distintos pesos de polímero y de los grupos funcionales escindibles, y después obteniendo el perfil de eliminación para cada conjugado a través de la administración del conjugado a un paciente y tomando muestras periódicas de sangre y/o orina. Una vez que se ha obtenido una serie de perfiles de eliminación para cada conjugado ensayado, se puede identificar un conjugado que tiene la eliminación deseada.

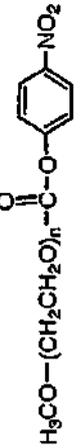
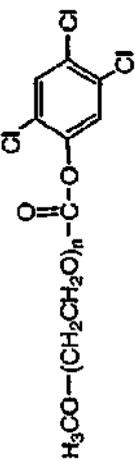
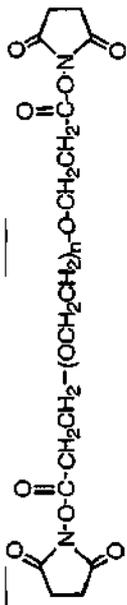
Para los conjugados que poseen un enlace hidrolíticamente estable que acopla el resto de Factor IX con el polímero, tal como un enlace amida de acuerdo con la presente invención, el conjugado poseerá típicamente un grado medible de actividad de Factor IX. Por ejemplo, tales conjugados se caracterizan típicamente porque tienen una bioactividad que satisface uno o más de los siguientes porcentajes relativos a la del resto de Factor IX no conjugado: al menos aproximadamente un 2%, al menos aproximadamente un 5%, al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 15%, al menos aproximadamente un 25%, al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 100%, y más de un 105% (cuando se mide en un modelo adecuado, tales como los presentados en el presente documento y/o los conocidos en la técnica). Preferentemente, los conjugados que tienen un enlace hidrolíticamente estable (por ejemplo, un enlace amida) poseerán al menos algún grado de la bioactividad del resto de Factor IX original no modificado.

Los conjugados ejemplares se describirán a continuación. Se espera que el resto de Factor IX comparta (al menos en parte) una secuencia de aminoácidos similar o relacionada con el Factor IX nativo. Por lo tanto, mientras que se hará referencia a las posiciones o a los átomos específicos dentro de la proteína del Factor IX nativo, tal referencia sólo es por conveniencia y un experto habitual en la materia será capaz de determinar fácilmente la posición o el átomo correspondiente en otros restos que tengan actividad de Factor IX. En particular, la descripción proporcionada en el presente documento para el Factor IX nativo a menudo es aplicable al Factor IXa, así como a los fragmentos, variantes de supresión, variantes de sustitución o variantes de adición de cualquiera de los anteriores.

Los grupos amino en los restos de Factor IX pueden proporcionar un punto de unión entre el resto de Factor IX y el polímero soluble en agua. El Factor IX nativo comprende 27 restos de lisina, cada uno con un grupo ϵ -amino que puede ser adecuado para la conjugación, así como un extremo amino. Por lo tanto, los puntos de unión ejemplares de tales restos de Factor IX incluyen la unión a un aminoácido (a través de una cadena lateral de lisina que contiene amina) con una o más de las posiciones 39, 45, 51, 68, 89, 109, 127, 137, 146, 168, 189, 234, 247, 260, 274, 293, 311, 339, 347, 362, 387, 438, 440, 446, 455, 457, y 459. Adicionalmente, la amina N-terminal de cualquier proteína que tiene actividad de Factor IX también puede servir como punto de unión.

Existen una diversidad de ejemplos de reactivos poliméricos solubles en agua adecuados útiles para la formación de enlaces covalentes con las aminas disponibles de un resto de Factor IX. Los ejemplos específicos, junto con los conjugados correspondientes, se proporcionan en la siguiente Tabla 1, que incluye los enlaces amida de acuerdo con la presente invención. En la tabla, la variable (n) representa el número de unidades monoméricas de repetición y "-NH-F9" representa el resto de Factor IX que sigue a la conjugación con el polímero soluble en agua. Mientras que cada porción polimérica [por ejemplo, $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ o $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$] presentada en la Tabla 1 termina en un grupo " CH_3 ", los mismos se pueden sustituir por otros grupos (tal como H y bencilo).

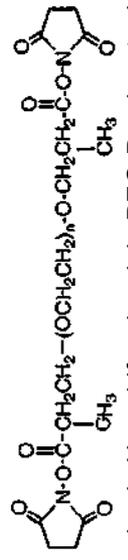
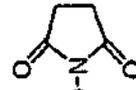
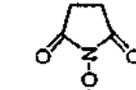
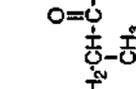
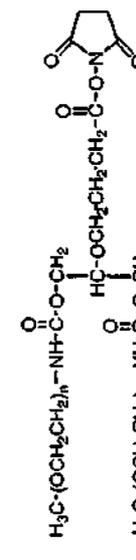
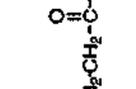
Tabla 1

Reactivos poliméricos específicos de aminas y conjugado de resto de Factor IX formado a partir de los mismos	Conjugado Correspondiente
<p>Reactivo Polimérico</p> $\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{N}$  <p>Derivado de mPEG-Oxycarbonilimidazol</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F9}$ <p>Enlace Carbamato</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$  <p>Derivado de mPEG Nitrofenilo</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F9}$ <p>Enlace Carbamato</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{Cl})_3$  <p>mPEG-Carbonato de Triclorofenilo</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F9}$ <p>Enlace Carbamato</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}$  <p>Derivado de mPEG-Succinimidilo</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{F9}$ <p>Enlace Amida</p>
 <p>Derivado Homobifuncional de PEG-Succinimidilo</p>	$\text{F9}-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{F9}$ <p>Enlaces Amida</p>

(continúa)

Reactivos poliméricos específicos de aminas y conjugado de resto de Factor IX formado a partir de los mismos	Reactivo Polimérico	Conjugado Correspondiente
Derivado Homobifuncional de PEG-Succinimidilo		<p style="text-align: center;">Enlace Amida</p>
Derivado de mPEG-Succinimidilo		<p style="text-align: center;">Enlace Amida</p>
Derivado de mPEG-Succinimidilo		<p style="text-align: center;">Enlace Amida</p>
Derivado de mPEG-Succinimidilo		<p style="text-align: center;">Enlace Amida</p>

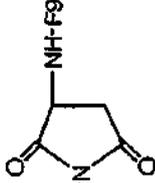
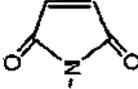
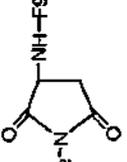
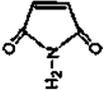
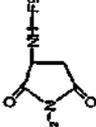
(continúa)

Reactivos poliméricos específicos de aminas y conjugado de resto de Factor IX formado a partir de los mismos	Conjugado Correspondiente
Reactivo Polimérico	
<p>$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  Derivado de mPEG-Succinimidilo</p>	<p>$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F9}$ Enlace amida</p>
<p> Derivado Homobifuncional de PEG-Propionato de Succinimidilo</p>	<p>$\text{F9}-\text{NH}-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F9}$ Enlaces amida</p>
<p>$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  Derivado de mPEG-Succinimidilo</p>	<p>$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F9}$ Enlace amida</p>
<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2$  $\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2$ Derivado de mPEG2-N-Hidroxisuccinimida ramificado</p>	<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2$  $\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2$ Enlace amida</p>
<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2$  Derivado de mPEG2-N-Hidroxisuccinimida ramificado</p>	<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2$  $\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2$ Enlace amida</p>

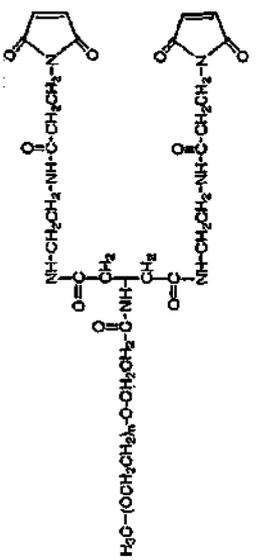
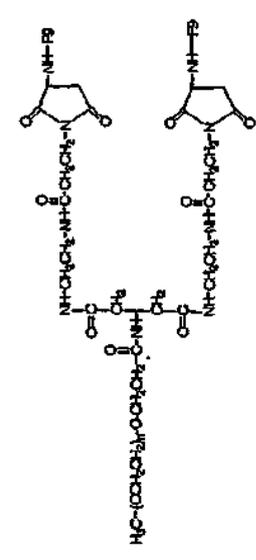
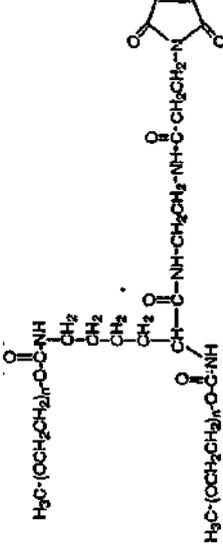
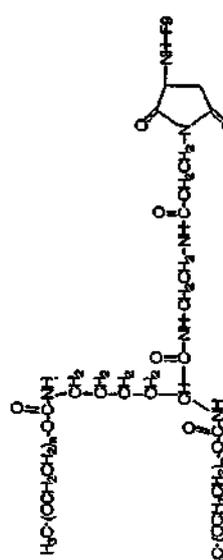
(continúa)

Reactivos poliméricos específicos de aminas y conjugado de resto de Factor IX formado a partir de los mismos	Conjugado Correspondiente
<p>Reactivo Polimérico</p> $\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{S}-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$ <p>Derivado de mPEG-Tioéster</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F}_9$ <p>Enlace amida (típicamente al resto de Factor IX que tiene una cisteína o histidina N-terminal)</p>
$\text{HC}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}=\text{O}$ <p>Derivado Homobifuncional de PEG Propionaldehído</p>	$\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{F}_9$ <p>Enlaces amina secundaria</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}=\text{O}$ <p>Derivado de mPEG Propionaldehído</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{F}_9$ <p>Enlace amina secundaria</p>
$\text{HCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}=\text{O}$ <p>Derivado Homobifuncional de PEG Butiraldehído</p>	$\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{F}_9$ <p>Enlaces amina secundaria</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}=\text{O}$ <p>Derivado de mPEG Butiraldehído</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{F}_9$ <p>Enlace amina secundaria</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}=\text{O}$ <p>Derivado de mPEG Butiraldehído</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{F}_9$ <p>Enlace amina secundaria</p>

(continúa)

Reactivos poliméricos específicos de aminas y conjugado de resto de Factor IX formado a partir de los mismos	Conjugado Correspondiente
<p>Reactivo Polimérico</p> $\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{2,5}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_3$ <p>Derivado de mPEG Metilcetona</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{2,5}-\overset{\text{NH-F9}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_3$ <p>Enlace amina secundaria (a un carbono secundario)</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ <p>mPEG tresilato</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{F9}$ <p>Enlace amina secundaria</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Derivado de mPEG Maleimida (en determinadas condiciones de reacción tales como pH > 8)</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Enlace amina secundaria</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Derivado de mPEG Maleimida (en determinadas condiciones de reacción tales como pH > 8)</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Enlace amina secundaria</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Derivado de mPEG Maleimida (en determinadas condiciones de reacción tales como pH > 8)</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Enlace amina secundaria</p>

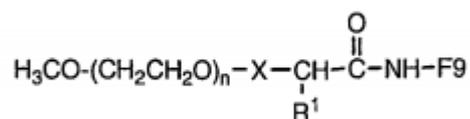
(continúa)

Reactivos poliméricos específicos de aminas y conjugado de resto de Factor IX formado a partir de los mismos	Reactivo Polimérico	Conjugado Correspondiente
<p>Derivado de mPEG Maleimida Bifurcado (en determinadas condiciones de reacción tales como pH > 8)</p> 	 <p>Enlaces amina secundaria</p>	
<p>Derivado de mPEG Maleimida Ramificado (en determinadas condiciones de reacción tales como pH > 8)</p> 	 <p>Enlace amina secundaria</p>	

Posteriormente se describen de forma adicional en el presente documento los métodos para la preparación de los conjugados y los conjugados así producidos de factor IX con un polímero soluble en agua del tipo especialmente definido en el presente documento. Algunos de estos métodos son adecuados para la preparación de un conjugado de acuerdo con la invención reivindicada con un enlace amida.

5 La conjugación de un reactivo polimérico con un grupo amina de un resto de Factor IX se puede conseguir a través de una diversidad de técnicas. En un enfoque, un resto de Factor IX se puede conjugar con un reactivo polimérico funcionalizado con un derivado de succinimidilo (u otro grupo éster activado, en el que se pueden usar enfoques similares a los que se han descrito para un derivado de succinimidilo para otros reactivos poliméricos que contienen el grupo éster activado). En este enfoque, el resto polimérico que soporta un grupo succinimidilo se puede unir al resto de Factor IX en medios acuosos a un pH de 7,0 a 9,0, aunque en condiciones de reacción diferentes (por ejemplo, un pH inferior tal como de 6 a 7, o diferentes temperaturas y/o inferiores a 15 °C) pueden dar como resultado la unión de un polímero a una posición diferente en el resto de Factor IX. Además, se puede formar un enlace amida a través de la reacción de un polímero soluble en agua, no peptídico terminado en amina con un resto de Factor IX que soporta un aldehído o un grupo ácido carboxílico activado.

Un conjugado ejemplar comprende la siguiente estructura

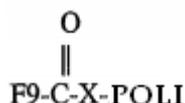


en la que:

- (n) es un número entero que tiene un valor de desde 2 a 3400;
- X es un resto espaciador, preferentemente uno de metileno ("-CH₂-"), etileno ("-CH₂CH₂-") y propileno ("-CH₂CH₂CH₂-");
- R¹ es un radical orgánico, preferentemente H o metilo ("-CH₃"); y
- F9 es un resto de Factor IX.

Es típico de otro enfoque útil para la conjugación del resto de Factor IX con un reactivo polimérico el uso de una reacción de aminoración reductora para conjugar una amina primaria de un resto de Factor IX con un polímero funcionalizado con una forma cetona, aldehído o un hidrato del mismo (por ejemplo, hidrato de cetona e hidrato de aldehído). En este enfoque, la amina primaria a partir del resto de Factor IX reacciona con el grupo carbonilo del aldehído o cetona (o con el correspondiente grupo que contiene hidroxilo de un aldehído o cetona hidratados), formando ese modo una base de Schiff. La base de Schiff, a su vez, se puede convertir por reducción en un conjugado estable a través del uso de un agente reductor tal como borohidruro sódico. Las reacciones selectivas (por ejemplo, en el extremo N) son posibles, particularmente con un polímero funcionalizado con una cetona o con un aldehído ramificado con un metilo en alfa y/o en las condiciones específicas de reacción (por ejemplo, pH reducido).

Los grupos carboxilo representan otro grupo funcional que puede servir como un punto de unión en el resto de Factor IX. Estructuralmente, el conjugado comprenderá lo siguiente:



en el que F9 y el grupo carbonilo adyacente corresponde al resto de Factor IX que contiene carboxilo, X es un resto espaciador, preferentemente un heteroátomo seleccionado entre O, N(H), y S, y POLI es un polímero soluble en agua tal como PEG, opcionalmente terminado en un resto de protección terminal.

El enlace C(O)-X resulta de la reacción entre un derivado polimérico que soporta un grupo funcional terminal y un resto de Factor IX que contiene carboxilo. Como se ha analizado anteriormente, el enlace específico dependerá del tipo de grupo funcional utilizado. Si el polímero está funcionalizado en el extremo o "activado" con un grupo hidroxilo, el enlace resultante será un éster de ácido carboxílico y X será O. Si la cadena principal del polímero está funcionalizada con un grupo tiol, el enlace resultante será un tioéster y X será S. Cuando se emplean determinados polímeros con brazos múltiples, ramificados o bifurcados, el resto C(O)X, y en particular el resto X, puede ser relativamente más complejo y puede incluir una estructura de enlace más larga.

