

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 035**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2005 E 05855442 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 1835938**

54 Título: **Conjugados de polímero-factor von Willebrand**

30 Prioridad:

27.12.2004 US 639244 P

04.04.2005 US 668378 P

15.04.2005 US 671901 P

26.05.2005 US 685086 P

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

13.12.2013

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)

Law Department, One Baxter Parkway

Deerfield, IL 60015, US y

BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHEIFLINGER, FRIEDRICH;

TURECEK, PETER y

SIEKMANN, JUERGEN

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 434 035 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 polímero-factor von Willebrand.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a métodos para prolongar la vida media *in vivo* del FVIII en la sangre de un mamífero que presenta una alteración hemorrágica asociada a defectos funcionales o deficiencias de al menos uno de entre el FVIII, y el FvW.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El FvW es una glucoproteína adhesiva multimérica presente en el plasma de los mamíferos que tiene múltiples funciones fisiológicas. Durante la hemostasia primaria, el FvW actúa como mediador entre receptores específicos sobre la superficie plaquetaria y los componentes de la matriz extracelular, tal como el colágeno. Además, el FvW actúa como proteína transportadora y estabilizadora para el FVIII procoagulante. El FvW se sintetiza en células endoteliales y megacariocitos como una molécula precursora de 2.813 aminoácidos. El polipéptido precursor, pre-pro-FvW, consiste en un péptido señal de 22 residuos, un pro-péptido de 741 residuos y el polipéptido de 2.050 residuos hallado en FvW de plasma maduro (Fischer y col., FEBS Lett. 351: 345-348, 1994). Después de su secreción en el plasma, el FvW circula en forma de diversas especies de diferente tamaño molecular. Estas moléculas de FvW consisten en oligómeros y multímeros de la subunidad madura de 2.050 residuos aminoácidos. El FvW se puede encontrar habitualmente en el plasma con tamaños desde un dímero hasta multímeros de 50 - 100 dímeros (Ruggeri y col. Thromb. Haemost. 82: 576-584, 1999). La vida media *in vivo* del FvW humano en el sistema circulatorio humano es de aproximadamente 12 a 20 horas. El FVIII tiene una vida media *in vivo* relativamente corta, aproximadamente 8 a 12 horas, lo que hace necesaria una readministración frecuente para el tratamiento de pacientes con alteraciones hemorrágicas asociadas a defectos funcionales o deficiencias de al menos uno de entre FVIII y FvW.

25 En el estado anterior de la técnica se ha descrito que el FvW recombinante (FvWr) producido en cultivos de células eucarióticas está más intacto y menos degradado proteolíticamente que el FvW derivado de plasma (Fischer y col., FEBS Lett. 375: 259-262, 1995). El documento EP 0 784 632 describe un método para aislar un FvW de alta pureza mediante la purificación de FvW recombinante utilizando una cromatografía de intercambio aniónico. En la técnica también se conocen métodos para producir a gran escala FvW homogéneo y estructuralmente intacto (Schlokot y col., Biotechnol. Appl. Biochem. 24: 257-267, 1996; Fischer y col., CMLS 53: 943-950, 1997). El FvW recombinante se ha caracterizado utilizando modelos caninos, murinos y porcinos de la enfermedad de von Willebrand (EvW) (Turecek y col., Blood 90: 3555-3567, 1997; Roussi y col., Blood Coag. Fibrinol. 9: 361-372, 1998; Schwarz y col., Haemophilia 4: 53-62, 1998; Schwarz y col., Semin. Thromb. Hemost. 28: 215-225, 2002). El documento WO 00/49047 describe un método para producir una preparación de FvW mediante el tratamiento de pro-FvW con trombina. El documento WO 98/25969 proporciona un método para purificar proteínas que se unen a FvW utilizando un FvWr inmovilizado sobre un vehículo. En el documento EP 0 977 584 se describe el uso farmacéutico de propéptidos de FvW (pro-FvW) derivado de plasma y recombinante para tratar trastornos de la coagulación sanguínea. El documento US 6.037.452 describe la unión de FVIII y factor IX (FIX) a un óxido de poli(alquileno) a través de un engarce o un agente de acoplamiento. El documento EP 0 774 261 demuestra que el uso de un FvW recombinante con una vida media biológica *in vivo* prolongada estabiliza el FVIII sanguíneo de un mamífero e induce la producción de FVIII endógeno. No obstante, existe la necesidad de aumentar aún más la vida media *in vivo* del FvW y el FVIII en pacientes con alteraciones hemorrágicas basadas en FvW y FVIII.

40 Ya es sabido que el FvW estabiliza el FVIII *in vivo* y, por consiguiente, desempeña un papel crucial en la regulación de los niveles de FVIII en plasma y siendo por ello un factor central para controlar la hemostasia primaria y secundaria. También es sabido que, después de la administración de productos terapéuticos que contienen FvW, se puede observar un aumento del FVIII:C endógeno de 1 a 3 unidades por ml en 24 horas, lo que demuestra el efecto de estabilización *in vivo* del FvW sobre el FVIII.

45 Existe una gran necesidad de una nueva sustancia para ampliar el espectro de tratamiento de deficiencias en el FVIII de coagulación, también conocidas como hemofilia A.

50 Así, la presente invención proporciona un nuevo sistema para prolongar la vida media *in vivo* del FVIII en la sangre de un mamífero. Otro objeto de la presente invención es proporcionar métodos para mejorar el tratamiento de alteraciones hemorrágicas asociadas a defectos funcionales o deficiencias de FVIII, de FvW o ambos.

55 Los documentos WO 97/11957, EP 1 258 497 y EP 1 260 582 dan a conocer en cada caso conjugados de un polipéptido y un polímero biocompatible y un proceso para su producción. El documento WO 94/15625 describe un FVIII modificado con PEG que tiene una vida media *in vivo* prolongada. El documento US 6.037.452 proporciona FVIII no inmunógeno de acción prolongada unido de forma covalente a un óxido de poli(alquileno), tal como PEG. El documento WO 2004/075923 describe conjugados de FVIII unido de forma covalente con uno a tres polímeros

solubles en agua. Lewis y col. (1994) Bioconjugate J, 5: 565-576, proporciona un método soluble en agua para la modificación de proteínas con DOTA.

5 Un primer aspecto de la invención proporciona un constructo proteínico que no está unido a Factor VIII (FVIII), para su uso en el tratamiento de una alteración hemorrágica asociada a defectos funcionales o deficiencias de FVIII, de FvW o ambos en un mamífero, mediante la prolongación de la vida media *in vivo* del FVIII endógeno en la sangre del mamífero; comprendiendo el constructo proteínico:

- 10 a) una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un precursor, subunidad o fragmento de FvW que tiene una actividad biológica de FvW determinada en un ensayo de cofactor de ristocetina o un ensayo de unión de colágeno, y dímeros y multímeros de los mismos; y
- 15 b) al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a dicha molécula de FvW; teniendo dicho constructo la capacidad de unirse a la molécula de FVIII endógena del mamífero y, cuando se administra al mamífero, la vida media *in vivo* del constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula de FvW, y la vida media *in vivo* de la molécula de FVIII endógena unida al constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula de FVIII unida a FvW y no unida con al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable.

20 Un segundo aspecto de la invención proporciona un constructo proteínico no unido a Factor VIII (FVIII) para su uso en el tratamiento de una alteración hemorrágica asociada a defectos funcionales o deficiencias de FVIII, FvW o ambos en un mamífero, mediante la prolongación de la vida media *in vivo* del FVIII o de un precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII en la sangre del mamífero; comprendiendo el constructo proteínico:

- 25 a) una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un precursor, subunidad o fragmento de FvW que tiene una actividad biológica del FvW determinada en un ensayo de cofactor de ristocetina o un ensayo de unión de colágeno, y dímeros y multímeros de los mismos; y
- b) al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a dicha molécula de FvW; administrándose al mamífero una primera dosis de al menos una molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII;

30 teniendo dicho constructo la capacidad de unirse a la molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII administrado y, cuando se administra al mamífero, la vida media *in vivo* del constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula de FvW, y la vida media *in vivo* de la molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII administrado unido a dicho constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula o precursor, subunidad o fragmento de FVIII unido a FvW y no unido con al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable.

35 Un tercer aspecto de la invención proporciona una molécula de FVIII o un precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII, para su uso en el tratamiento de una alteración hemorrágica asociada con defectos funcionales o deficiencias de FVIII, FvW o ambos en un mamífero, mediante la prolongación de la vida media *in vivo* del FVIII o de un precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII en la sangre del mamífero; administrándose al mamífero una primera dosis de al menos un constructo proteínico que no está unido a FVIII y que comprende:

- 40 a) una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un precursor, subunidad o fragmento de FvW que tiene una actividad biológica del FvW determinada en un ensayo de cofactor de ristocetina o un ensayo de unión de colágeno, y dímeros y multímeros de los mismos; y
- 45 b) al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a dicha molécula de FvW; teniendo dicho constructo la capacidad de unirse a la molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII administrado y, cuando se administra al mamífero, la vida media *in vivo* de dicho constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula de FvW, y la vida media *in vivo* de la molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII administrado unido al constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula o precursor, subunidad o fragmento de FVIII unido a FvW y no unido con al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable.

55 Un cuarto aspecto de la invención proporciona un complejo para su uso en el tratamiento de una alteración hemorrágica asociada a defectos funcionales o deficiencias de FVIII, de FvW o de ambos en un mamífero mediante la prolongación de la vida media *in vivo* del FVIII o de un precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII en la sangre del mamífero; comprendiendo el complejo:

un constructo proteínico que incluye

- 5 a) una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un precursor, subunidad o fragmento de FvW que tiene una actividad biológica del FvW determinada en un ensayo de cofactor de ristocetina o un ensayo de unión de colágeno, y dímeros y multímeros de los mismos; y
- b) al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a dicha molécula de FvW; y

una molécula de FVIII o un precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII, unido al constructo proteináceo;

10 donde, cuando se administra al mamífero, la vida media *in vivo* de dicho constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula de FvW, y la vida media *in vivo* de la molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII unido al constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula o precursor, subunidad o fragmento de FVIII unido a FvW y no unido con al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable.

15 Aquí también se describe un constructo proteináceo que comprende factor de von Willebrand (FvW) plasmático y/o recombinante o derivados biológicamente activos del mismo, estando unidos dicho FvW o dichos derivados biológicamente activos a una o más moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables, y prolongándose la vida media *in vivo* del constructo proteináceo en la sangre de un mamífero, en particular un humano. Además, aquí también se describe un complejo entre dicha constructo proteináceo y al menos una proteína de factor FVIII (FVIII) o un derivado biológicamente activo de la misma, prolongándose también la vida media *in vivo* de dicha proteína de FVIII o dicho derivado biológicamente activo de ésta en la sangre de un mamífero. Adicionalmente, aquí se describen composiciones farmacéuticas que contienen dicho constructo proteináceo o dicho complejo, y de acuerdo con la presente invención están previstos métodos para prolongar la vida media *in vivo* del FVIII en la sangre de un mamífero que presenta una alteración hemorrágica asociada con defectos funcionales o deficiencias de FVIII, de FvW o de ambos, utilizando dicho constructo proteináceo o dicho complejo. Aquí también se describen métodos para preparar el constructo proteináceo (por ejemplo en los siguientes puntos (i) a (ii))

- 25 i. Un método para formar un constructo proteináceo que comprende una molécula de FvW y una fracción de PEG unida de forma covalente a al menos un residuo carbohidrato en dicha molécula de FvW, comprendiendo:
- 30 a) proporcionar una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un derivado de FvW biológicamente activo, y dímeros y multímeros de los mismos;
- b) oxidar los residuos carbohidrato de dicha molécula de FvW;
- 35 c) poner en contacto dichos residuos carbohidrato con un reactivo PEG que contiene un grupo hidrazida; y
- d) permitir que la hidrazida del reactivo PEG se una de modo covalente con al menos un residuo carbohidrato en dicho FvW para formar el citado constructo, incrementándose la vida media *in vivo* del constructo en comparación con la vida media *in vivo* de una molécula de FvW, y pudiendo unirse dicho constructo con al menos una molécula de FVIII o un derivado de FvW biológicamente activo.
- 40 ii. Un método para formar un constructo proteináceo que comprende una molécula de FvW y una fracción de PEG unida de forma covalente con al menos un grupo amino primario de dicha molécula de FvW, comprendiendo:
- 45 a) proporcionar una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un derivado de FvW biológicamente activo, y dímeros y multímeros de los mismos;
- b) poner en contacto el citado grupo amino primario de dicha molécula de FvW con un reactivo PEG; y
- 50 c) permitir que dicho reactivo PEG se una de modo covalente con dicho grupo amino primario en el FvW para formar así el constructo, incrementándose la vida media *in vivo* del constructo en comparación con la vida media *in vivo* de una molécula de FvW, y pudiendo unirse dicho constructo con al menos una molécula de FVIII o un derivado de FvW biológicamente activo.
- 55 iii. Un método para formar un constructo proteináceo que comprende una molécula de FvW y una fracción de PEG unida de forma covalente con al menos un grupo amino primario mediante aminación reductora en dicha molécula de FvW, comprendiendo:
- a) proporcionar una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un derivado de FvW biológicamente activo, y dímeros y multímeros de los mismos;
- 60 b) poner en contacto residuos de lisina de dicha molécula de FvW con un reactivo PEG que contiene un grupo aldehído para formar una base de Schiff en solución;
- c) poner en contacto dicha solución con un agente reductor para obtener una amina secundaria; y