Los reactivos poliméricos que contienen un resto de hidrazida también son útiles para la conjugación con un

carbonilo. En la medida en la que el resto de Factor IX no contenga un resto carbonilo, se puede introducir un resto carbonilo mediante la reducción de cualquiera de los ácidos carboxílicos (por ejemplo, el ácido carboxílico C-terminal) y/o proporcionando las versiones glicosiladas o glicadas (en las que los azúcares añadidos tienen un resto carbonilo) del resto de Factor IX. Los ejemplos específicos de reactivos poliméricos que comprenden un resto de hidrazida, junto con los conjugados correspondientes, se proporcionan en la Tabla 2, a continuación. Además, cualquier reactivo polimérico que comprende un éster activado (por ejemplo, un grupo succinimidilo) se puede convertir para contener un resto de hidrazida mediante la reacción del reactivo polimérico que comprende el éster activado con hidrazina (NH₂-NH₂) o carbazato de terc-butilo [NH₂NHCO₂C(CH₃)₃]. En la tabla, la variable (n) representa el número de unidades monoméricas de repetición y "=C-F9" representa el resto de Factor IX que sigue a la conjugación con el reactivo polimérico. Opcionalmente, el enlace hidrazona se puede reducir usando un agente reductor adecuado. Aunque cada porción polimérica [por ejemplo, (OCH₂CH₂)_n o (CH₂CH₂O)_n] presentada en la Tabla 1 termina en un grupo "CH₃", otros grupos (tal como H y bencilo) se pueden sustituir por el mismo.

Tabla 2

Reactivos poliméricos específicos de carboxilo y conjugado de resto de Factor IX formado a partir de los mismos

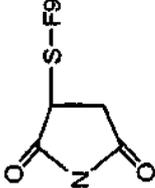
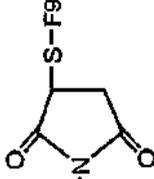
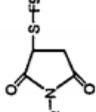
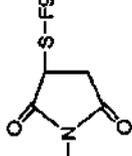
Reactivo Polimérico	Conjugado Correspondiente
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ Derivado de mPEG-Hidrazina	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-\text{F}_9$ Enlace Hidrazona
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ Derivado de mPEG-Hidrazina	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-\text{F}_9$ Enlace Hidrazona
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ Derivado de mPEG-Hidrazina	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-\text{F}_9$ Enlace Hidrazona
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ Derivado de mPEG-Hidrazina	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-\text{F}_9$ Enlace Hidrazona
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ Derivado de mPEG-Hidrazina	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-\text{F}_9$ Enlace Hidrazona
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ Derivado de mPEG-Hidrazina	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-\text{F}_9$ Enlace Hidrazona
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ Derivado de mPEG-Hidrazina	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-\text{F}_9$ Enlace Hidrazona
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ Derivado de mPEG-Hidrazina	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-\text{F}_9$ Enlace Hidrazona

Los grupos tiol contenidos dentro del resto de Factor IX pueden servir como sitios efectivos de unión para el polímero soluble en agua. En particular, los restos de cisteína proporcionan grupos tiol cuando el resto de Factor IX es una proteína. Los grupos tiol en tales restos de cisteína pueden reaccionar con un PEG activado que es

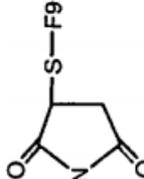
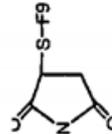
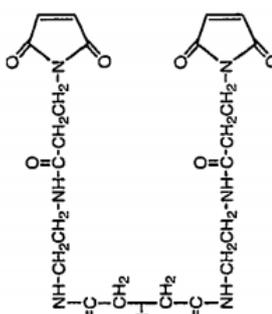
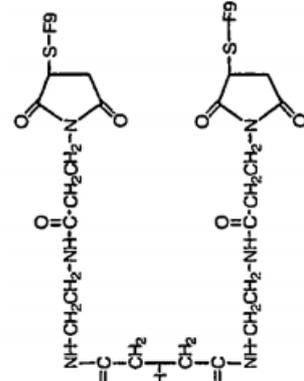
Específico para la reacción con grupos tiol, por ejemplo, un polímero de N-maleimidilo u otro derivado, como se ha descrito en la Patente de los Estados Unidos de América N° 5.739.208 y en la Publicación de Patente Internacional N° WO 01/62827.

- 5 Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se cree que todos los restos de cisteína dentro del Factor IX participan en el enlace disulfuro. Como consecuencia, la conjugación con un resto de cisteína que participa en el enlace disulfuro puede alterar la estructura terciaria del Factor IX y potencialmente reducir de manera significativa su actividad global. Por lo tanto, suponiendo que cualquier resto de Factor IX en particular carezca de un grupo tiol o se deba evitar la alteración de los enlaces disulfuro, es posible añadir un resto de cisteína al resto de Factor IX usando técnicas sintéticas convencionales. Véase, por ejemplo, el procedimiento descrito en la Publicación de Patente internacional N° WO 90/12874 para la adición de restos de cisteína, en la que se puede adaptar tal procedimiento para un resto de Factor IX. Además, también se pueden usar los procesos convencionales de ingeniería genética para introducir un resto de cisteína en el resto de Factor IX.
- 10
- 15 Los ejemplos específicos, junto con los conjugados correspondientes, se proporcionan en la Tabla 3, a continuación. En la tabla, la variable (n) representa el número de unidades monoméricas de repetición y "-S-F9" representa el resto de Factor IX que sigue a la conjugación con el polímero soluble en agua. Aunque cada porción polimérica [por ejemplo, $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ o $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$] presentada en la Tabla 3 termina en un grupo " CH_3 ", otros grupos (tal como H y bencilo) se pueden sustituir por el mismo.

Tabla 3

Reactivos poliméricos específicos de tioles y conjugado de resto de Factor IX formado a partir de los mismos	
Reactivo Polimérico	Conjugado Correspondiente
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Derivado de mPEG Maleimida</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Enlace Tioéter</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Derivado de mPEG Maleimida</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Enlace Tioéter</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Derivado de mPEG Maleimida</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Enlace Tioéter</p>
$\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Derivado Homobifuncional de mPEG Maleimida</p>	$\text{F}_9-\text{S}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>Enlaces Tioéter</p>

(continúa)

Reactivos poliméricos específicos de tioles y conjugado de resto de Factor IX formado a partir de los mismos	
Reactivo Polimérico	Conjugado Correspondiente
<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$</p> <p>Derivado de mPEG Maleimida</p> 	<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}-\text{S}-\text{F}_9$</p> <p>Enlace Tioéter</p> 
<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$</p> <p>Derivado de mPEG Maleimida</p> 	<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}-\text{S}-\text{F}_9$</p> <p>Enlace Tioéter</p> 
<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$</p> <p>Derivado de mPEG Maleimida Bifurcado</p> 	<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}-\text{S}-\text{F}_9$</p> <p>Enlace Tioéter</p> 

(continúa)

Reactivos poliméricos específicos de tioles y conjugado de resto de Factor IX formado a partir de los mismos	
Reactivo Polimérico	Conjugado Correspondiente
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}-\text{NH} \\ \parallel \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \\ \parallel \quad \quad \quad \parallel \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}-\text{NH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ Derivado de mPEG2 Maleimida Ramificado	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}-\text{NH} \\ \parallel \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \\ \parallel \quad \quad \quad \parallel \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$ $\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}-\text{NH} \\ \parallel \\ \text{O}$ Enlace Tioéter
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \\ \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \\ \parallel \quad \quad \quad \parallel \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$ $\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \parallel \\ \text{O}$ Derivado de mPEG2 Maleimida Ramificado	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \\ \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \\ \parallel \quad \quad \quad \parallel \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$ $\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \parallel \\ \text{O}$ Enlace Tioéter

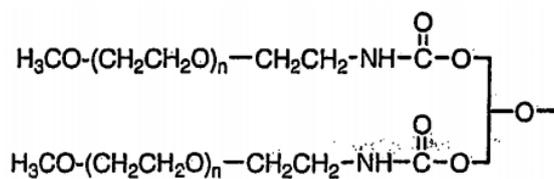
(continúa)

Reactivos poliméricos específicos de tioles y conjugado de resto de Factor IX formado a partir de los mismos	
Reactivo Polimérico	Conjugado Correspondiente
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{CH}=\text{CH}_2$ <p>Derivado de mPEG Vinil Sulfona</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{F}_9$ <p>Enlace Tioéter</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$ <p>Derivado de mPEG Tíol</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{F}_9$ <p>Enlace Disulfuro</p>
$\text{HS}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SH}$ <p>Derivado Homobifuncional de mPEG Tíol</p>	$\text{F}_9-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{F}_9$ <p>Enlaces Disulfuro</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{N}$  <p>Derivado de mPEG Disulfuro</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{F}_9$ <p>Enlace Disulfuro</p>

5 CH₂-O-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-O-CH₂-, -CH₂-C(O)-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-O-CH₂-, -C(O)-O-CH₂-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -NH-CH₂-, -NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-, -C(O)-CH₂-, -C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-[CH₂]_h-(OCH₂CH₂)_j, un grupo cicloalquilo bivalente, -O-, -S-, un aminoácido, -N(R⁶)-, y las combinaciones de dos o más de cualquiera de los anteriores, en los que R⁶ es H o un radical orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido, (h) es de cero a seis, y (j) es de cero a 20. Otros restos espaciadores específicos tienen las siguientes estructuras: -C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-, -NH-C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-, y -O-C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-, en los que los valores de los subíndices que siguen a cada metileno indican el número de metilenos contenidos en la estructura, por ejemplo, (CH₂)₁₋₆ significa que la estructura puede contener 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 metilenos. Además, cualquiera de los restos espaciadores anteriores puede incluir de forma adicional una cadena de oligómero de óxido de etileno que comprende de 1 a 20 unidades monoméricas de óxido de etileno [es decir, -(CH₂CH₂O)₁₋₂₀]. Es decir, la cadena de oligómero de óxido de etileno puede aparecer antes o después del resto espaciador, y opcionalmente entre dos átomos cualesquiera del resto espaciador que consta de dos o más átomos. Además, la cadena de oligómero no se consideraría como parte del resto espaciador si el oligómero es adyacente al segmento polimérico y representa meramente una extensión del segmento polimérico. El resto espaciador no incluye azúcares o hidratos de carbono y es preferente que el conjugado carezca básicamente de cualquier polímero soluble en agua unido directamente, o a través de un resto espaciador, a un azúcar o hidrato de carbono que, a su vez, esté unido a un resto de Factor IX.

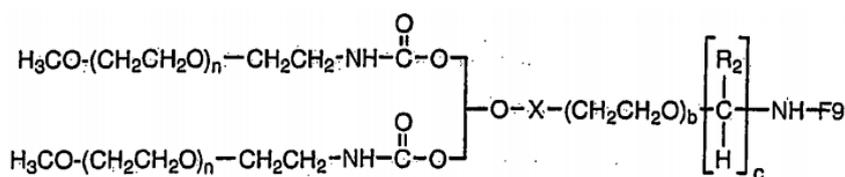
En algunos ejemplos, el conjugado de acuerdo con la presente invención puede tener solamente un polímero soluble en agua sencillo asociado a un resto de Factor IX sencillo. En consecuencia, puede ser deseable que el polímero soluble en agua sea un polímero no lineal soluble en agua (y preparar el conjugado utilizando un reactivo polimérico no lineal). Un polímero no lineal soluble en agua preferente es un polímero soluble en agua ramificado, aunque se incluyen los polímeros solubles en agua multi-ramificados. Mediante la incorporación de un polímero soluble en agua ramificado, es posible, por ejemplo, duplicar el peso molecular eficaz para cada sitio de unión en comparación con los polímeros sencillos.

Los conjugados ejemplares de la presente invención son en los que el polímero soluble en agua está en forma ramificada, incluyen las formas ramificadas que comprenden un polímero ramificado basado en lisina y un enfoque ramificado que comprende la estructura:



40 en la que cada (n) es independientemente un número entero que tiene un valor de 2 a 3400.

Los conjugados ejemplares de la presente invención comprenden la siguiente estructura:



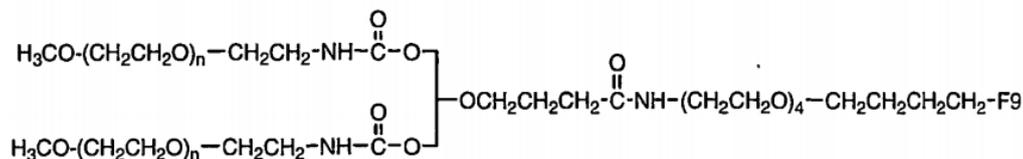
45 en la que:

50 cada (n) es independientemente un número entero que tiene un valor de 2 a 3400;
X es un resto espaciador;

(b) es un número entero que tiene un valor de 2 a 6;
(c) es un número entero que tiene un valor de 2 a 6;

R², en cada aparición, es independientemente H o alquilo inferior; y F9 es un resto de Factor IX.

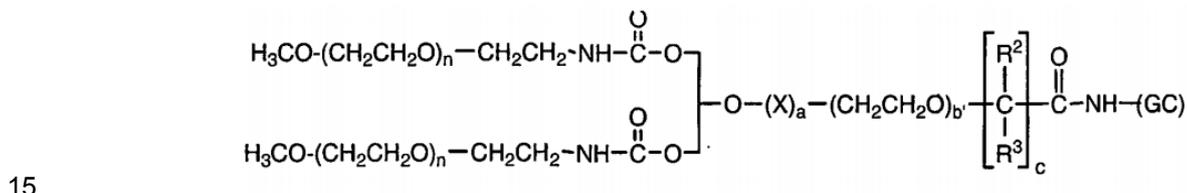
5 Un conjugado ejemplar de la presente invención comprende la siguiente estructura:



en la que:

10 cada (n) es independientemente un número entero que tiene un valor de 2 a 3400; y F9 es un resto de Factor IX.

Otro conjugado ejemplar de la presente invención comprende la siguiente estructura:



15

en la que:

20 cada (n) es independientemente un número entero que tiene un valor de 2 a 3400;

(a) es cero o uno;

X, cuando está presente, es un resto espaciador que comprende uno o más átomos;

25

(b') es cero o un número entero que tiene un valor de uno a diez;

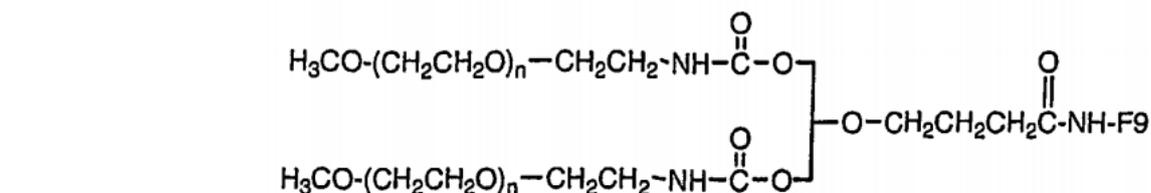
(c) es un número entero que tiene un valor de uno a diez;

30 R², en cada aparición, es independientemente H o un radical orgánico;

R³, en cada aparición, es independientemente H o un radical orgánico; y

F9 es un resto de Factor IX.

Un conjugado ejemplar de la presente invención comprende la siguiente estructura:



35

en la que:

40 cada (n) es independientemente un número entero que tiene un valor de 2 a 3400; y F9 es un resto de Factor IX.