- d) permitir que el reactivo de PEG se una de modo covalente a dicha molécula de FvW para formar el constructo, incrementándose la vida media *in vivo* de dicho constructo en comparación con la vida media *in vivo* de una molécula de FvW, y pudiendo unirse dicho constructo con al menos una molécula de factor VIII (FVIII) o un derivado de FvW biológicamente activo.
- 5
- iv. Un método para formar un constructo proteínico que comprende una molécula de FvW y una fracción de PEG unida de forma covalente con al menos un residuo de lisina en dicha molécula de FvW, comprendiendo:
- 10
- a) proporcionar una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un derivado de FvW biológicamente activo, y dímeros y multímeros de los mismos;
- b) poner en contacto residuos de lisina de dicha molécula de FvW con un reactivo PEG que contiene un grupo aldehído para formar una base de Schiff en solución;
- 15
- c) poner en contacto dicha solución con un agente reactivo para formar una amina secundaria; y
- d) permitir que dicho reactivo de PEG se una de modo covalente a la molécula de FvW para formar así el constructo, incrementándose la vida media *in vivo* de dicho constructo en comparación con la vida media *in vivo* de una molécula de FvW, y pudiendo unirse el constructo a al menos una molécula de factor VIII (FVIII) o un derivado de FvW biológicamente activo.
- 20
- v. Un método para formar un constructo proteínico que comprende una molécula de FvW y una fracción de PEG unida de forma covalente con al menos un grupo sulfhidrilo libre o generado en dicha molécula de FvW, comprendiendo:
- 25
- a) proporcionar una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un derivado de FvW biológicamente activo, y dímeros y multímeros de los mismos;
- b) poner en contacto dicho grupo sulfhidrilo de la molécula de FvW con un reactivo PEG que contiene un grupo maleimida; y
- 30
- c) permitir que dicho reactivo de PEG se una de modo covalente con al menos un grupo sulfhidrilo de dicha molécula de FvW para formar así el constructo, incrementándose la vida media *in vivo* del constructo en comparación con la vida media *in vivo* de una molécula de FvW, y pudiendo unirse dicho constructo con al menos una molécula de factor VIII (FVIII) o un derivado de FvW biológicamente activo.
- 35
- vi. Un método para formar un constructo proteínico que comprende una molécula de FvW y una fracción de PEG unida de forma covalente con al menos un grupo carboxilo de dicha molécula de FvW, comprendiendo:
- 40
- a) proporcionar una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un derivado de FvW biológicamente activo, y dímeros y multímeros de los mismos;
- b) poner en contacto grupos carboxilo de dicha molécula de FvW con un reactivo de PEG que contiene un grupo amino y carbodiimida soluble en agua para formar un enlace amida; y
- 45
- c) permitir que dicha fracción de PEG se una de modo covalente con dicho FvW para formar así el constructo, incrementándose la vida media *in vivo* de dicho constructo en comparación con la vida media *in vivo* de una molécula de FvW, y pudiendo unirse el constructo con al menos una molécula de FVIII o un derivado de FvW biológicamente activo.
- vii. Un método para formar un constructo proteínico que comprende una molécula de FvW y una fracción de PEG unida de forma covalente con dicha molécula de FvW, no estando unida dicha fracción de PEG con el sitio de unión de FVIII de la molécula de FvW, comprendiendo:
- 50
- a) proporcionar una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un derivado de FvW biológicamente activo, y dímeros y multímeros de los mismos;
- b) poner en contacto el sitio de unión de FVIII de dicha molécula de FvW con un agente protector del sitio de unión de factor VIII, formando así una molécula de FvW con un sitio de unión de FVIII protegido;
- 55
- c) poner en contacto un sitio reactivo de la molécula de FvW del paso b) con un reactivo de PEG;
- d) permitir que dicho reactivo de PEG se una de modo covalente con dicha molécula de FvW; y
- e) separar dicho agente protector del sitio de unión de factor VIII de la molécula de FvW para formar así el constructo, incrementándose la vida media *in vivo* de dicho constructo en comparación con la vida media *in vivo* de una molécula de FvW, y pudiendo unirse el constructo con al menos una molécula de factor VIII (FVIII) o un derivado de FvW biológicamente activo.
- 60
- viii. Un método para formar un constructo proteínico que comprende una molécula de FvW y una fracción de ácido polisialílico (APS) reticulada de forma covalente con dicha molécula de FvW, comprendiendo:

- 5 a) proporcionar una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un derivado de FvW biológicamente activo, y dímeros y multímeros de los mismos;
- 5 b) poner en contacto dicha molécula de FvW con una solución que contiene APS y glutaraldehído; y
- 5 c) permitir que dicho APS se reticule de forma covalente con el FvW para formar así el constructo, incrementándose la vida media *in vivo* de dicho constructo en comparación con la vida media *in vivo* de una molécula de FvW, y pudiendo unirse el constructo con al menos una molécula de FVIII o un derivado de FvW biológicamente activo.
- 10 ix. Un método para formar un constructo proteináceo que comprende una molécula de FvW y una fracción de APS unida de forma covalente con al menos un residuo carbohidrato de dicha molécula de FvW, comprendiendo:
- 15 a) proporcionar una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un derivado de FvW biológicamente activo, y dímeros y multímeros de los mismos;
- 15 b) oxidar residuos de carbohidrato de dicha molécula de FvW;
- 20 c) poner en contacto dichos residuos carbohidrato con un reactivo de APS que contiene un grupo de hidrazida; y
- 20 d) permitir que el reactivo de APS se una de forma covalente con al menos un residuo carbohidrato de dicho FvW para formar así el constructo, incrementándose la vida media *in vivo* de dicho constructo en comparación con la vida media *in vivo* de una molécula de FvW, y pudiendo unirse el constructo con al menos una molécula de FVIII o un derivado de FvW biológicamente activo.
- 25 x. Un método para formar un constructo proteináceo que comprende una molécula de FvW y una fracción de ácido hialurónico (AH) unida de forma covalente con al menos un residuo de lisina de dicha molécula de FvW, comprendiendo:
- 30 a) proporcionar una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un derivado de FvW biológicamente activo, y dímeros y multímeros de los mismos;
- 30 b) poner en contacto una solución de AH con un agente oxidante para formar un AH activado;
- 35 c) poner en contacto dicha molécula de FvW con el AH activado para formar así el constructo, incrementándose la vida media *in vivo* de dicho constructo en comparación con la vida media *in vivo* de una molécula de FvW, y pudiendo unirse el constructo con al menos una molécula de factor FVIII o un derivado de FvW biológicamente activo.
- 35 xi. Un método para formar un constructo proteináceo que comprende una molécula de FvW y una fracción de PEG unida de forma covalente con al menos un residuo carbohidrato de dicha molécula de FvW, comprendiendo:
- 40 a) proporcionar una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un derivado de FvW biológicamente activo, y dímeros y multímeros de los mismos;
- 45 b) poner en contacto un grupo carbohidrato de dicha molécula de FvW con una enzima oxidante para formar una fracción carbohidrato oxidada en dicho FvW;
- 45 c) poner en contacto la fracción de carbohidrato oxidada del FvW con un reactivo PEG que contiene un grupo hidrazida; y
- 50 d) permitir que dicha fracción de PEG se una de modo covalente con dicho FvW para formar así el constructo, incrementándose la vida media *in vivo* de dicho constructo en comparación con la vida media *in vivo* de una molécula de FvW, y pudiendo unirse el constructo con al menos una molécula de FVIII o un derivado de FvW biológicamente activo.
- 50 xii. Un método para formar un constructo proteináceo que comprende una molécula de FvW y una fracción de PEG unida de forma covalente con dicha molécula de FvW, comprendiendo:
- 55 a) proporcionar una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un derivado de FvW biológicamente activo, y dímeros y multímeros de los mismos;
- 55 b) poner en contacto dicha molécula de FvW con un reactivo de PEG para formar una solución;
- 60 c) disponer dicha solución en una cámara de perfusión, creándose un esfuerzo de cizalladura en dicha molécula de FvW mediante el uso de una bomba peristáltica; y
- 60 d) permitir que dicho reactivo de PEG se una de forma covalente con dicho FvW para formar así el constructo, incrementándose la vida media *in vivo* de dicho constructo en comparación con la vida media *in vivo* de una molécula de FvW, y pudiendo unirse el constructo con al menos una molécula de FVIII o un derivado de FvW biológicamente activo.

65 Un aspecto de la presente invención se refiere al uso de un constructo proteináceo (también denominado en adelante "conjugado polímero-FvW) que comprende FvW plasmático y/o recombinante o derivados biológicamente activos del mismo, estando unidos dicho FvW o dichos derivados biológicamente activos del mismo con uno o más

tipos de moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables, prolongándose la vida media *in vivo* de dicho FvW o dichos derivados biológicamente activos del mismo en la sangre de un mamífero.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar el uso de un conjugado polímero-FvW que sigue dos mecanismos farmacológicos principales y el uso de formas de tales conjugados polímero-FvW que presentan características entre dichas dos formas. Una forma porta de forma estable el polímero conjugado con FvW y será eliminada como una molécula integral con el paso del tiempo después de su administración a un mamífero. La otra forma se caracteriza por la reversibilidad del polímero conjugado con FvW. Después de ser administradas a un mamífero, las moléculas poliméricas unidas a FvW se liberarán gradualmente del FvW y el FvW no conjugado estará disponible como agente funcional farmacológico. Las características de liberación dependerán de la química de conjugación y de la composición y la estructura de las moléculas poliméricas unidas al FvW.

Los conjugados de polímero-FvW se combinan de forma útil con FVIII para estabilizar el FVIII e incrementar así su vida media. Cuando el conjugado se prepara para unirse al FVIII y estabilizar éste, el grado o nivel de polímero unido al FvW se prevé de modo que no interfiera con la región de unión del FvW. Tal como se mostrará en los ejemplos, es posible lograr una conjugación satisfactoria del polímero con el FvW sin interferir en la capacidad de unión del FvW y el FVIII. También es posible controlar el grado de conjugación del polímero para mantener la actividad del FvW y al mismo tiempo mantener también la capacidad del FvW para unirse al FVIII. Así, los conjugados polímero-FvW proporcionan un FvW terapéuticamente activo y al mismo tiempo estabilizan el FVIII incrementando su vida media.

Las moléculas de FvW y FVIII útiles para la presente invención incluyen las proteínas de longitud completa, sus precursores, subunidades o fragmentos de la proteína, así como derivados funcionales de los mismos. La referencia a FvW y FVIII o FVIII incluye todas las formas potenciales de estas proteínas.

Tal como se utiliza aquí, la expresión "derivado biológicamente activo" incluye cualquier derivado de una molécula que tenga esencialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas que dicha molécula, como las propiedades de unión, y/o la misma base estructural, como un esqueleto peptídico o una unidad polimérica básica.

El FvW útil para la presente invención incluye todas las formas potenciales, incluyendo aquellas monoméricas y multiméricas. Una forma particularmente útil de FvW son homo-multímeros de al menos dos FvW. Las proteínas de FvW pueden consistir en un derivado biológicamente activo o, cuando se utiliza únicamente como un estabilizador para el FVIII, el FvW puede ser una forma biológicamente inactiva. También se ha de entender que la presente invención puede incluir diferentes formas de FvW para su uso en combinación. Por ejemplo, una composición útil para la presente invención puede incluir diferentes multímeros, diferentes derivados y tanto derivados biológicamente activos como derivados biológicamente inactivos. En la hemostasia primaria, el FvW sirve como puente entre las plaquetas y componentes específicos de la matriz extracelular, como colágeno. La actividad biológica del FvW en este proceso se puede medir mediante dos ensayos *in vitro* diferentes (Turecek y col., Semin. Thromb. Hemost. 28:149-160, 2002). El ensayo de cofactor de ristocetina se basa en la aglutinación de plaquetas frescas o fijadas con formalina inducida por el antibiótico ristocetina en presencia de FvW. El grado de aglutinación plaquetario depende de la concentración de FvW y se puede medir por el método turbidimétrico, por ejemplo usando de un agregómetro (Weiss y col., J. Clin. Invest. 52: 2708-2716, 1973; Macfarlane y col., Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 306-308, 1975). El segundo método es el ensayo de unión de colágeno, que se basa en la tecnología ELISA (Brown y Bosak, Thromb. Res. 43: 303-311, 1986; Favaloro, Thromb. Haemost. 83: 127-135, 2000). Una placa de microtitulación se reviste con colágeno de tipo I o III. Después, el FvW se une a la superficie de colágeno y a continuación se detecta con un anticuerpo policlonal marcado con una enzima. El último paso es la reacción del sustrato, que se puede controlar fotométricamente con un lector ELISA.

Tal como se utiliza aquí, la expresión "FvW derivado de plasma (FvWdp)" incluye todas las formas de la proteína halladas en la sangre, incluyendo el FvW maduro obtenido de un mamífero que tiene la propiedad de estabilizar *in vivo*, por ejemplo por unión, al menos una molécula de FVIII. No obstante, la invención no se limita al FvW maduro. Un derivado biológicamente activo de dicho FvWp es el pro-FvW, que contiene el propéptido. Otras formas de FvW útiles para la presente invención incluyen el constructo proteináceo que comprende FvW inmaduro, incluyendo la molécula de FvW precursor (pre-pro-FvW) sintetizada por células endoteliales y megacariocitos, y/o el propéptido de FvW (pro-FvW) y/o FvWdp maduro obtenido tras división del péptido de señal y el pro-péptido, respectivamente, de la molécula precursora. Otros ejemplos de derivados biológicamente activos de FvWdp incluyen profármacos que se procesan o convierten en sus formas biológicamente activas, o que son biológicamente activos como tales, formas truncadas, formas con deleciones, sustituciones, adiciones aparte de proformas, fragmentos de la forma madura, formas quiméricas y formas con modificaciones post-traducción en comparación con la forma natural. El FvWdp útil para la presente invención también incluye formas biológicamente inactivas. Esto se puede llevar a cabo mediante modificación del FvW maduro u otras formas naturales halladas en la sangre. La fuente de FvW útil para la invención es un mamífero, incluyendo mamíferos porcinos y humanos.

Tal como se utiliza aquí, la expresión "FvW recombinante (FvWr)" incluye un FvW obtenido a través de tecnología de ADN recombinante. Una forma de FvWr útil tiene al menos la propiedad de estabilizar *in vivo*, por ejemplo por unión, al menos una molécula de FVIII, y de presentar opcionalmente un patrón de glicosilación farmacológicamente