Composiciones

45 Típicamente, los conjugados forman parte de composiciones. Generalmente, la composición comprende un pluralidad de conjugados, teniendo cada uno de ellos uno, dos, tres o cuatro polímeros solubles en agua como se

han definido anteriormente unidos covalentemente de forma separada (bien directamente o bien a través de un resto espaciador) a un resto del Factor IX. Además, la presente invención incluye ejemplos en los que la composición comprende una pluralidad de conjugados, comprendiendo cada conjugado un polímero soluble en agua como se ha definido anteriormente unido covalentemente a un resto de Factor IX; así como composiciones comprenden dos, tres o cuatro polímeros solubles en agua unidos covalentemente a un resto del Factor IX.

En una o más realizaciones de la presente invención se proporciona una composición, comprendiendo la composición una pluralidad de conjugados, en la que al menos aproximadamente un 80% de todos los conjugados en la composición comprenden cada uno un resto del Factor IX unido covalentemente a uno, dos, tres o cuatro polímeros solubles en agua como se han definido anteriormente y en la que de forma adicional para cada polímero soluble en agua en el conjugado, el resto de Factor IX está unido al polímero soluble en agua a través de un enlace amida, bien directamente o bien a través de un resto espaciador que comprende uno o más átomos.

Con respecto a los conjugados en la composición, la composición satisfará típicamente una o más de las siguientes características: al menos aproximadamente un 85% de los conjugados en la composición tendrá de uno a tres polímeros unidos al resto de Factor IX; al menos aproximadamente un 85% de los conjugados en la composición tendrá de uno a tres polímeros unidos al resto de Factor IX; al menos aproximadamente un 85% de los conjugados en la composición tendrá de uno a dos polímeros unidos al resto de Factor IX; al menos aproximadamente un 85% de los conjugados en la composición tendrá un polímero unido a resto del Factor IX (es decir, será monoPEGilado); al menos aproximadamente un 95% de los conjugados en la composición tendrá de uno a cinco polímeros unidos al resto de Factor IX; al menos aproximadamente un 95% de los conjugados en la composición tendrá de uno a cuatro polímeros unidos al resto de Factor IX; al menos aproximadamente un 95% de los conjugados en la composición tendrá de uno a tres polímeros unidos al resto de Factor IX; al menos aproximadamente un 95% de los conjugados en la composición tendrá de uno a dos polímeros unidos al resto de Factor IX; al menos un 95% de los conjugados en la composición tendrá un polímero unido al resto de Factor IX (es decir, será monoPEGilado); al menos aproximadamente un 99% de los conjugados en la composición tendrá de uno a cuatro polímeros unidos al resto de Factor IX; al menos aproximadamente un 99% de los conjugados en la composición tendrá de uno a tres polímeros unidos al resto de Factor IX; al menos aproximadamente un 99% de los conjugados en la composición tendrá de uno a dos polímeros unidos al resto de Factor IX; y al menos aproximadamente un 99% de los conjugados en la composición tendrá un polímero unido al resto de Factor IX (es decir, será monoPEGilado).

En una o más realizaciones, es preferente que la composición que contiene el conjugado esté libre o básicamente libre de albúmina. Es también preferente que la composición esté libre o básicamente libre de proteínas que no tengan actividad de Factor IX. De esta manera, es preferente que la composición esté libre en un 85%, más preferentemente en un 95%, y lo más preferentemente en un 99%, de albúmina. Además, es preferente que la composición esté libre en un 85%, más preferentemente en un 95%, y lo más preferentemente en un 99%, de cualquier proteína que no tenga actividad de Factor IX. Suponiendo que la albúmina está presente en la composición, las composiciones ejemplares de la presente invención están básicamente libres de conjugados que comprenden un polímero de polietilenglicol que une un residuo de un resto de Factor IX a la albúmina.

El control del número deseado de polímeros para cualquier resto determinado se puede conseguir mediante la selección del reactivo polimérico apropiado, la proporción de reactivo polimérico con respecto al resto de Factor IX, la temperatura, las condiciones de pH, y otros aspectos de la reacción de conjugación. Además, la reducción o eliminación de los conjugados no deseados (por ejemplo, los conjugados que tienen cuatro o más polímeros unidos) se puede conseguir por medio de purificación.

Por ejemplo, los conjugados polímero-resto de Factor IX se pueden purificar para obtener/aislar diferentes especies conjugadas. De forma específica, la mezcla de productos se puede purificar para obtener un promedio cualquiera entre uno, dos, tres, cuatro, cinco o más PEGs por resto de Factor IX, típicamente uno, dos o tres PEGs por resto de Factor IX. La estrategia para la purificación de la mezcla de reacción de conjugado final dependerá de una diversidad de factores, incluyendo, por ejemplo, el peso molecular del reactivo polimérico empleado, el resto de Factor IX en particular, el régimen de dosificación deseado, y la actividad residual y las propiedades *in vivo* del conjugado o conjugados individuales.

Si se desea, los conjugados que tienen diferentes pesos moleculares se pueden aislar utilizando cromatografía por filtración en gel y/o cromatografía de intercambio iónico. Es decir, la cromatografía por filtración en gel se usa para fraccionar diferentes valores del promedio de polímero con respecto al resto de Factor IX (por ejemplo, 1-mero, 2-mero, 3-mero, y demás, en los que "1-mero" indica 1 polímero unido a un resto de Factor IX, "2-mero" 2 polímeros unidos a un resto de Factor IX, y así sucesivamente) basándose en sus diferentes pesos moleculares (cuando la diferencia corresponde esencialmente al peso molecular promedio de la parte de polímero soluble en agua). Por ejemplo, en una reacción ejemplar en la que se conjuga al eatoriamente una proteína de 55 000 daltons con un reactivo polimérico que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 000 daltons, la mezcla de reacción resultante puede contener la proteína no modificada (que tiene un peso molecular de aproximadamente 55 000 daltons), la proteína monoPEGilada (o "1-mero") (que tiene un peso molecular de aproximadamente 75000 daltons), la proteína diPEGilada (o "2-mero") (que tiene un peso molecular de aproximadamente 95000 daltons), y demás.

- 5 Mientras este enfoque se puede utilizar para separar conjugados de restos de Factor IX con PEG y con otros polímeros que tengan diferentes pesos moleculares, esta aproximación no es generalmente eficaz para separar isómeros posicionales que presentan diferentes sitios de unión del polímero en el resto de Factor IX. Por ejemplo, la cromatografía por filtración en gel se pueden usar para separar unas de otras las mezclas de 1-meros, 2-meros, 3-meros, y demás, aunque cada una de las composiciones de PEG-mero recuperadas puede contener PEGs unidos a diferentes grupos amino reactivos (por ejemplo, restos de lisina) en el resto de Factor IX.
- 10 Las columnas para filtración en gel adecuadas para llevar a cabo este tipo de separación incluyen columnas Superdex™ y Sephadex™ disponibles en Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). La selección de una columna en particular dependerá del rango de fraccionamiento deseado. Generalmente, la elución se lleva a cabo utilizando un tampón adecuado, tal como fosfato o acetato. Las fracciones recogidas se pueden analizar mediante una diversidad de métodos diferentes, por ejemplo, (i) absorbancia a 280 nm para el contenido de proteínas, (ii) análisis de proteínas basado en una tinción usando albúmina en suero bovino como estándar, (iii) ensayo de yodo para el contenido de PEG (Sims et al. (1980) Anal. Biochem, 107:60-63), (iv) electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS PAGE), se guido de tinción con cloruro de bario, y cromatografía líquida de alto rendimiento.
- 15 La separación de los isómeros posicionales se puede llevar a cabo mediante cromatografía de fase inversa utilizando métodos de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) usando por ejemplo una columna C18 o una columna C3 (Amersham Biosciences o Vydac) o mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna de intercambio iónico, por ejemplo, una columna de intercambio iónico Sepharose™ disponible en Amersham Biosciences. Cualquiera de los dos enfoques se puede utilizar para separar isómeros polímero-agente activo tienen el mismo peso molecular (isómeros posicionales).
- 20 Preferentemente, las composiciones están básicamente libres de proteínas que no tienen actividad de Factor IX. Además, preferentemente las composiciones están básicamente libres de todos los demás polímeros solubles en agua unidos de forma no covalente. En algunas circunstancias, sin embargo, la composición puede contener una mezcla de conjugados polímero-resto de Factor IX y Factor IX no conjugado.
- 25 Opcionalmente, la composición de la presente invención comprende de forma adicional un excipiente farmacéuticamente aceptable. Si se desea, el excipiente farmacéuticamente aceptable se puede añadir a un conjugado para formar una composición.
- 30 Los ejemplos de excipientes incluyen los seleccionados entre el grupo que consiste en hidratos de carbono, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases, y las combinaciones de los mismos.
- 35 Un hidrato de carbono tal como un azúcar, un azúcar derivatizado tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado y/o un polímero de azúcar puede estar presente como excipiente. Los excipientes de hidratos de carbono específicos incluyen, por ejemplo: monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, y sorbosa; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, y cellobiosa; polisacáridos, tales como rafinosa, melicitosa, maltodextrinas, dextrans, almidones, y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosil sorbitol, y mioinositol.
- 40 El excipiente también pueden incluir una sal inorgánica o tampón tal como ácido cítrico, cloruro sódico, cloruro potásico, sulfato sódico, nitrato potásico, fosfato sódico monobásico, fosfato sódico dibásico, y las combinaciones de los mismos.
- 45 La composición también pueden incluir un agente antimicrobiano para la prevención o disuasión del crecimiento microbiano. Los ejemplos de agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercurio, timersol, y las combinaciones de los mismos.
- 50 También puede estar presente en la composición un antioxidante. Los antioxidantes se usan para prevenir la oxidación, previniendo de esta manera el deterioro del conjugado u otros componentes de la preparación. Los antioxidantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, pantoic ácido, ácido ascórbico, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito sódico, formaldehído sódico sulfoxilado, metabisulfito sódico, y las combinaciones de los mismos.
- 55 Un tensioactivo puede estar presente como excipiente. Los ejemplos de tensioactivos incluyen: polisorbatos, tales como "Tween20" y "Tween 80," y plurónicos tales como F68 y F88 (ambos disponibles en BASF, Mount Olive, New Jersey); ésteres de sorbitol; lípidos, tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferentemente no en forma liposomal), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, tales como colesterol; y agentes quelantes, tales como EDTA, cinc y otros cationes adecuados.
- 60 Los ácidos o las bases pueden estar presentes en la composición como excipientes. Los ejemplos de ácidos que se
- 65

pueden utilizar incluyen los ácidos seleccionados entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, y las combinaciones de los mismos. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen las bases seleccionadas entre el grupo que consiste en hidróxido sódico, acetato sódico, hidróxido amónico, hidróxido potásico, acetato amónico, acetato potásico, fosfato sódico, fosfato potásico, citrato sódico, formiato sódico, sulfato sódico, sulfato potásico, fumarato potásico, y las combinaciones de los mismos.

La cantidad de conjugado (es decir, el conjugado formado entre el agente activo y el reactivo polimérico) en la composición podrá variar dependiendo de una diversidad de factores, pero será óptimamente una cantidad terapéuticamente eficaz cuando la composición se almacena en un envase de dosificación unitario (por ejemplo, un vial). Además, la preparación farmacéutica se puede alojar en un a jeringa. Se puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz experimentalmente mediante la administración repetida de cantidades en aumento del conjugado para determinar qué cantidad produce el criterio de valoración clínico deseado.

La cantidad de excipiente individual en la composición podrá variar dependiendo de la actividad del excipiente y de las necesidades particulares de la composición. Típicamente, la cantidad óptima de excipiente individual se determina a través de una experimentación de rutina, es decir, mediante la preparación de composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que varían de valores bajos a elevados), examinando la estabilidad y otros parámetros, y a continuación determinando el intervalo en el que se obtiene un rendimiento óptimo sin efectos adversos importantes.

Sin embargo, generalmente, el excipiente estará presente en la composición en una cantidad de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 99% en peso, preferentemente de aproximadamente un 5% a aproximadamente un 98% en peso, más preferentemente de aproximadamente un 15% a aproximadamente un 95% en peso del excipiente, siendo las concentraciones más preferentes las menores del 30% en peso.

Estos excipientes farmacéuticos anteriores junto con otros excipientes se describen en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams, (1995), "Physician's Desk Reference", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, N J (1998), y Kibbe, A.M., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª Edición, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

Las composiciones incluyen todos los tipos de formulaciones y en particular los que son adecuados para inyección, por ejemplo, polvos o liofilizados que se pueden reconstituir como líquidos. Los ejemplos de diluyentes adecuados para la reconstitución de las composiciones sólidas antes de la inyección incluyen agua bacteriostática para inyección, de xtrosa al 5% en agua, tampón fosfato salino, solución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada, y las combinaciones de los mismos. Con respecto a las composiciones farmacéuticas líquidas, se prevén las soluciones y suspensiones.

Las composiciones de la presente invención se administran típicamente, aunque no necesariamente, mediante inyección y por lo tanto son generalmente soluciones o suspensiones líquidas inmediatamente antes de su administración. La preparación farmacéutica también puede tomar otras formas tales como j arabes, cremas, pomadas, comprimidos, y polvos. También se incluyen otros modos de administración, tales como pulmonar, rectal, transdérmico, transmucosal, oral, intratecal, subcutáneo, intraarterial, y demás.

También se describe en el presente documento un método para el suministro de un conjugado, como se ha proporcionado el presente documento, a un paciente que sufre de una afección que es responsable del tratamiento con el conjugado. El método comprende el suministro, generalmente mediante inyección, de una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado (preferentemente proporcionado como parte de una composición farmacéutica). Los conjugados (típicamente como parte de una composición farmacéutica) se pueden suministrar mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección subcutánea, y demás. Los tipos de formulación adecuados para la administración parenteral incluyen soluciones listas para la inyección, polvos secos para la combinación con un disolvente antes de su uso, suspensiones listas para inyección, composiciones secas insolubles para la combinación con un vehículo antes de su uso, y emulsiones y líquidos concentrados para diluirse antes de la administración, entre otras.

El método de suministro se puede usar para tratar a un paciente que tiene una afección que se puede remediar o prevenir mediante la administración del conjugado. Los expertos habituales en la materia conocen las afecciones que puede tratar de forma eficaz un conjugado específico. Por ejemplo, los conjugados se pueden utilizar para tratar a individuos que padecen hemofilia B, bien como terapia de reemplazo o bien como profilaxis. La administración del conjugado para la profilaxis incluye las situaciones en las que el paciente padece hemofilia B y va a someterse a una intervención quirúrgica y el conjugado se administra entre una y cuatro horas antes de la intervención quirúrgica. Además, los conjugados son adecuados para su uso como profiláctico frente a las hemorragias incontroladas, opcionalmente en pacientes que no padecen hemofilia. De esta manera, por ejemplo, el conjugado se puede administrar un paciente con riesgo de hemorragia incontrolada antes de una intervención quirúrgica.

La dosis real que se administra podrá variar dependiendo de la edad, peso, y el estado general de salud del sujeto

así como de la gravedad de la afección que se está tratando, del juicio del profesional de cuidados sanitarios, y del conjugado que se va administrar. Los expertos en la materia conocen las cantidades terapéuticamente eficaces y/o estas se describen en los libros de texto y la literatura de referencia pertinentes. Generalmente, en base al peso, la cantidad terapéuticamente eficaz podrá variar de aproximadamente 0,001 mg a 100 mg, preferentemente en dosis de 0,01 mg/día a 75 mg/día, y más preferentemente en dosis de 0,10 mg/día a 50 mg/día. En base a la actividad, el experto en la materia puede calcular las dosis correspondientes basadas en unidades internacionales de actividad.