- aceptable. Ejemplos específicos incluyen FvW sin dominios A2, por consiguiente resistente a la proteólisis (Lankhof y col., *Thromb. Haemost.* 77: 1008-1013, 1997), el fragmento de FvW desde Val 449 a Asn 730 incluyendo el dominio de unión de Ib y sitios de unión para colágeno y heparina (Pietu y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 1339-1347, 1989). La determinación de la estabilización de al menos una molécula de FVIII se puede llevar a cabo en mamíferos con deficiencia de FvW de acuerdo con métodos conocidos en el estado actual de la técnica. Por ejemplo, tal como se describe más abajo en el Ejemplo 8, ratones deficientes en FvW se someten a tratamiento intravenoso con FvW a través de la vena caudal, realizándose un seguimiento del nivel de actividad de FVIII en su plasma con el tiempo. El nivel de actividad de FVIII se puede medir, por ejemplo, mediante un ensayo cromogénico, tal como se publica en la Farmacopea Europea (Ph. Eur., 3ª Ed. 1997:2.7.4).
- 5
- 10 La muestra que contiene FVIII (FVIII:C) se mezcla con trombina, factor IX activado (FIXa), fosfolípidos y factor X (FX) en un tampón que contiene calcio. El FVIII es activado por la trombina y a continuación forma un complejo con los fosfolípidos, FIXa e iones calcio. Este complejo activa el FX produciendo FXa, que a su vez divide el sustrato cromogénico (por ejemplo (AcOH*CH₃OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA). El curso temporal de la para-nitroanilina (pNA) liberada se mide a 405 nm. La pendiente de la reacción es proporcional a la concentración de FVIII en la muestra.
- 15 El FvWr de la presente invención se puede producir mediante cualquier método conocido en la técnica. En el documento WO86/06096 publicado el 23 de octubre de 1986, y la Solicitud de Patente US 07/559.509, del 23 de julio de 1990 a nombre de Ginsburg y col., dan a conocer un ejemplo específico. Esto puede incluir cualquier método conocido en la técnica para (i) producir ADN recombinante por ingeniería genética, por ejemplo a través de transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) introducir ADN recombinante en células procarióticas o eucarióticas por transfección, por ejemplo por electroporación o microinyección, (iii) cultivar dichas células transformadas, por ejemplo de forma continua o discontinua, (iv) expresar FvW, por ejemplo de forma constitutiva o tras inducción y (v) aislar dicho FvW, por ejemplo desde el medio de cultivo o recolectando las células transformadas, con el fin de (vi) obtener FvWr purificado, por ejemplo por cromatografía de intercambio aniónico o de afinidad.
- 20
- 25 El FvWr se puede producir mediante la expresión en un sistema huésped procariótico o eucariótico adecuado que produzca moléculas de FvW farmacológicamente aceptables. Las células eucarióticas son por ejemplo células de mamífero, como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2. No existe ninguna limitación particular en cuanto a los reactivos o condiciones utilizados para producir o aislar FvW de acuerdo con la presente invención y se puede emplear cualquier sistema conocido en la técnica o comercialmente disponible. En una realización preferente de la presente invención, el FvWr se obtiene mediante los métodos descritos en el estado actual de la técnica.
- 30
- Para preparar el FvWr se puede utilizar una gran variedad de vectores, que se pueden seleccionar entre vectores de expresión eucarióticos o procarióticos. Ejemplos de vectores para la expresión procariótica incluyen plásmidos, como pRSET, pET, pBAD, etc., incluyendo los promotores utilizados en los vectores de expresión procarióticos lac, trc, trp, recA, araBAD, etc. Ejemplos de vectores para la expresión eucariótica incluyen: (i) para la expresión en levadura, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, utilizando promotores como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii) para la expresión en células de insecto, vectores como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., utilizando promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., y (iii) para la expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas virales como virus Vaccinia, adenovirus asociados, virus herpes, retrovirus, etc., utilizando promotores como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y β-actina.
- 35
- 40 El FVIII útil en la presente invención incluye aquellas formas que son biológicamente activas, incluyendo el FVIII de longitud completa, y cualquier capacidad derivada para actuar como un cofactor en la activación de Fx de coagulación y la capacidad de formar un complejo con FvW. El FVIII utilizado de acuerdo con la presente invención puede consistir en un FVIII derivado de plasma (FVIII_{dp}) o un FVIII recombinante (FVIII_r) o derivados biológicamente activos de éstos. El FVIII_{dp} y el FVIII_r se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica. El FVIII_{dp} se puede purificar por cualquier medio adecuado. En la Patente US 5.470.954, que se incorpora aquí por referencia, se describe un método útil. Las proteínas de FVIII_r se pueden preparar por cualquier medio adecuado. Ejemplos de este FVIII_r incluyen RECOMBIMATE y ADVATE, ambos fabricados y vendidos por Baxter Healthcare Corporation; REFACTO, una forma de FVIII con delección del dominio B fabricado y vendido por Wyeth Corporation; y KOGENATE, fabricado y vendido por Bayer Corporation. En las Patentes US 4.757.006, 4.965.199 y 5.618.788 se describen métodos y ejemplos de FVIII_r.
- 45
- 50 Tal como se utiliza aquí, la expresión "polímero fisiológicamente aceptable" incluye polímeros que son solubles en solución o suspensión acuosa y que no tienen ningún impacto negativo, por ejemplo efectos secundarios, para el mamífero después de la administración del conjugado polímero-FvW en una cantidad farmacéuticamente eficaz. No existe ninguna limitación particular en cuanto al polímero fisiológicamente aceptable utilizado de acuerdo con la presente invención. Los polímeros se caracterizan normalmente por poseer preferentemente de 2 a aproximadamente 300 unidades repetidas. Ejemplos de estos polímeros incluyen, de forma no exclusiva, poli(alquilenglicoles) como polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxetilado), alcohol poli(olefínico), poli(vinilpirrolidona),
- 55

poli(hidroxiálquilmecrilamida), poli(hidroxiálquilmecrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácidos), alcohol poli(vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina, y combinaciones de cualesquiera de los mismos.

5 El polímero fisiológicamente aceptable no está limitado a ninguna estructura particular, pudiendo ser lineal (por ejemplo alcoxi PEG o PEG bifuncional), ramificado o con múltiples brazos (por ejemplo PEG en horquilla o PEG unido a un núcleo poliol), dendrítico o con enlaces degradables. Además, la estructura interna del polímero se puede organizar en cualquier cantidad de patrones diferentes y se puede seleccionar de entre el grupo consistente en homopolímero, copolímero alternante, copolímero aleatorio, copolímero en bloque, tripolímero alternante, tripolímero aleatorio y tripolímero en bloque.

10 Estos polímeros también incluyen óxido de poli(alquileo), ácido poli(maleico), poli(DL-alanina), como carboximetilcelulosa, dextrano, ácido hialurónico y quitina, y poli(met)acrilatos.

15 En una realización de la presente invención, el polímero fisiológicamente aceptable es PEG y sus derivados. La cadena lateral de PEG puede ser lineal, ramificada, en horquilla o puede consistir en múltiples brazos. No existe ninguna limitación específica en cuanto al PEG utilizado de acuerdo con la presente invención. Un PEG particularmente útil es aquel de un peso molecular entre 3.000 y 20.000. Existen diversas moléculas de PEG útiles de dominio público, es decir, que nunca han sido patentadas o que actualmente están caducadas. Por ejemplo, en los documentos WO 03/040211, US 6.566.506, US 6.864.350 y US 6.455.639 se dan a conocer otras moléculas de PEG útiles.

20 En otra realización de la presente invención, el polímero fisiológicamente aceptable es ácido polisialico (APS) y sus derivados. El APS se puede unir a FvW mediante el método descrito en el documento US 4.356.170, que se incorpora aquí por referencia. En una realización de la invención, el compuesto polisacárido puede ser un polisacárido natural, un derivado de un polisacárido natural o un derivado natural de un polisacárido. La parte polisacárido del compuesto tiene más de 5, normalmente al menos 10, y en otra realización entre al menos 20 y 50 residuos de ácido siálico en la cadena polimérica. Ciertos compuestos polisacárido fácilmente disponibles pueden tener hasta 500 residuos sacárido en total, pero normalmente tienen menos de 300 residuos en la cadena polimérica. En general, todos los residuos sacárido en el compuesto son de ácido siálico.

30 Al menos la parte ácido polisialico del compuesto de polisacárido, y en una realización todo el compuesto, es altamente hidrófila. El carácter hidrófilo lo aportan principalmente los grupos carboxilo laterales de las unidades ácido siálico, así como los grupos hidroxilo. La unidad sacárido puede contener otros grupos funcionales, como grupos amina, hidroxilo o sulfato, o combinaciones de éstos. Estos grupos pueden estar presentes en los compuestos sacárido naturales o se pueden introducir en compuestos polisacárido derivados.

35 Compuestos polisacárido de uso particular para la invención son aquellos producidos por bacterias. Algunos de estos polisacáridos naturales se conocen como glicolípidos. Esto resulta particularmente ventajoso si los compuestos polisacárido están esencialmente libres de unidades de galactosa terminales, que tienden a ser reconocidas por los receptores de galactosa de los hepatocitos y las células de Kupffer.

40 Los multímeros de FvW se pueden unir de forma covalente a los compuestos polisacárido mediante cualquiera de diversas técnicas conocidas por los especialistas. Como ejemplos se incluyen la unión a través del enlace peptídico entre un grupo carboxílico del FvW o el polisacárido y un grupo amina del otro, o un enlace éster entre un grupo carboxilo de uno y un grupo hidroxilo del otro. Alternativamente se puede formar una base de Schiff entre un grupo amino de uno y un grupo aldehído de otro. Otros mecanismos de unión están dentro de las capacidades normales de los especialistas en la técnica. En la Patente US 5.846.951, columna 7, línea 15, a columna 8, línea 5, se identifican diversos ejemplos.

45 Tal como se utiliza aquí, la referencia a FvW unido a una o más moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables incluye cualquier unión química adecuada, por ejemplo unión covalente o no covalente, como interacciones iónicas, hidrófobas, de afinidad o de bioafinidad. El polímero también se puede acoplar a la proteína empleando reactivos bifuncionales y a través de un brazo separador. Además, la molécula polimérica se puede acoplar al FvW mediante interacción de afinidad. Por ejemplo, el FvW puede biotinilarse y después se pueden unir a éste polímeros conjugados con avidina o estreptavidina. Además, también es posible unir anticuerpos anti-FvW policlonales o monoclonales y fragmentos de los mismos a un polímero, para unir después este complejo al FvW. También se pueden unir polímeros al FvW mediante métodos enzimáticos, por ejemplo la transferencia de sacáridos con poliglicosiltransferasa tal como se da a conocer en el documento US 6.379.933 o la glicopegilación tal como se da a conocer en el documento US 2004 0132640 A1. Otro método es la unión de polímeros al FvW en base a su función biológica, como la unión de colágenos o fragmentos de colágeno PEGilados a los dominios A1 y A3 del FvW. Con este fin se pueden utilizar colágenos de tipo I y III, por ejemplo de placenta humana, que muestran una fuerte interacción con el FvW. La unión de los polímeros puede ser estable o reversible después de la administración *in vivo* del constructo proteináico.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "FvW PEGilado" incluye FvW unido a uno o más PEG y, tal como se utiliza aquí, el término "PEGilación" se refiere al proceso de unir uno o más PEG a FvW. En las Patentes US 5.122.614 y 5.539.063 se describen métodos de PEGilación adecuados.

5 De acuerdo con una realización de la presente invención, el polímero fisiológicamente aceptable es un PEG o un derivado de PEG unido de forma covalente al FvW mediante cualquier estrategia y método conocidos en la técnica. Las estrategias de modificación más comunes son la unión de al menos una molécula polimérica a través de grupos amino de los residuos de lisina, la unión de al menos una molécula polimérica a través de las cadenas laterales de carbohidrato, la unión de al menos una molécula polimérica a través de grupos sulfhidrilo, la unión de al menos una molécula polimérica a través de grupos carboxilo de los ácido aspártico y glutámico, así como la unión de al menos una molécula polimérica de grupos hidroxilo y la unión de al menos una molécula polimérica de extremo N-terminal.

10 En una realización de la presente invención, la unión de al menos una molécula polimérica a FvW se puede llevar a cabo acoplando de forma covalente dicha molécula polimérica con los grupos amino de las cadenas laterales de lisina del FvW. El FvW humano contiene 108 residuos lisina libres con grupos NH₂ en cadenas laterales, que se pueden unir con al menos una molécula polimérica. La Figura 1A muestra ejemplos de residuos de lisina de FvW a los que se puede unir de forma covalente la molécula polimérica de acuerdo con la invención. Algunos derivados de PEG que se pueden unir de forma covalente a los residuos de lisina de FvW son, por ejemplo, polietilenglicoles con un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) activo tal como succinato de succinimidilo, glutarato de succinimidilo o propionato de succinimidilo, que reaccionan con los residuos de lisina bajo condiciones suaves formando un enlace amídico. Otros ejemplos de PEG activado son aquellos que presentan un carbonato activo, como carbonato de succinimidilo (SC-PEG) y carbonato de benzotriazol (BTC-PEG) (véase la página 463 de Roberts y col., *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 459-476, 2002). El SC-PEG y el BTC-PEG reaccionan preferentemente con los residuos de lisina formando un enlace carbamato, aunque es sabido que también reaccionan con residuos de histidina y tirosina. Métodos alternativos consisten en la unión de al menos una molécula polimérica con carbonatos de PEG formando enlaces uretano o con aldehídos o cetonas formando aminas secundarias, por ejemplo después de reducción con cianoborohidruro de sodio. Otros reactivos de acilación de PEG que producen proteínas unidas a uretano incluyen carbonato de p-nitrofenilo, carbonato de triclorofenilo y carbonilimidazol. Estos reactivos se preparan sometiendo a reacción cloroformatos o carbonilimidazol con el grupo hidroxilo terminal en monometoxiPEG (mPEG) (véase la página 464 de Roberts y col., *supra*). Otro ejemplo se refiere a la llamada química de PEGilación de "segunda generación", de acuerdo con la cual el mPEG-propionaldehído, bajo condiciones ácidas, es selectivo con respecto a la α-amina N-terminal (véase la página 464 de Roberts y col., *supra*). Algunos reactivos PEG liberables, tales como anhídrido maleico PEG, carbonatos de mPEG fenil succinidimil éter y carbonatos de mPEG succinidimil benzamida, pueden ser utilizados para producir un conjugado que, bajo condiciones fisiológicas, liberará la proteína terapéutica "sin marcado", tal como se describe en la página 464 de Roberts y col. (*supra*).

35 En otra realización de la presente invención, el FvW también se puede unir con al menos una molécula polimérica a través de sus residuos carbohidrato. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante oxidación suave de las cadenas carbohidrato, por ejemplo con NaIO₄, formando una función aldehído y acoplamiento subsiguiente con un PEG, tal como PEG-hidrazida. Una ventaja de este procedimiento estriba en el hecho de que los bucles A1 y A3 del FvW, que comprenden los sitios de unión de colágeno y, en consecuencia, son regiones críticas para la actividad biológica del FvW, no contienen ningún residuo carbohidrato y no pueden ser modificados por este procedimiento, tal como se puede ver en la Figura 1B. Esta figura muestra un ejemplo de residuos GlcNAc unido a N con asparagina y GalNAc unido a O con treonina o serina, que se pueden oxidar y a continuación unir a una molécula polimérica. Dado que los carbohidratos del FvW están agrupados en determinados dominios, con este procedimiento de modificación el FvW se puede unir de forma dirigida a al menos una molécula polimérica. La unión del polímero al residuo carbohidrato resulta particularmente ventajosa cuando se desea una forma terapéuticamente activa de FvW. Ésta se puede mejorar mediante la reacción selectiva del polímero con residuos unidos en N o unidos en O por métodos conocidos. Por ejemplo, se puede emplear la enzima glucosa-oxidasa utilizada para oxidar residuos carbohidrato del FvW generando múltiples grupos aldehído reactivos, que se pueden someter a reacción con PEG-hidrazida para obtener un enlace hidrazona o con PEG-amina para producir una base de Schiff reversible (véase la página 467 de Roberts y col., *supra*). Bajo determinadas condiciones, se puede utilizar una serina o treonina N-terminal del FvW para la conjugación específica en cuanto al sitio, convirtiéndola en un derivado glioxililo mediante oxidación con peryodato (véase la página 467 de Roberts y col., *supra*).