La dosificación unitaria de cualquier conjugado determinado (de nuevo, proporcionado preferentemente como parte de una composición farmacéutica) se puede administrar con una diversidad de programas de dosificación que dependen del juicio del clínico, las necesidades del paciente, y demás. El programa de dosificación específico se conoce por los expertos habituales en la materia o se puede determinar experimentalmente utilizando métodos de rutina. Los ejemplos de programas de dosificación incluyen la administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquier combinación de los mismos. Una vez que se ha conseguido el criterio de valoración clínico, se interrumpe la dosificación de la composición.

Procedimiento experimental

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de síntesis orgánica, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Los reactivos y los materiales están disponibles comercialmente a menos que se indique específicamente lo contrario. Véase, por ejemplo, J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4ª Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992), mencionado anteriormente.

En los siguientes ejemplos, se ha realizado un esfuerzo para asegurarse de la precisión con respecto a los valores numéricos utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero se deberían tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las temperaturas son en grados Celsius °C y la presión es la presión atmosférica a nivel del mar o cercana a ella.

Aunque se hará referencia a otras abreviaturas conocidas por los expertos habituales en la materia, se usarán otros reactivos y materiales, y se usarán otros métodos conocidos por los expertos en la materia, se proporciona la siguiente lista y descripción de métodos sólo por conveniencia.

NaCNBH ₃	Cianoborohidruro sódico, 95% (Aldrich)
HCl	Ácido clorhídrico, glacial (Fisher)
K o kDa	kilodaltons
Acetonitrilo	(Fisher Optima)
TFA	Ácido trifluoroacético, calidad de HPLC (JT Baker)
PBS	Tampón fosfato salino (Sigma)
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico] certificado de rendimiento en biotecnología, 99,5+% (Sigma)

Alcohol etílico, USP, Absolute-200 Proof (AAPER)

NuPAGE® MES [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico] tampón de migración en SDS (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA)

NuPAGE® 4 x LDS (dodecilsulfato de litio) tampón de muestras (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA)

SigmaMarker, intervalo bajo (P.M. 6500-66000) (Sigma)

SigmaMarker, intervalo medio (P.M. 36000-205000) (Sigma)

NuPAGE® Novex Bis-Tris [Bis(2-hidroxietil)imino-tris(hidroximetil)metano-HCl] gel (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA)

Análisis por SEC-HPLC

5 La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se llevó a cabo en un sistema Agilent 1100 HPLC (Agilent). Para las muestras que se analizaron utilizando SEC-HPLC, cada muestra se analizó utilizando una columna KW-804 de proteína SHODEX (Showa Denko KK, Tokio Japón), a pH 7,2. El caudal para la columna se ajustó a 0,5 ml/minuto. Las proteínas y los conjugados PEG-proteína eluidos se detectaron utilizando un enfoque basado en UV que tiene una longitud de onda establecida en 280 nm.

Análisis por SDS-PAGE

10 La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) se llevó a cabo usando un sistema de electroforesis XCELL SURELOCK Mini-Cell (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA). Para las muestras que se analizaron utilizando SDS-PAGE, cada mezcla se mezcló con 4 x tampón de muestras LDS (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA). A continuación las muestras preparadas se cargaron sobre un gel NuPAGE Novex Bis-Tris al 4-12% y migraron durante aproximadamente 30 minutos a 200 V usando tampón de migración NuPAGE® MES (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA).

Análisis por RP-HPLC

20 La cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa se realizó utilizando una columna inversa C3 (Hamilton, Zorbax). Se utilizó un gradiente del 30-80% de acetonitrilo junto con una temperatura elevada durante 30 minutos a 0,5 ml/ minuto.

25 El Factor IX recombinante correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N° 1 se utilizó en los Ejemplos 1-16. Se obtuvo el Factor IX en un tampón que contiene tanto L-histidina como glicina. A causa de que los grupos amino asociados con la L-histidina y la glicina en el tampón podrían competir con los grupos amino asociados con el Factor IX, fue necesario intercambiar el tampón que contiene amina por un tampón libre de aminas para mejorar el rendimiento de la conjugación del Factor IX cuando se utilizaron reactivos poliméricos dirigidos a aminas para efectuar la conjugación.

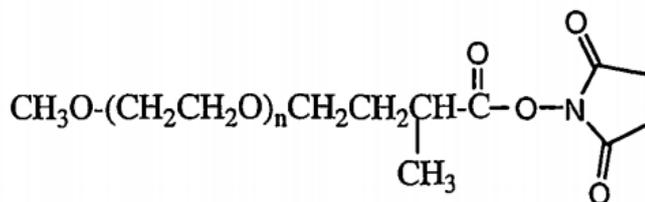
30 En resumen, el tampón que contiene amina se intercambió por un tampón libre de aminas en una de las dos aproximaciones, dependiendo del volumen de tampón a intercambiar. Para volúmenes de tampón relativamente pequeños, se utilizó una columna centrífuga de 500 µl Zeba Desalt (Pierce Biotechnology, Rockford IL) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Para volúmenes de tampón relativamente grandes, se utilizó un dispositivo de filtrado centrífugo de 2 ml CENTRICON® (Millipore Corporation, Billerica MA) con un punto de corte de un peso molecular de 10000 o 30000 dalton de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Todas las muestras utilizadas en los Ejemplos sin etanol se cambiaron a 1 x tampón PBS que tiene un pH de 7,5, mientras que todas las muestras utilizadas en los Ejemplos con etanol se intercambiaron con 1 x tampón PBS que tiene un pH de 7,5 con etanol añadido para formar una mezcla de reacción de Factor IX que contiene etanol al 10%.

40 El tampón libre de aminas que contiene el Factor IX recombinante y que corresponde a la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N° 1 (la "solución patrón de Factor IX") se utilizó en los Ejemplos 1-16. La solución patrón de Factor IX contenía aproximadamente de 0,2 mg/ml a 0,55 mg/ml de Factor IX.

Ejemplo 1

45 PEGilación de Factor IX con mPEG-SMB, 30 kDa

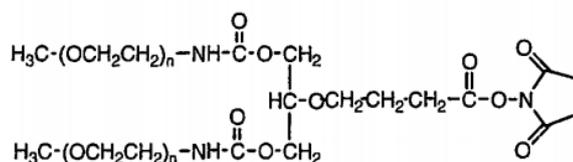
50 (Proporción 1:1 de polímero con respecto al Factor IX; sin etanol)



mPEG-SMB, 30 kDa

55 Se templó a temperatura ambiente mPEG-SMB, 30 kDa, almacenado a -20 °C en atmósfera de argón. El mPEG-SMB (4,1 mg) templado se disolvió en 1 ml de HCl 2 mM para formar una solución de mPEG-SMB. Se añadió la solución de mPEG-SMB a una alícuota de la solución patrón de Factor IX que contiene 0,07 mg de Factor IX hasta

(Proporción 1:1 de polímero con respecto al Factor IX; sin etanol)



mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa

5

Se utilizó a temperatura ambiente mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa, al macenado a -20°C en atmósfera de argón. El mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado (2,0 mg) templado se disolvió en 1 ml de HCl 2 mM para formar una solución de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado. Se añadió la solución de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado a una alícuota de la solución patrón de Factor IX que contiene 0,07 mg de Factor IX hasta que se alcanzó una proporción molar 1:1 de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado con respecto al Factor IX. Después de la adición del mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, se comprobó el pH de la reacción para asegurar un valor de pH de 7, 2 a 7, 5, y se mezcló bien. Para permitir el acoplamiento del mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado al Factor IX a través de un enlace amida, la solución de reacción se agitó durante tres horas a temperatura ambiente, después de lo cual se migró la muestra con SDS PAGE, que no mostró ninguna conjugación detectable. Véase la banda marcada como "NHS 40 K 1:1" en el gel proporcionado en la Figura 1. Después de esto, se proporciona un tiempo adicional para la conjugación mediante la agitación de la solución de reacción durante 15 horas a 4°C , obteniéndose de esta manera una solución de conjugado.

10

15

20

Se utilizaron RP-HPLC (C_3) y una segunda SDS PAGE para la caracterización de la solución de conjugado resultante. Basándose en el resultado de la segunda SDS PAGE, se observó conjugación. Véase la banda marcada como "NHS 40 K 1:1" en el gel proporcionado en la Figura 2. Se utilizó RP-HPLC (C_3) para separar los componentes de la solución de conjugado resultante y el cromatograma resultante indicó un rendimiento del 0,1% (que representa el 100% de especies monoPEGiladas o "1-mero"). Véase el cromatograma proporcionado en la Figura 7.

25

Se espera que un aumento en los tiempos de reacción, el aumento de la temperatura y/o las adiciones múltiples de reactivo polimérico podrían incrementar el rendimiento. Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado que tenga otro peso molecular promedio en peso.

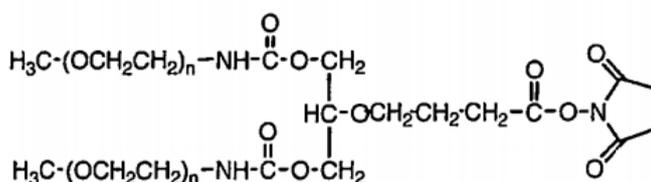
30

Ejemplo 4

PEGilación de Factor IX con mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa

(Proporción 10:1 de polímero con respecto al Factor IX; sin etanol)

35



mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa

40

Se utilizó a temperatura ambiente mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa, al macenado a -20°C en atmósfera de argón. El mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado (2,0 mg) templado se disolvió en 1 ml de HCl 2 mM para formar una solución de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado. Se añadió la solución de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado a una alícuota de la solución patrón de Factor IX que contiene 0,07 mg de Factor IX hasta que se alcanzó un exceso molar 10 veces superior de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado con respecto al Factor IX. Después de la adición del mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, se comprobó el pH de la reacción para asegurar un valor de pH de 7, 2 a 7, 5, y se mezcló bien. Para permitir el acoplamiento del mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado al Factor IX a través de un enlace amida, la solución de reacción se agitó durante tres horas a temperatura ambiente, después de lo cual se migró la muestra con SDS PAGE, que no mostró ninguna conjugación detectable. Véase la banda marcada como "NHS 40 K 10:1" en el gel proporcionado en la Figura 1. Después de esto, se permitió que continuara el acoplamiento mediante la agitación de la solución de reacción durante 15 horas a 4°C , obteniéndose de esta manera una solución de conjugado.

50

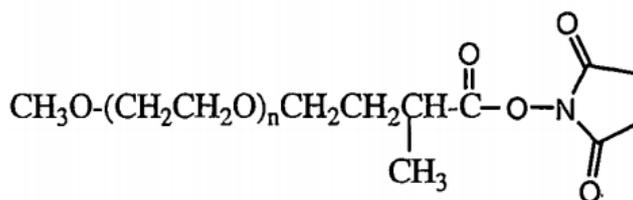
Se utilizaron RP-HPLC (C₃) y una segunda SDS PAGE para la caracterización de la solución de conjugado resultante. Basándose en el resultado de la segunda SDS PAGE, la conjugación aún no era detectable. Véase la banda marcada como " NHS 40 K 10:1 " en el gel proporcionado en la Figura 2. Se utilizó RP-HPLC (C₃) para separar los componentes de la solución de conjugado resultante y el cromatograma resultante no indicó ningún rendimiento de conjugado detectable. Véase el cromatograma proporcionado en la Figura 8.

Se espera que un aumento en los tiempos de reacción, el aumento de la temperatura y/o las adiciones múltiples de reactivo polimérico podrían incrementar el rendimiento. Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado que tenga otro peso molecular promedio en peso.

Ejemplo 5

PEGilación de Factor IX con mPEG-SMB, 30 kDa

(Proporción 10:1 de polímero con respecto al Factor IX; con etanol)



mPEG-SMB, 30 kDa

Dado que se cree que el etanol aumenta la flexibilidad estructural de ciertas proteínas, se introdujo etanol en el tampón y el sistema de reacción. Se templó a temperatura ambiente mPEG-SMB, 30 kDa, almacenado a -20 °C en atmósfera de argón. El mPEG-SMB (10,0 mg) templado se disolvió en 0,5 ml de HCl 2 mM con etanol añadido para formar una solución de mPEG-SMB que contiene etanol al 10%. Se añadió la solución de mPEG-SMB que contiene etanol al 10% a la mezcla de reacción de Factor IX que contiene etanol al 10% hasta que se alcanzó un exceso molar 10 veces superior de mPEG-SMB con respecto al Factor IX. Después de la adición del mPEG-SMB, se comprobó el pH de la reacción para asegurar un valor de pH de 7,2 a 7,5, y se mezcló bien. Para permitir el acoplamiento del mPEG-SMB al Factor IX a través de un enlace amida, la solución de reacción se agitó durante tres horas a temperatura ambiente. Se permitió que continuara el acoplamiento mediante la agitación de la solución de reacción durante toda la noche a 4 °C, obteniéndose de esta manera una solución de conjugado.

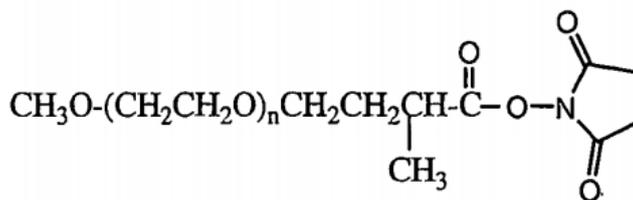
Se utilizó SDS PAGE para la caracterización de la solución de conjugado resultante. Basándose en los resultados de SDS PAGE, no se detectó conjugación. Véase la banda marcada como " SMB 30 K 10:1 + EtOH" en el gel proporcionado en la Figura 3. No se cree que la introducción de etanol incremente la flexibilidad estructural del Factor IX que permita un aumento de la conjugación de mPEG-SMB, 30 kDa.

Se espera que un aumento en los tiempos de reacción, el aumento de la temperatura y/o las adiciones múltiples de reactivo polimérico podrían incrementar el rendimiento. Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG-SMB que tenga otro peso molecular promedio en peso.

Ejemplo 6

PEGilación de Factor IX con mPEG-SMB, 30 kDa

(Proporción 20:1 de polímero con respecto al Factor IX; con etanol)



mPEG-SMB, 30 kDa

Dado que se cree que el etanol aumenta la flexibilidad estructural de ciertas proteínas, se introdujo etanol en el

tampón y el sistema de reacción. Se templó a temperatura ambiente mPEG-SMB, 30 kDa, almacenado a -20 °C en atmósfera de argón. El mPEG-SMB (10,0 mg) templado se disolvió en 0,5 ml de HCl 2 mM con etanol añadido para formar una solución de mPEG-SMB que contiene etanol al 10%. Se añadió la solución de mPEG-SMB que contiene etanol al 10% a la mezcla de reacción de Factor IX que contiene etanol al 10% hasta que se alcanzó un exceso molar 20 veces superior de mPEG-SMB con respecto al Factor IX. Después de la adición del mPEG-SMB, se comprobó el pH de la reacción para asegurar un valor de pH de 7,2 a 7,5, y se mezcló bien. Para permitir el acoplamiento del mPEG-SMB al Factor IX a través de un enlace amida, la solución de reacción se agitó durante tres horas a temperatura ambiente. Se permitió que continuara el acoplamiento mediante la agitación de la solución de reacción durante toda la noche a 4 °C, obteniéndose de esta manera una solución de conjugado.