50 Otra realización de la presente invención consiste en la unión de al menos una molécula polimérica a FvW a través de grupos sulfhidrilo. El FvW humano tiene 177 grupos SH libres que se pueden modificar, por ejemplo con PEG maleimida, formando un sulfuro estable. La PEGilación de residuos cisteína también se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, PEG-vinilsulfona, PEG-yodoacetamida o disulfuro de PEG-ortopiridilo (véase la página 466 de Roberts y col., *supra*).

60 De acuerdo con sus múltiples funciones, la molécula de FvW tiene varios sitios de unión a receptores o ligandos específicos (Girma y col., *Thromb Haemost.* 74:156-60, 1995). Otro sitio de unión importante es el dominio de unión de FVIII, que está situado en el extremo N-terminal de la subunidad madura (aminoácidos 1 - 272). Este epítipo se puede proteger mediante incubación con FVIII libre y formación de un complejo FVIII/FvW. A continuación, el complejo se modifica químicamente (por ejemplo, se PEGila o polisialila) y el FvW conjugado con el polímero con un

sitio de unión de FVIII libre se separa del FVIII (por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño, con CaCl_2 0,3M o NaCl 2M). Similarmente, el FvW se puede unir a una resina de afinidad con un FVIII inmovilizado. A continuación, el FvW se conjuga químicamente con un polímero (por ejemplo un polietilenglicol o un derivado de ácido polisiálico) y se eluye de esta matriz (por ejemplo bajo condiciones altamente salinas, tal como CaCl_2 0,3M o NaCl 2M) en un modo por lotes o usando una columna de cromatografía.

El epítipo de FvW de unión de FVIII es prácticamente idéntico al sitio de unión de heparina. Por consiguiente, el sitio de unión de FVIII se puede bloquear y proteger mediante la unión del FvW a heparina o a una resina de afinidad con heparina inmovilizada durante el procedimiento de modificación química.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "agente de protección del sitio de unión de Factor VIII" se refiere a cualquier agente o epítipo que se une al dominio de unión de FVIII en la molécula de FvW. El agente de protección del sitio de unión de Factor VIII se puede seleccionar entre Factor VIII, derivados de FVIII, heparina y derivados de heparina.

La presente invención está destinada a aumentar la vida media *in vivo* del FVIII mediante el aumento de la vida media *in vivo* del FvW o de derivados biológicamente activos del mismo en comparación con la vida media *in vivo* del FvW no unido a al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable. En una realización de la presente invención, la vida media *in vivo* del FvW se prolonga al menos en un factor dos, mientras que en otra realización la vida media *in vivo* se incrementa al menos en un factor tres. En otra realización, la vida media *in vivo* se incrementa en un factor cinco mediante la unión de al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable. El aumento o la prolongación de la vida media del FvW se pueden evaluar midiendo la farmacocinética del FvW en ratones con deficiencia de FVIII, tal como se describe más abajo en el Ejemplo 7. En pocas palabras, los ratones con deficiencia de FVIII se tratan con un bolo de inyección de FvW premezclado con FVIII a través de la vena caudal, midiéndose los niveles de antígeno de FvW en muestras de plasma en diversos momentos. El antígeno de FvW, al igual que el antígeno de FVIII, se puede medir mediante un ensayo ELISA.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un complejo formado entre al menos un conjugado de polímero-FvW y al menos una molécula de FVIII. El conjugado de polímero-FvW prolonga la vida media *in vivo* del FVIII en la sangre de un mamífero.

La unión del conjugado de polímero-FvW con FVIII prolonga o aumenta la vida media *in vivo* de dicho FVIII en comparación con la vida media *in vivo* de un FVIII que forma un complejo con FvW no unido a al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable. En una realización de la presente invención, la vida media *in vivo* del FVIII se prolonga al menos en un factor 1,5, en otra realización al menos en un factor dos, en otra realización al menos en un factor tres y en otra realización al menos en un factor cinco.

Los conjugados de polímero-FvW a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden emplearse en el tratamiento de la hemofilia A o subtipos de esta enfermedad. Los conjugados de polímero-FvW también pueden utilizarse como tratamiento adyuvante de la profilaxis de la hemofilia A. Bajo estas circunstancias de tratamiento, los conjugados de polímero-FvW se administrarán a intervalos temporales e independientemente se administrarán del modo usual concentrados de FVIII, derivados de plasma o recombinantes, los mismos utilizados actualmente para el tratamiento usual de la hemofilia A, pero a intervalos de tratamiento prolongados debido a la capacidad de prolongar la vida media de los conjugados polímero-FvW.

En una realización de la invención tanto para la profilaxis de la hemofilia A como para el tratamiento de hemorragias agudas en caso de hemofilia A, se administrará un conjugado polímero-FvW junto con FVIII o en forma de un complejo con FVIII a pacientes con hemofilia A. En estos casos, la detención de hemorragias internas o externas se logra inmediatamente aumentando los niveles de FVIII en plasma, que de otra manera son bajos, a niveles terapéuticamente eficaces. Los conjugados polímero-FvW se pueden utilizar también en la terapia de inmunotolerancia para erradicar anticuerpos inhibidores desarrollados contra el FVIII, una situación clínica conocida también como hemofilia por inhibidores o contra FvW. Bajo estas circunstancias se administran niveles suprafisiológicos y suprafarmacológicos de FVIII a pacientes que han desarrollado inhibidores contra el FVIII o contra el FvW. Esta forma de terapia se facilita mediante la administración de conjugados polímero-FvW, que normalmente tienen mayores recuperaciones y mayor persistencia en la circulación de pacientes que reciben dichas preparaciones que el FvW no conjugado.

De acuerdo con el estado actual de la técnica en la terapia y de acuerdo con las directrices y regulaciones internacionales, la farmacocinética del FVIII administrado por infusión está reconocida y aceptada como sustituta de marcadores para la eficacia válidos. Esto se basa en la suposición validada de que un producto de FVIII administrado por infusión, que ha sido caracterizado en cuanto a la actividad funcional mediante ensayos normalizados, se encontrará en la corriente sanguínea, donde actuará del modo previsto como un cofactor del complejo tenasa, el complejo de activación de factor X mediante unión a FIXa y fosfolípidos (Elödi y col., Thromb. Res. 21: 695-700, 1981). Por consiguiente, cualquier análisis farmacocinético en modelos animales será predictivo de la eficacia prevista en pacientes tratados con productos de FVIII.