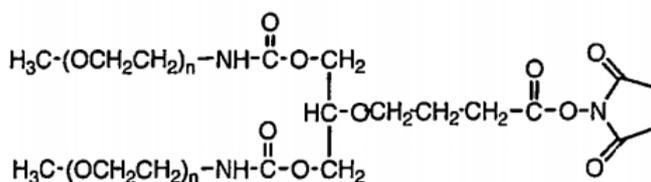
Se utilizó SDS PAGE para la caracterización de la solución de conjugado resultante. Basándose en los resultados de SDS PAGE, no se detectó conjugación. Véase la banda marcada como "SMB 30 K 20:1 + EtOH" en el gel proporcionado en la Figura 3. No se cree que la introducción de etanol incremente la flexibilidad estructural del Factor IX que permita un aumento de la conjugación de mPEG-SMB, 30 kDa.

Se espera que un aumento en los tiempos de reacción, el aumento de la temperatura y/o las adiciones múltiples de reactivo polimérico podrían incrementar el rendimiento. Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG-SMB que tenga otro peso molecular promedio en peso.

Ejemplo 7

PEGilación de Factor IX con mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa

(Proporción 10:1 de polímero con respecto al Factor IX; con etanol)



mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa

Dado que se cree que el etanol aumenta la flexibilidad estructural de ciertas proteínas, se introdujo etanol en el tampón y el sistema de reacción. Se templó a temperatura ambiente mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa, almacenado a -20 °C en atmósfera de argón. El mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado (2,0 mg) templado se disolvió en 1,0 ml de HCl 2 mM con etanol añadido para formar una solución de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado que contiene etanol al 10%. Se añadió la solución de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado que contiene etanol al 10% a la mezcla de reacción de Factor IX que contiene etanol al 10% hasta que se alcanzó un exceso molar 10 veces superior de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado con respecto al Factor IX. Después de la adición del mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, se comprobó el pH de la reacción para asegurar un valor de pH de 7,2 a 7,5, y se mezcló bien. Para permitir el acoplamiento del mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado al Factor IX a través de un enlace amida, la solución de reacción se agitó durante tres horas a temperatura ambiente. Se permitió que continuara el acoplamiento mediante la agitación de la solución de reacción toda la noche a 4 °C, obteniéndose de esta manera una solución de conjugado.

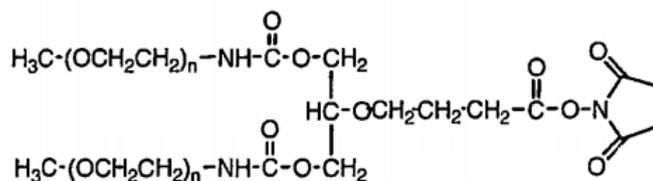
Se utilizó SDS PAGE para la caracterización de la solución de conjugado resultante. Basándose en los resultados de SDS PAGE, no se detectó conjugación (resultados no mostrados). No se cree que la introducción de etanol incremente la flexibilidad estructural del Factor IX que permita un aumento de la conjugación de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa.

Se espera que un aumento en los tiempos de reacción, el aumento de la temperatura y/o las adiciones múltiples de reactivo polimérico podrían incrementar el rendimiento. Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado que tenga otro peso molecular promedio en peso.

Ejemplo 8

PEGilación de Factor IX con mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa

(Proporción 20:1 de polímero con respecto al Factor IX; con etanol)



mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa

5 Dado que se cree que el etanol aumenta la flexibilidad estructural de ciertas proteínas, se introdujo etanol en el tampón y el sistema de reacción. Se templó a temperatura ambiente mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa, almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de argón. El mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado (2,0 mg) templado se disolvió en 1,0 ml de HCl 2 mM con etanol añadido para formar una solución de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado que contiene etanol al 10%. Se añadió la solución de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado que contiene etanol al 10% a la mezcla de reacción de Factor IX que contiene etanol al 10% hasta que se alcanzó un exceso molar 20 veces superior de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado con respecto al Factor IX. Después de la adición del mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, se comprobó el pH de la reacción para asegurar un valor de pH de 7,2 a 7,5, y se mezcló bien. Para permitir el acoplamiento del mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado al Factor IX a través de un enlace amida, la solución de reacción se agitó durante tres horas a temperatura ambiente. Se permitió que continuara el acoplamiento mediante la agitación de la solución de reacción toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, obteniéndose de esta manera una solución de conjugado.

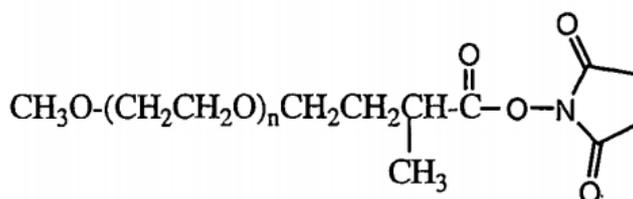
20 Se utilizó SDS PAGE para la caracterización de la solución de conjugado resultante. Basándose en los resultados de SDS PAGE, no se detectó conjugación (resultados no mostrados). No se cree que la introducción de etanol incremente la flexibilidad estructural del Factor IX que permita un aumento de la conjugación de mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa.

25 Se espera que un aumento en los tiempos de reacción, el aumento de la temperatura y/o las adiciones múltiples de reactivo polimérico podrían incrementar el rendimiento. Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado que tenga otro peso molecular promedio en peso.

Ejemplo 9

PEGilación de Factor IX con mPEG-SMB, 30 kDa

30 (Proporción 20:1 de polímero con respecto al Factor IX; sin etanol)



mPEG-SMB, 30 kDa

35 Se templó a temperatura ambiente mPEG-SMB, 30 kDa, almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de argón. El mPEG-SMB (8,6 mg) templado se disolvió en 1,0 ml de HCl 2 mM para formar una solución de mPEG-SMB. Se añadió la solución de mPEG-SMB a una alícuota de la solución patrón de Factor IX que contiene 0,07 mg de Factor IX hasta que se alcanzó un exceso molar 20 veces superior de mPEG-SMB con respecto al Factor IX. Después de la adición del mPEG-SMB, se comprobó el pH de la reacción para asegurar un valor de pH de 7,2 a 7,5, y se mezcló bien. Para permitir el acoplamiento del mPEG-SMB al Factor IX a través de un enlace amida, la solución de reacción se agitó durante dos horas a temperatura ambiente. Se permitió que continuara el acoplamiento mediante la agitación de la solución de reacción toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, obteniéndose de esta manera una solución de conjugado. Después de esto, se permitió que continuara el acoplamiento mediante la agitación de la solución de reacción toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, obteniéndose de esta manera una solución de conjugado.

50 Se utilizó SDS PAGE para la caracterización de la solución de conjugado resultante. Basándose en los resultados de SDS PAGE, se observó conjugación. Véase la banda marcada como "SMB 30 K 20:1" en el gel proporcionado en la Figura 4.

Se espera que un aumento en los tiempos de reacción, el aumento de la temperatura y/o las adiciones múltiples de

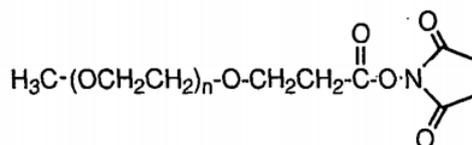
reactivo polimérico podrían incrementar el rendimiento. Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG-SMB que tenga otro peso molecular promedio en peso.

Ejemplo 10

5

PEGilación de Factor IX con mPEG-SPA, 20 kDa

(Proporción 20:1 de polímero con respecto al Factor IX; con etanol)



10

mPEG-SPA, 20 kDa

Dado que se cree que el etanol aumenta la flexibilidad estructural de ciertas proteínas, se introdujo etanol en el tampón y el sistema de reacción. Se templó a temperatura ambiente mPEG-SPA, 20 kDa, almacenado a -20 °C en atmósfera de argón. El mPEG-SPA (10,0 mg) templado se disolvió en 0,5 ml de HCl 2 mM con etanol añadido para formar una solución de mPEG-SPA que contiene etanol al 10%. Se añadió la solución de mPEG-SPA que contiene etanol al 10% a la mezcla de reacción de Factor IX que contiene etanol al 10% hasta que se alcanzó un exceso molar 20 veces superior de mPEG-SPA con respecto al Factor IX. Después de la adición del mPEG-SPA, se comprobó el pH de la reacción para asegurar un valor de pH de 7,2 a 7,5, y se mezcló bien. Para permitir el acoplamiento del mPEG-SPA al Factor IX a través de un enlace amida, la solución de reacción se agitó durante dos horas a temperatura ambiente. Se permitió que continuara el acoplamiento mediante la agitación de la solución de reacción.

15

20

Basándose en los resultados de SDS PAGE, no se detectó conjugación. Véase la banda marcada como "SPA 20 K 20:1 + EtOH" en el gel proporcionado en la Figura 3. No se cree que la introducción de etanol incremente la flexibilidad estructural del Factor IX que permita un aumento de la conjugación de mPEG-SPA, 20 kDa.

25

Se espera que un aumento en los tiempos de reacción, el aumento de la temperatura y/o las adiciones múltiples de reactivo polimérico podrían incrementar el rendimiento. Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG-SPA que tenga otro peso molecular promedio en peso.

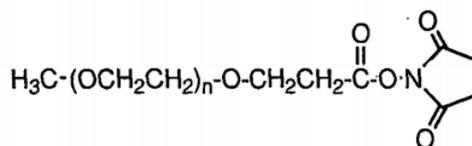
30

Ejemplo 11

35

PEGilación de Factor IX con mPEG-SPA, 20 kDa

(Proporción 40:1 de polímero con respecto al Factor IX; con etanol)



40

mPEG-SPA, 20 kDa

Dado que se cree que el etanol aumenta la flexibilidad estructural de ciertas proteínas, se introdujo etanol en el tampón y el sistema de reacción. Se templó a temperatura ambiente mPEG-SPA, 20 kDa, almacenado a -20 °C en atmósfera de argón. El mPEG-SPA (10,0 mg) templado se disolvió en 0,5 ml de HCl 2 mM con etanol añadido para formar una solución de mPEG-SPA que contiene etanol al 10%. Se añadió la solución de mPEG-SPA que contiene etanol al 10% a la mezcla de reacción de Factor IX que contiene etanol al 10% hasta que se alcanzó un exceso molar 40 veces superior de mPEG-SPA con respecto al Factor IX. Después de la adición del mPEG-SPA, se comprobó el pH de la reacción para asegurar un valor de pH de 7,2 a 7,5, y se mezcló bien. Para permitir el acoplamiento del mPEG-SPA al Factor IX a través de un enlace amida, la solución de reacción se agitó durante dos horas a temperatura ambiente. Se permitió que continuara el acoplamiento mediante la agitación de la solución de reacción.

45

50

Basándose en los resultados de SDS PAGE, no se detectó conjugación. Véase la banda marcada como "SPA 20 K 40:1 + EtOH" en el gel proporcionado en la Figura 3. No se cree que la introducción de etanol incremente la flexibilidad estructural del Factor IX que permita un aumento de la conjugación de mPEG-SPA, 20 kDa.

55

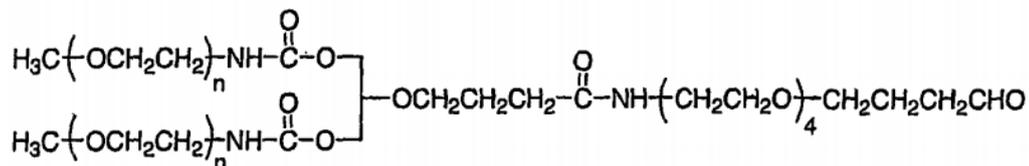
Se espera que un aumento en los tiempos de reacción, el aumento de la temperatura y/o las adiciones múltiples de reactivo polimérico podrían incrementar el rendimiento. Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG-SPA que tenga otro peso molecular promedio en peso.

5

Ejemplo comparativo: Ejemplo 12

PEGilación de Factor IX con mPEG-butiraldehído ramificado, 20 kDa

10 (Proporción 10:1 de polímero con respecto al Factor IX; sin etanol)



mPEG-butiraldehído ramificado, 20 kDa

15 Se templó a temperatura ambiente mPEG-butiraldehído ramificado, 20 kDa, almacenado a -20 °C en atmósfera de argón. El mPEG-butiraldehído ramificado (10,9 mg) templado se disolvió en 1 ml de HCl 2 mM para formar una solución de mPEG-butiraldehído ramificado. Se añadió la solución de mPEG-butiraldehído ramificado a una alícuota de la solución patrón de Factor IX que contiene 0,07 mg de Factor IX hasta que se alcanzó un exceso molar 10 veces superior de mPEG-butiraldehído ramificado con respecto al Factor IX. Después de 30 minutos de mezcla, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃ (disuelto en 1 x PBS), en exceso en relación al mPEG-butiraldehído ramificado (comprobando y ajustando el pH si fuera necesario para asegurar la reducción a la amina secundaria). A continuación se agitó la solución toda la noche a 4 °C para asegurar el acoplamiento a través de un enlace amina.

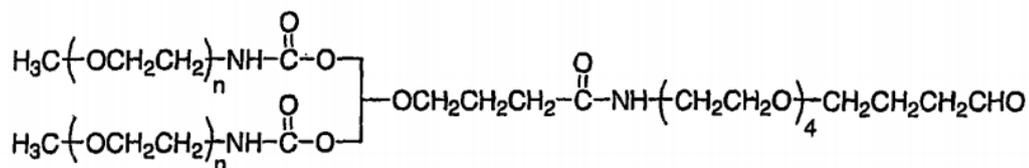
25 Se utilizaron RP-HPLC (C₃) y SDS PAGE para la caracterización de la solución de conjugado resultante. Basándose en los resultados de SDS PAGE, no se detectó conjugación. Véase la banda marcada como "BYA 20 K 10:1" en el gel proporcionado en la Figura 4. Se utilizó RP-HPLC (C₃) para separar los componentes de la solución de conjugado resultante y el cromatograma resultante no confirmó la presencia de material conjugado. Véase el cromatograma proporcionado en la Figura 9.

30 Se espera que un aumento en los tiempos de reacción, el aumento de la temperatura y/o las adiciones múltiples de reactivo polimérico podrían incrementar el rendimiento. Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG-butiraldehído ramificado que tenga otro peso molecular promedio en peso.

35 Ejemplo comparativo: Ejemplo 13

PEGilación de Factor IX con mPEG-butiraldehído ramificado, 20 kDa

(Proporción 20:1 de polímero con respecto al Factor IX; sin etanol)



mPEG-butiraldehído ramificado, 20 kDa

45 Se templó a temperatura ambiente mPEG-butiraldehído ramificado, 20 kDa, almacenado a -20 °C en atmósfera de argón. El mPEG-butiraldehído ramificado (10,9 mg) templado se disolvió en 1 ml de HCl 2 mM para formar una solución de mPEG-butiraldehído ramificado. Se añadió la solución de mPEG-butiraldehído ramificado a una alícuota de la solución patrón de Factor IX que contiene 0,07 mg de Factor IX hasta que se alcanzó un exceso molar 20 veces superior de mPEG-butiraldehído ramificado con respecto al Factor IX. Después de 30 minutos de mezcla, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃ (disuelto en 1 x PBS), en exceso en relación al mPEG-butiraldehído ramificado (comprobando y ajustando el pH si fuera necesario para asegurar la reducción a la amina secundaria). A continuación se agitó la solución toda la noche a 4 °C para asegurar el acoplamiento a través de un enlace amina.

50 Se utilizaron RP-HPLC (C₃) y SDS PAGE para la caracterización de la solución de conjugado resultante. Basándose en los resultados de SDS PAGE, no se detectó conjugación. Véase la banda marcada como "BYA 20 K 20:1" en el

gel proporcionado en la Figura 4. Se utilizó RP-HPLC (C₃) para separar los componentes de la solución de conjugado resultante y el cromatograma resultante no confirmó la presencia de material conjugado. Véase el cromatograma proporcionado en la Figura 10.

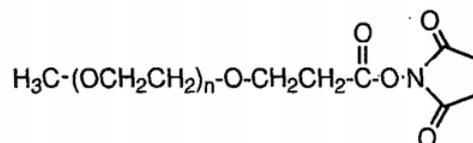
- 5 Se espera que un aumento en los tiempos de reacción, el aumento de la temperatura y/o las adiciones múltiples de reactivo polimérico podrían incrementar el rendimiento. Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG-butiraldehído ramificado que tenga otro peso molecular promedio en peso.

Ejemplo 14

10

PEGilación de Factor IX con mPEG-SPA, 20 kDa

(Proporción 53:1 de polímero con respecto al Factor IX; sin etanol)



15

mPEG-SPA, 20 kDa

20 Se templó a temperatura ambiente mPEG-SPA, 20 kDa, almacenado a -20 °C en atmósfera de argón. El mPEG-SPA (5,4 mg) templado se disolvió en 1 ml de HCl 2 mM para formar una solución de mPEG-SPA. Se añadió la solución de mPEG-SPA a una alícuota de la solución patrón de Factor IX que contiene 0,07 mg de Factor IX hasta que se alcanzó un exceso molar 53 veces superior de mPEG-SPA con respecto al Factor IX. Después de la adición del mPEG-SPA, se comprobó el pH de la reacción para asegurar un valor de pH de 7,2 a 7,5. Para permitir el acoplamiento del mPEG-SPA al Factor IX a través de un enlace amida, la solución de reacción se agitó durante dos horas a temperatura ambiente. Se permitió que continuara el acoplamiento mediante la agitación de la solución de reacción toda la noche a 4 °C, obteniéndose de esta manera una solución de conjugado.

25

30 Se utilizaron RP-HPLC (C₃) y una sonda SDS PAGE para la caracterización de la solución de conjugado resultante. Basándose en los resultados de SDS PAGE, se confirmó la conjugación. Véase la banda marcada como "SPA 20 K 53:1" en el gel proporcionado en la Figura 4. Se utilizó RP-HPLC (C₃) para separar los componentes de la solución de conjugado resultante y el cromatograma resultante indicó un rendimiento de conjugación de aproximadamente un 60% (que comprende un 51,9% de especies monoPEGiladas o "1-mero" y un 18% de especies diPEGiladas o "2-mero"). Véase el cromatograma proporcionado en la Figura 11. Se cree, sin embargo, que el rendimiento real puede ser algo inferior debido al exceso relativamente grande de reactivo polimérico.

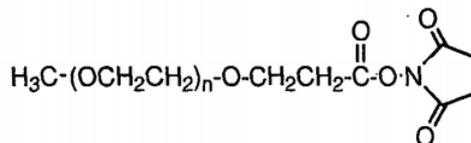
30

35 Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG-SPA que tenga otro peso molecular promedio en peso.

Ejemplo 15

40 PEGilación de Factor IX con mPEG-SPA, 20 kDa

(Proporción 110:1 de polímero con respecto al Factor IX; sin etanol)



45

mPEG-SPA, 20 kDa

50 Se templó a temperatura ambiente mPEG-SPA, 20 kDa, almacenado a -20 °C en atmósfera de argón. El mPEG-SPA (5,4 mg) templado se disolvió en 1 ml de HCl 2 mM para formar una solución de mPEG-SPA. Se añadió la solución de mPEG-SPA a una alícuota de la solución patrón de Factor IX que contiene 0,07 mg de Factor IX hasta que se alcanzó un exceso molar 110 veces superior de mPEG-SPA con respecto al Factor IX. Después de la adición del mPEG-SPA, se comprobó el pH de la reacción para asegurar un valor de pH de 7,2 a 7,5. Para permitir el acoplamiento del mPEG-SPA al Factor IX a través de un enlace amida, la solución de reacción se agitó durante dos horas a temperatura ambiente. Se permitió que continuara el acoplamiento mediante la agitación de la solución de reacción toda la noche a 4 °C, obteniéndose de esta manera una solución de conjugado.

55

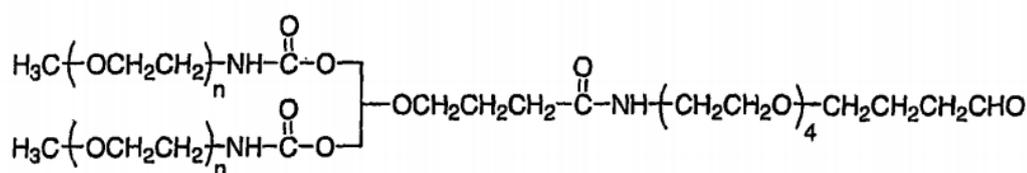
Se utilizaron RP-HPLC (C₃) y una sonda SDS PAGE para la caracterización de la solución de conjugado resultante. Basándose en los resultados de SDS PAGE, se confirmó la conjugación. Véase la banda marcada como "SPA 20 K 110:1" en el gel proporcionado en la Figura 4. Se utilizó RP-HPLC (C₃) para separar los componentes de la solución de conjugado resultante y el cromatograma resultante indicó un rendimiento de conjugación de aproximadamente un 44% (representa aproximadamente el 100% de especies monoPEGiladas o "1-mero"). Véase el cromatograma proporcionado en la Figura 12. Se cree, sin embargo, que el rendimiento real puede ser algo inferior debido al exceso relativamente grande de reactivo polimérico.

Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG-SPA que tenga otro peso molecular promedio en peso.

Ejemplo comparativo: Ejemplo 16

PEGilación de Factor IX con mPEG-butiraldehído ramificado, 20 kDa

(Proporción 20:1 de polímero con respecto al Factor IX; con etanol)



mPEG-butiraldehído ramificado, 20 kDa

Dado que se cree que el etanol aumenta la flexibilidad estructural de ciertas proteínas, se introdujo etanol en el tampón y el sistema de reacción. Se empleó a temperatura ambiente mPEG-butiraldehído ramificado, 20 kDa, almacenado a -20 °C en atmósfera de argón. El mPEG-butiraldehído ramificado (10,9 mg) templado se disolvió en 1 ml de HCl 2 mM con etanol añadido para formar una solución de mPEG-butiraldehído ramificado que contiene etanol al 10%. Se añadió la solución de mPEG-butiraldehído ramificado que contiene etanol al 10% a una alícuota de la solución patrón de Factor IX que contiene 0,07 mg de Factor IX hasta que se alcanzó un exceso molar 20 veces superior de mPEG-butiraldehído ramificado con respecto al Factor IX. Después de 30 minutos de mezcla, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃ (disuelto en 1 x PBS), en exceso en relación al mPEG-butiraldehído ramificado (comprobando y ajustando el pH si fuera necesario para asegurar la reducción a la amina secundaria). A continuación se agitó la solución toda la noche a 4 °C para asegurar el acoplamiento a través de un enlace amina.

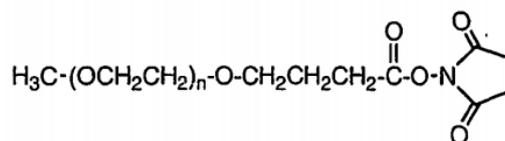
Se utilizaron RP-HPLC (C₃) y SDS PAGE para la caracterización de la solución de conjugado resultante. Basándose en los resultados de SDS PAGE, no se detectó conjugación. Véase la banda marcada como "BYA 20 K 20:1 + EtOH" en el gel proporcionado en la Figura 4. Los datos de RP-HPLC (C₃) confirmaron la ausencia de material conjugado detectable (resultados no mostrados). No se cree que la introducción de etanol incremente la flexibilidad estructural del Factor IX que permita un aumento de la conjugación de mPEG-butiraldehído ramificado.

Se espera que un aumento en los tiempos de reacción, el aumento de la temperatura y/o las adiciones múltiples de reactivo polimérico podrían incrementar el rendimiento. Usando este mismo enfoque, se pueden preparar otros conjugados utilizando mPEG-butiraldehído ramificado que tenga otro peso molecular promedio en peso.

Ejemplo 17

PEGilación de Factor IXa con mPEG-SBA

Se obtiene mPEG-butanoato de succinimidilo que tiene un peso molecular de 10 000 daltons de Nektar Therapeutics, (Huntsville, AL). La estructura básica del reactivo polimérico se proporciona a continuación:

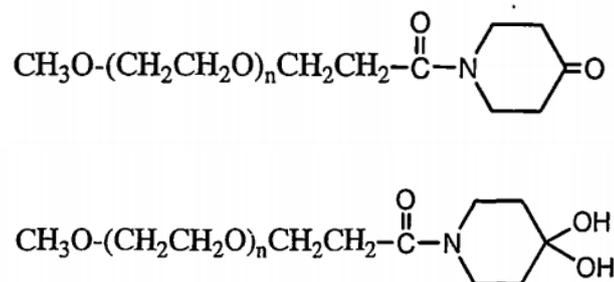


Si se encuentra liofilizado, el Factor IXa se disuelve en tampón libre de aminas tal como fosfato para obtener un pH final de 7,2-9. A continuación se añade a esta solución un exceso molar de 1,5 a 10 veces superior de mPEG-SBA. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante varias horas.

La mezcla de reacción se analiza mediante SDS-PAGE para determinar el grado de PEGilación de la proteína.

Ejemplo 18

5 PEGilación de Factor IX con mPEG-PIP, 5 K



10 El reactivo polimérico anterior, mostrado tanto en la forma de cetona como en la de lactam correspondiente, se prepara como se describe en el documento de Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos de América N° 2005/0031576.

15 Para preparar el reactivo polimérico anterior, a una solución de metoxi-polietilenglicol-propionato de succinimido que tiene un peso molecular promedio en peso de 5000 daltons (1,0 g, 0,002 moles) en cloruro de metileno (20 ml), se añaden trietilamina (0,084 ml, 0,006 moles) e hidrocloreto de monohidrato de 4-piperidona (0,077 g, 0,005 moles). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno durante una noche y a continuación se purifica antes de la conjugación. De forma alternativa, el reactivo polimérico se puede adquirir en Nektar Therapeutics.

20 Para efectuar la conjugación, a una solución de Factor IX en tampón acuoso se añade un exceso molar 20 veces superior de mPEG-PIP, 5 K. La solución resultante se coloca en un agitador orbital Roto Mix™ (Thermolyne Corp., Dubuque, IA) ajustado a la velocidad lenta para facilitar la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se añade NaCNBH₃ acuoso en una cantidad igual a un exceso molar 50 veces superior con relación al Factor IX. Se recogen alícuotas en intervalos de tiempo de la mezcla de reacción y se analizan mediante SDS-PAGE (utilizando geles disponibles en Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

25 Los análisis por SDS-PAGE indican la presencia de derivados de PEG del Factor IX que tienen 1, 2, y 3 restos de PEG unidos.

30 Ejemplo 19

Conjugación de Factor IX insertado con cisteína con mPEG-MAL, 20 K

35 Se insertan en el Factor IX uno o más residuos de cisteína de acuerdo con el proceso descrito en el documento de Patente WO 90/12874.

Antes de la conjugación, se realiza un intercambio de tampón en el Factor IX para reemplazar la histidina con HEPES.

40 Se templó a temperatura ambiente mPEG-MAL, 20 K, almacenado a -20 °C en atmósfera de argón. El mPEG-MAL (4,4 mg) templado se disuelve en 0,044 ml de tampón HEPES [HEPES 50 mM (u otro tampón adecuado) pH 7,0] para preparar una solución de mPEG-MAL al 10%. La solución de mPEG-MAL se añade rápidamente a 4 ml de solución de Factor IX [0,4324 mg/ml en 50 HEPES mM (u otro tampón adecuado) pH 7,0] y se mezcla bien. Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, se transfiere el vial de reacción a una cámara fría (4 °C), y se añaden otros 0,044 ml de solución de mPEG-MAL a la mezcla de reacción, seguido de la adición de tres alícuotas más de 0,044 ml de solución de mPEG-MAL en el transcurso de dos horas. Se determina el pH (pH 7,0 ± 0,2). La proporción molar de mPEG-MAL con respecto a la proteína que es de 50:1. La concentración final de mPEG-MAL es de 5,213 mg/ml, y la concentración final de Factor IX es de 0,410 mg/ml. Se deja transcurrir la reacción toda la noche a 4 °C en Rotomix (velocidad lenta, Thermolyne).

50 La mezcla de conjugado se purificó utilizando cromatografía por filtración en gel. Se desarrolla un método de cromatografía de exclusión por tamaño para analizar las mezclas de reacción, y los productos finales. También se usa el análisis mediante SDS-PAGE para la caracterización de las muestras.

55 Ejemplo 20

Actividad *in vitro* de los conjugados de Factor IX con PEG ejemplares

- 5 Se determina la actividad biológica de cada uno de los conjugados de Factor IX con PEG descritos en los Ejemplos 1, 2, 3, 9, 14 y 15. Se determinó en todos los conjugados de Factor IX con PEG ensayados que tuvieran algún grado de actividad de Factor IX.

Listado de secuencias

- 10 SEC. ID. N° 1 (abreviatura de letra individual): Secuencia de aminoácidos del Factor IX humano

1	mqrvmimae	spgliticll	gyllsaectv	fldhenanki	lnrpkrynsg	kleefvqgnl
61	erecmeecks	feearevfen	terttefwkq	yvdgdqcesn	pclnggsckd	dinsyecwcp
121	fgfegkncel	dvtcnikngr	ceqfcknsad	nkvvcscteg	yrlaengksc	epavpfpogr
181	vsvsqtsklt	raeavfpdvd	yvnsteaeti	ldnitqstqs	fndftrvvgg	edakpgqfpw
241	qvvlngkvda	fcggsivnek	wivtaahcve	tgvkitvvag	ehnieeteht	eqkrnvirii
301	phhnyaaain	kynhdialle	ldeplvlnsy	vtpiciadke	ytniflkfgs	gyvsgwgrvf
361	hkgrsalvlq	ylrvplvdra	tclrstkfti	ynnmfcagfh	eggrdscqgd	sggphvteve
421	gtsfltgiis	wgeecamkgk	ygiytkvsry	vnwikekttl	t	

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende un resto de Factor IX unido covalentemente a través de un enlace amida, bien directamente o bien a través de un resto espaciador que comprende uno o más átomos, a un polímero soluble en agua, en el que el peso molecular promedio en peso del polímero soluble en agua está en el intervalo de 6000 daltons a 100000 daltons, en el que el conjugado no incluye más de 6 polímeros solubles en agua unidos covalentemente al resto de Factor IX y en el que el polímero soluble en agua que es polietilenglicol.
2. Un conjugado que comprende un resto de Factor IX unido covalentemente mediante un enlace amida, bien directamente o bien a través de un resto espaciador que comprende uno o más átomos, a un polímero no lineal soluble en agua en el que dicho polímero soluble en agua es polietilenglicol.
3. El conjugado de la reivindicación 1 ó de la reivindicación 2, en el que el poli(etilenglicol) está protegido terminalmente con un resto de protección terminal seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxilo, alcoxilo sustituido, alquinoxilo, alquinoxilo sustituido, ariloxilo, ariloxilo sustituido.
4. El conjugado de la reivindicación 1 ó de la reivindicación 2, en el que el poli(etilenglicol) está protegido terminalmente con metoxilo.
5. El conjugado de la reivindicación 1 ó de la reivindicación 2, en el que el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 10000 daltons a 85000 daltons.
6. El conjugado de la reivindicación 5, en el que el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 20000 daltons a 85000 daltons.
7. El conjugado de la reivindicación 1, en el que cada polímero soluble en agua es lineal.
8. El conjugado de la reivindicación 1, en el que cada polímero soluble en agua es ramificado.
9. El conjugado de la reivindicación 1 ó de la reivindicación 2, en el que el resto de Factor IX es Factor IX.
10. El conjugado de la reivindicación 9, en el que el resto de Factor IX es Factor IXa.
11. El conjugado de la reivindicación 1 ó de la reivindicación 2, en el que el resto de Factor IX está derivado recombinantemente.
12. El conjugado de la reivindicación 1 ó de la reivindicación 2, en el que el resto de Factor IX es derivado de la sangre.
13. El conjugado de la reivindicación 1 ó de la reivindicación 2, en el que no más de tres polímeros solubles en agua están unidos al resto de Factor IX.
14. Una composición que comprende una pluralidad de conjugados, en la que al menos el 80% de cada uno de todos los conjugados de la composición está compuesto por un resto de Factor IX unido covalentemente a uno, dos, tres o cuatro polímeros solubles en agua, cada polímero soluble en agua en el conjugado tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 6000 daltons a 90000 daltons, el resto de Factor IX está unido al polímero soluble en agua a través de un enlace amida directamente o a través de un resto espaciador compuesto de uno o más átomos y en la que dicho polímero soluble en agua se selecciona entre un poli(óxido de alquileo), poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), polioxazolona, poli(poliol oxietilado), alcohol poliolefinico, poli(hidroxiálquilmacrilamida), poli(hidroxiálquilmacrilato), polisacáridos, poli(α -hidroxiácido), polifosfazeno, polioxazolona, y poli(acriloilmorfolina).
15. Una composición que comprende una pluralidad de conjugados, en la que al menos el 85% de cada uno de todos los conjugados de la composición tiene de uno a tres polímeros solubles en agua unidos covalentemente a un resto de Factor IX; en la que cada polímero soluble en agua tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 6000 daltons a 90000 daltons, y en la que, para cada conjugado, el resto de Factor IX está unido a de uno a tres polímeros solubles en agua a través de un enlace amida directamente o a través de un resto espaciador compuesto de uno o más átomos y en la que el polímero soluble en agua se selecciona del grupo poli(óxido de alquileo), poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), polioxazolona, poli(poliol oxietilado), alcohol poliolefinico, poli(hidroxiálquilmacrilamida), poli(hidroxiálquilmacrilato), polisacáridos, poli(α -hidroxiácido), polifosfazeno, polioxazolona, y poli(acriloilmorfolina).
16. Una composición que comprende una pluralidad de conjugados del resto de Factor IX monoPEGilado, en la que al menos el 85% de todos los conjugados en la composición son conjugados del resto de Factor IX monoPEGilado, y en la que cada PEG en el conjugado del resto de Factor IX monoPEGilado tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 6000 daltons a 1000000 daltons y el resto de Factor IX está unido al PEG a través de un

enlace amida, directamente o a través de un resto espaciador compuesto de uno o más átomos.

- 5 17. La composición de la reivindicación 14 ó 15, en la que el polímero soluble en agua en cada conjugado se selecciona del grupo que consiste en un poli(óxido de alquileo), poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vínilico), polioxazolina, y poli(acrililmorfolina).
- 10 18. La composición de la reivindicación 17, en la que cada polímero soluble en agua es un poli(óxido de alquileo).
19. La composición de la reivindicación 18, en la que cada poli(óxido de alquileo) es un poli(etilenglicol).
- 20 20. La composición de la reivindicación 19, en la que el poli(etilenglicol) está protegido terminalmente con un resto de protección terminal seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alcoxi sustituido, alquenoxi, alquenoxi sustituido, alquinoxilo, alquinoxilo sustituido, ariloxi y ariloxi sustituido.
- 15 21. La composición de la reivindicación 19, en la que el poli(etilenglicol) está protegido terminalmente con metoxilo.
22. La composición de las reivindicaciones 14, 15 ó 16, en la que el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio en peso total en el intervalo de 10000 daltons a 85000 daltons.
- 20 23. La composición de la reivindicación 22, en la que el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio en peso total en el intervalo de 20000 daltons a 85000 daltons.
24. La composición de las reivindicaciones 14, 15 ó 16, en la que el resto de Factor IX es Factor IX.
- 25 25. La composición de la reivindicación 24, en la que el resto de Factor IX es Factor IXa.
26. La composición de la reivindicación 19, en la que el resto de Factor IX está derivado recombinantemente.
- 30 27. La composición de la reivindicación 19, en la que el resto de Factor IX es derivado de la sangre.
28. La composición de las reivindicaciones 14 ó 15, en la que no más de tres polímeros solubles en agua están unidos al resto de Factor IX.
- 35 29. La composición de la reivindicación 19, en la que la composición está básicamente libre de albúmina.
30. La composición de la reivindicación 19, en la que la composición está básicamente libre de proteínas que no tienen actividad de Factor IX.
- 40 31. La composición de la reivindicación 19, en la que la composición está básicamente libre de polímeros solubles en agua no unidos covalentemente.
32. La composición de la reivindicación 19, en forma liofilizada.
- 45 33. La composición de la reivindicación 19, en la forma de un líquido.
34. La composición de la reivindicación 19, que comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 50 35. Un método para la elaboración de un conjugado que comprende el contacto, en condiciones de conjugación, de un resto de Factor IX con un reactivo polimérico, en el que el conjugado comprende un resto de Factor IX unido covalentemente a través de un enlace amida, directamente o a través de un resto espaciador compuesto de uno o más átomos, a un polímero soluble en agua con un peso molecular promedio en peso de 6000 a 100000 daltons, en el que el conjugado no incluye más de 6 polímeros solubles en agua unidos individualmente al resto de Factor IX y en el que dicho polímero soluble en agua es poli(etilenglicol).
- 55 36. El método de la reivindicación 35, en la que no se añade alcohol adicional.
37. El método de la reivindicación 35, en la que no se lleva a cabo una etapa de oxidación.
- 60 38. La composición de la reivindicación 34 para su uso en un paciente que padece hemofilia B.
39. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 38 para la administración a un paciente dentro de los dos días anteriores a someterse a cirugía.

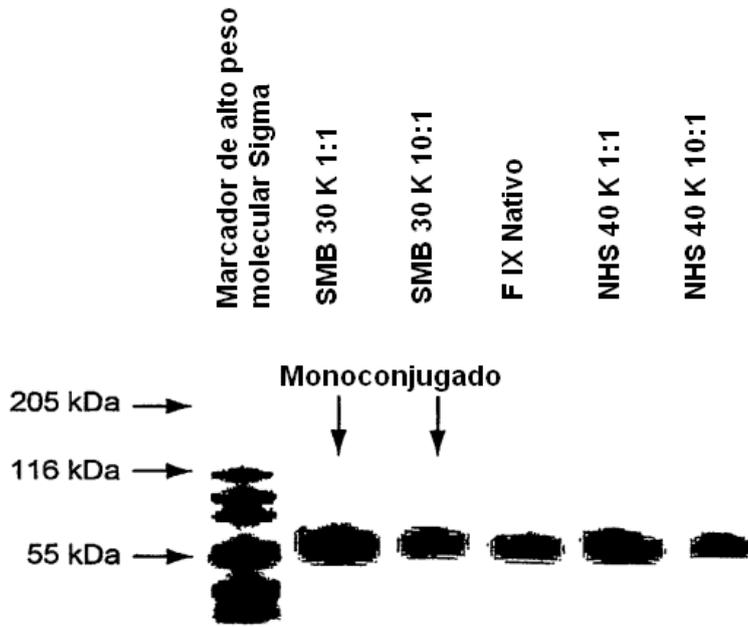


Figura 1

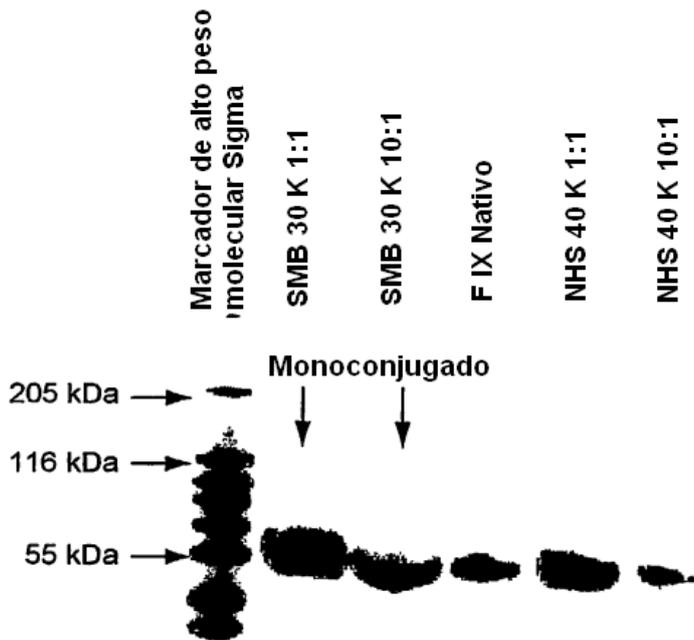


Figura 2

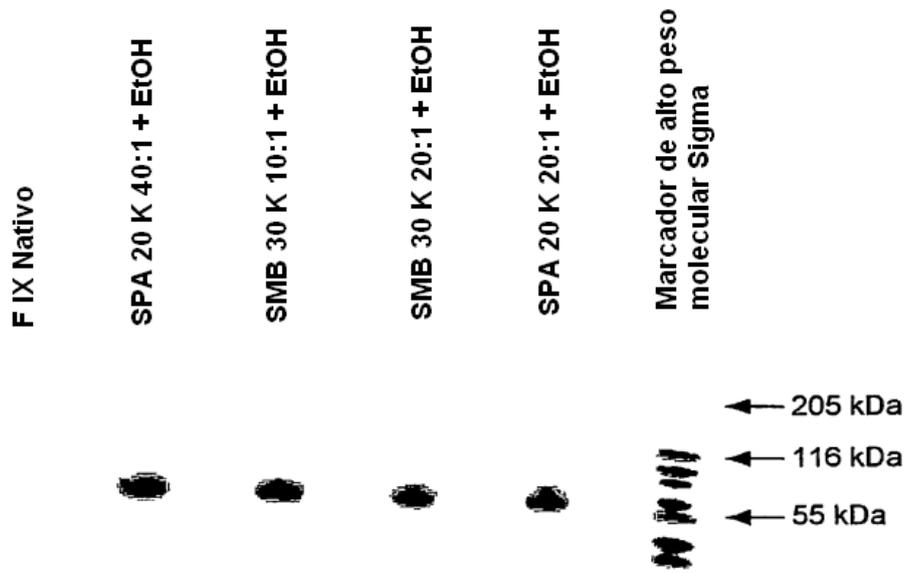


Figura 3

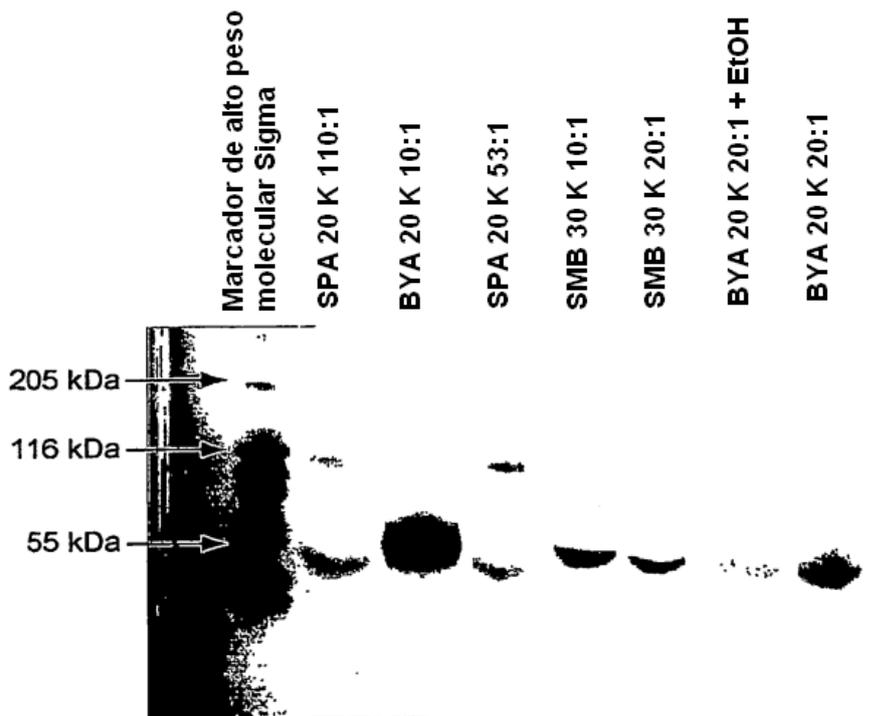


Figura 4

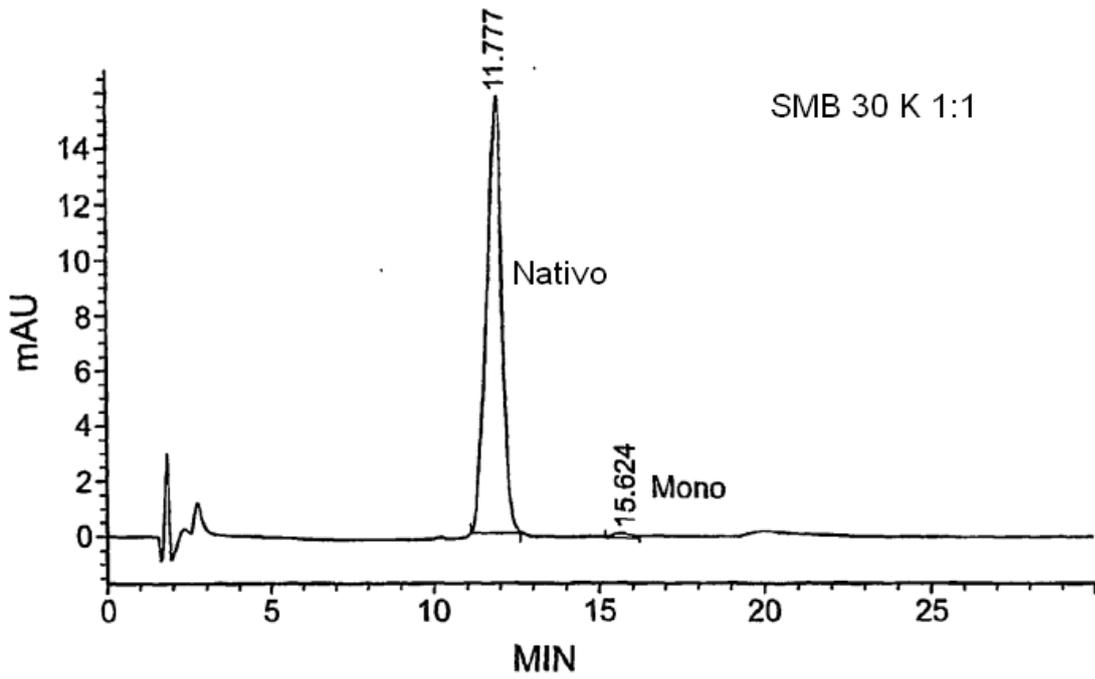


Figura 5

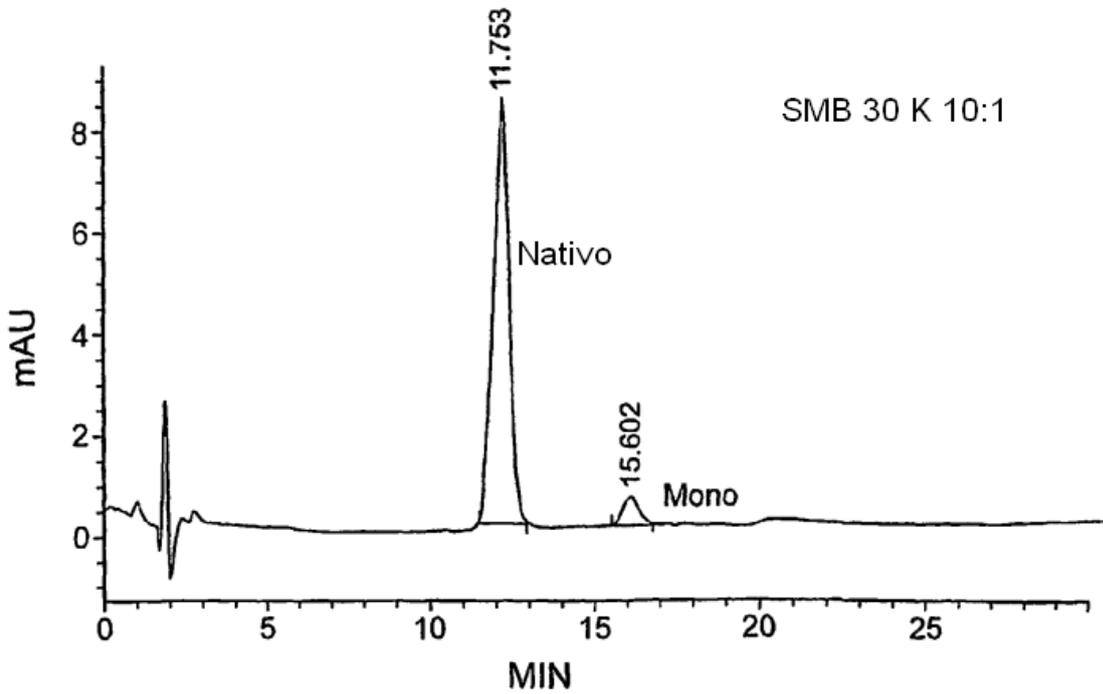


Figura 6

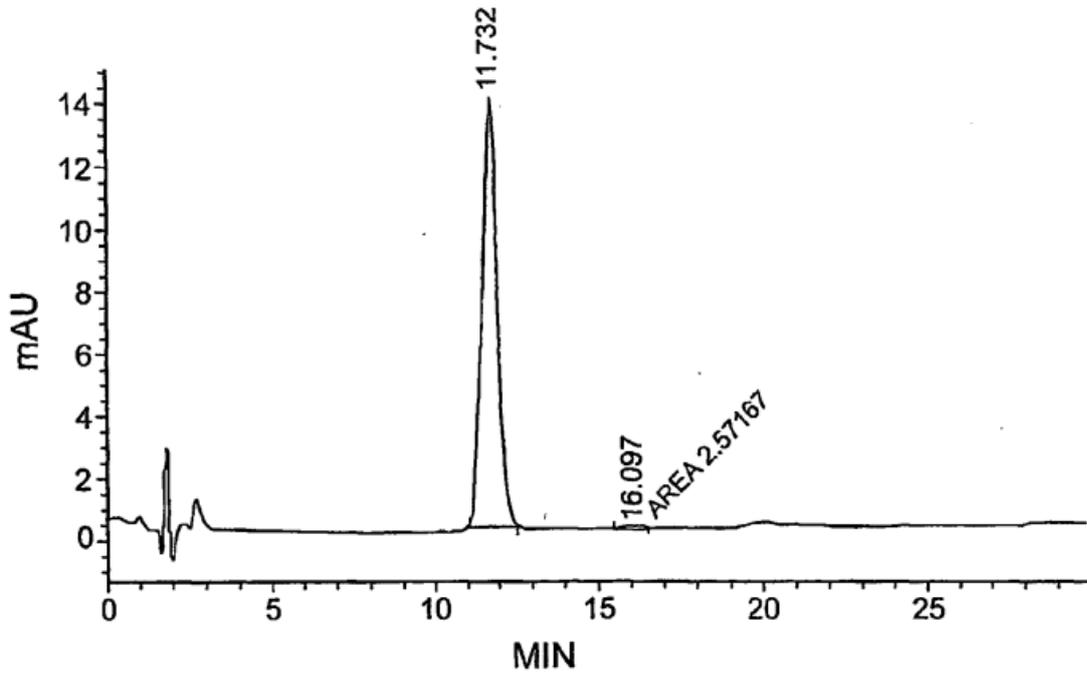


Figura 7

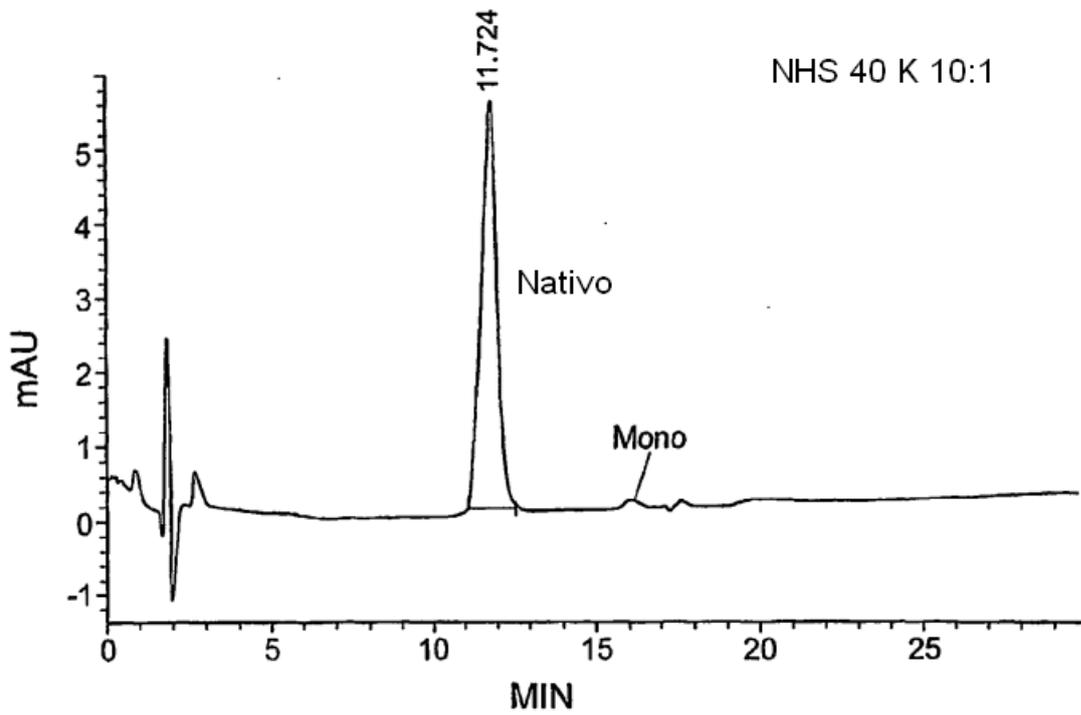


Figura 8

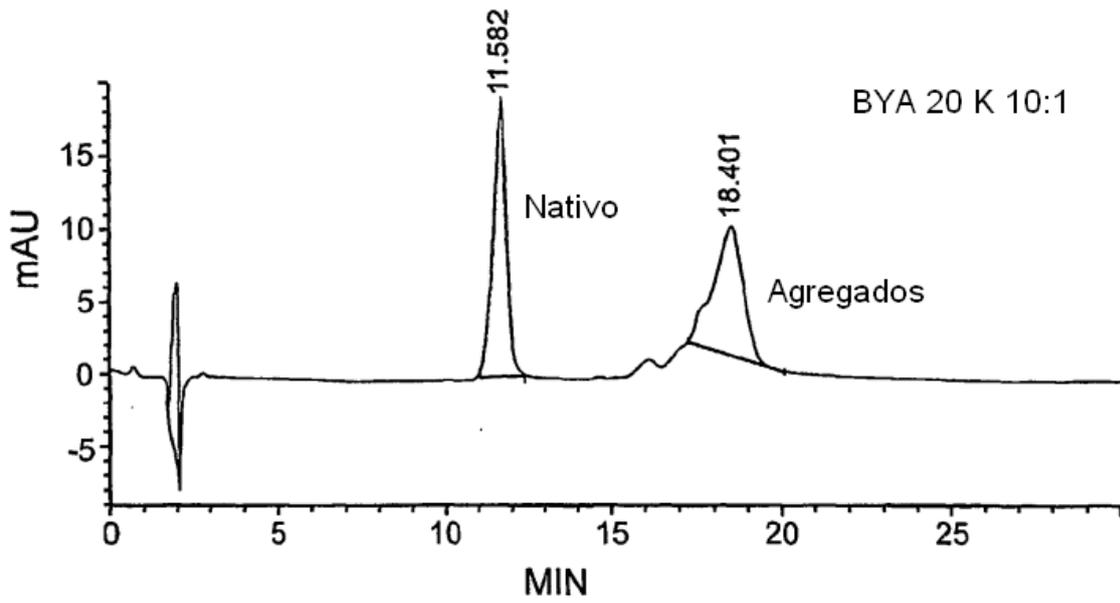


Figura 9

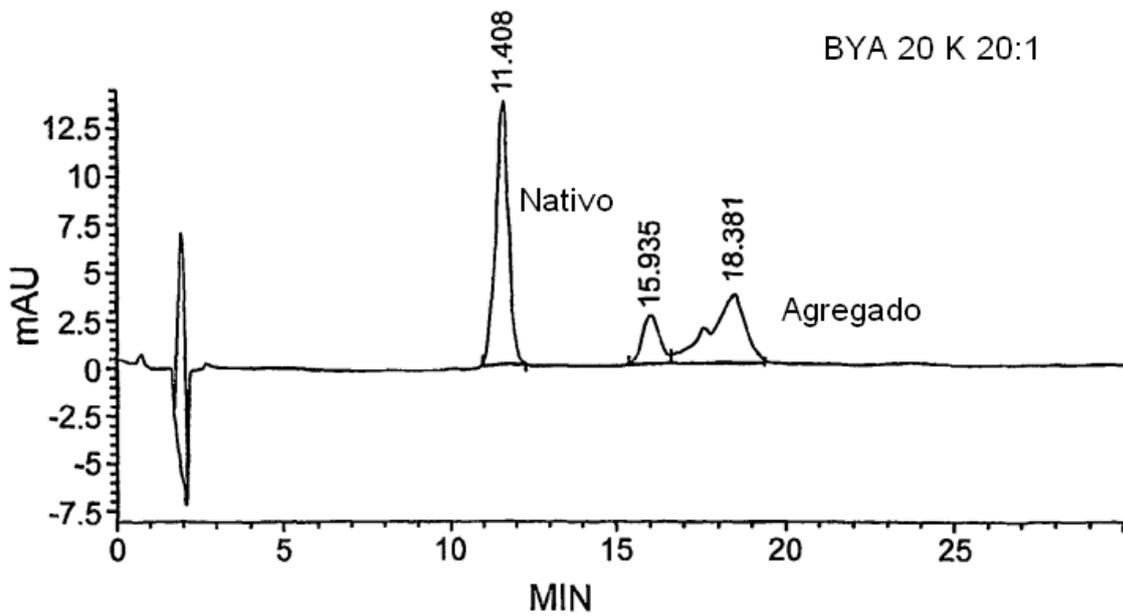


Figura 10

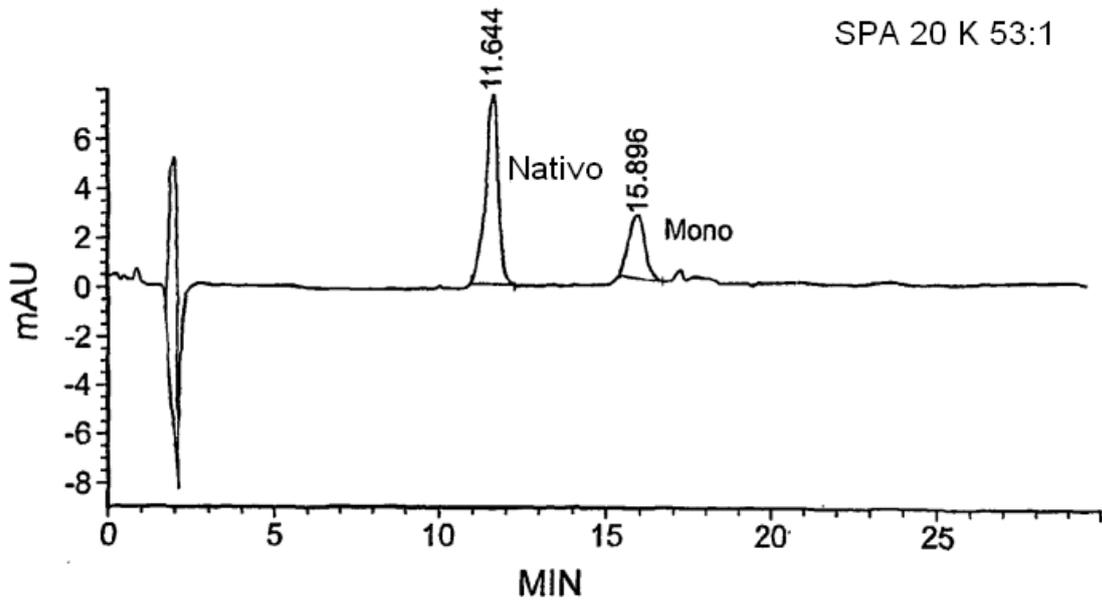


Figura 11

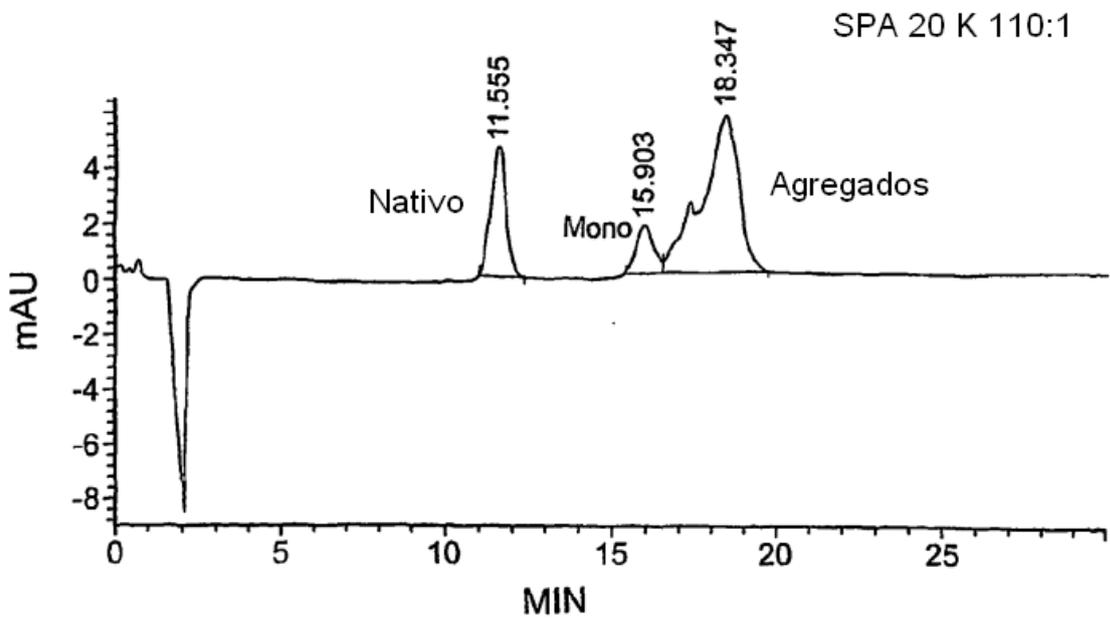


Figura 12