- Para determinar la actividad del cofactor de FIX se añade una muestra de FVIII o FVIIIa (FVIII completamente activado con trombina) a una mezcla preparada de FIXa, FX, fosfolípido y CaCl₂. Esta mezcla de reacción se incuba a 37°C para permitir la formación de complejos y la generación subsiguiente de FXa. A intervalos hasta 20 minutos se toman submuestras y se añaden a un sustrato cromogénico, que es dividido selectivamente por el FXa. Después de 15 minutos de incubación, la reacción se finaliza mediante la adición de ácido acético. Los valores de absorbancia (A₄₀₅), que son proporcionales a las concentraciones de FXa, se miden en un lector ELISA y se representan en un gráfico en función del tiempo de incubación en la mezcla de reacción.
- Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método para prolongar la vida media *in vivo* del FVIII en la sangre de un mamífero que presenta una alteración hemorrágica asociada a defectos funcionales o deficiencias de FVIII, de FvW o de ambos, que comprende los pasos de:
- preparar al menos un constructo proteínico tal como se define más arriba;
 - preparar al menos un FVIII tal como se define más arriba; y
 - formar un complejo entre dicho constructo proteínico y dicho FVIII.
- En una realización del método arriba indicado, la formación del complejo del paso (c) es "extracorpórea" (es decir, fuera del cuerpo de un mamífero), por ejemplo mezclando el constructo proteínico y el FVIII y administrando después el complejo así formado en una cantidad eficaz al mamífero que presenta dicha alteración hemorrágica.
- En otra realización del método arriba indicado, la formación del complejo del paso (c) es intracorpórea (es decir, dentro del cuerpo de un mamífero) entre el constructo proteínico y el FVIII endógeno presente en la sangre de un mamífero que presenta dicha alteración hemorrágica después de la administración de una cantidad eficaz del constructo proteínico a dicho mamífero.
- En otra realización del método arriba indicado, la formación del complejo del paso (c) es "intracorpórea" entre el constructo proteínico y FVIII exógeno presente en la sangre de un mamífero que presenta dicha alteración hemorrágica después de la administración de una cantidad eficaz del constructo proteínico a dicho mamífero. El FVIII exógeno se puede administrar en una cantidad eficaz simultáneamente con dicho constructo proteínico o secuencialmente, es decir, antes o después de administrar dicho constructo.
- Tal como se utiliza aquí, "FVIII endógeno" incluye FVIII procedente de dicho mamífero. También incluye FVIII transcrito de un transgen u otro ADN extraño presente en dicho mamífero. Tal como se utiliza aquí, "FVIII exógeno" incluye FVIII que no procede del mamífero, incluyendo FVIII_{dp} y FVIII_{lr} tal como se indican más arriba, así como FVIII_{dp} readministrado al mamífero del que ha sido aislado después de formar el complejo arriba definido, y FVIII_{lr} que se administra al mamífero cuyo ADN ha sido utilizado en la producción de dicho FVIII_{lr}.
- Tal como se utiliza aquí, el concepto "cantidad eficaz" incluye una dosis adecuada para tratar a un mamífero que presenta una alteración hemorrágica tal como se describe más arriba; por ejemplo, en el caso de los humanos preferentemente en un intervalo de 5 a 1.000 UI por infusión y de forma especialmente preferente en un intervalo de 10 a 250 UI por infusión.
- La vía de administración no presenta ninguna limitación particular y, en una realización, el constructo proteínico o el complejo de la presente invención se administra por inyección, por ejemplo inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.
- La presente invención también está destinada al tratamiento de alteraciones hemorrágicas asociadas a defectos funcionales o deficiencias de FVIII, de FvW o de ambos, tal como se utilizan aquí, incluyendo alteraciones hemorrágicas cuya causa se puede seleccionar de entre el grupo consistente en una corta vida media *in vivo* del FVIII, propiedades de unión del FVIII alteradas, defectos genéticos del FVIII y expresión reducida del FVIII. En una realización de la presente invención, la alteración hemorrágica se selecciona de entre el grupo consistente en hemofilia A u otras enfermedades asociadas con una función defectuosa del FvW o una interacción defectuosa del FvW con otras moléculas.
- Además, la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un constructo proteínico tal como se define más arriba o de una cantidad eficaz de un complejo tal como se define más arriba. La composición farmacéutica puede comprender además vehículos, diluyentes, sales, tampones o excipientes. La composición farmacéutica puede ser utilizada para tratar las alteraciones hemorrágicas arriba definidas. La composición farmacéutica de la invención puede consistir en una solución o un producto liofilizado. Existen muchos métodos conocidos para formar soluciones estables de proteínas, específicamente FvW y FVIII, por ejemplo, de las Patentes US 6.586.573, 5.565.427, 5.763.401, 5.733.873, 4.877.608, 5.605.884 y 5.328.694. Estas soluciones pueden ser sometidas a cualquier proceso de liofilización adecuado, por ejemplo al proceso descrito en el documento US 6.586.573. La presente invención incluye otras formas adecuadas del conjugado polímero-FvW solo o en combinación con FVIII.
- Las figuras muestran:

- Figuras 1A y 1B: la estructura esquemática del FvW con ejemplos de sitios diana para la conjugación. Los puntos grises de la Figura 1A indican los residuos lisina del FvW que se pueden unir mediante al menos una molécula polimérica y la Figura 1B muestra los residuos carbohidrato de FvW que se pueden unir mediante al menos una molécula polimérica.
- 5 Figura 2: la farmacocinética de un conjugado polímero-FvW comparado con FvW no conjugado en ratones con EvW.
- Figura 3: la farmacocinética de un conjugado polímero-FvW comparado con FvW no conjugado en ratones hemofílicos.
- Figura 4: la farmacocinética de FVIII en ratones con EvW tratados con FvWr o PEG-FvWr.
- 10 Figura 5: la recuperación de FVIIIr en ratones hemofílicos después de la administración de complejo de FVIIIr con conjugado de polímero-FvW y complejo de FVIII con FvW.
- Figura 6: la recuperación de FvW en ratones hemofílicos después de la administración de complejo de FVIIIr con conjugado de polímero-FvW y complejo de FVIII con FvW.
- Figura 7: la farmacocinética del FVIIIr y el PEG-FvWr en ratones *knockout* doble FVIII x FvW.
- 15 Figura 8: muestra la farmacocinética del FVIIIr y el PEG-FvWr en ratones cruzados.
- Figura 9: el aumento de FvW:Ag en plasma de ratón (acoplamiento de lisina y carbohidrato).
- Figura 10: un estudio de interacción biomolecular (diagrama izquierdo) y una comparación de la capacidad de unión del FVIII (diagrama derecho) de FvWr conjugado con PEG en comparación con FvW no conjugado.
- 20 Figura 11: el aumento de masa del FvW después de la conjugación con polímero medido por SDS-PAGE.
- Figura 12: el aumento de masa del FvW después de la conjugación con polímero medido por electroforesis de agarosa para analizar multímeros de FvW.
- Figura 13: la farmacocinética del FVIIIr en ratones K.O.-FVIII después de la administración de complejo de FVIIIr con conjugado de polímero-FvW (FvWr con residuos de lisina PEGilados) y complejo de FVIIIr con FvWr.
- 25 Figura 14: la farmacocinética del FvWr en ratones K.O.-FVIII después de la administración de complejo de FVIIIr con conjugado de polímero-FvW (FvWr con residuos lisina PEGilados) y complejo de FVIIIr con FvWr.
- Figura 15: la determinación de la capacidad de unión de FVIII de FvWr conjugado con PEG en comparación con FvWr no conjugado, utilizando un ensayo ELISA y cromogénico combinado (ECA).
- 30 Figura 16: la determinación de la capacidad de unión de FVIII de FvWr conjugado con PEG en comparación con FvWr no conjugado, utilizando la tecnología de resonancia de plasmón superficial.
- 35 Figura 17: el aumento de masa del FvW después de conjugación con polímero medido por SDS-PAGE tal como se describe en el Ejemplo 13.
- Figura 18: la determinación de la capacidad de unión de FVIII de FvWr madurado con furina en comparación con un FvWdp y FvWr no tratado, utilizando un ensayo ELISA y cromogénico combinado (ECA).
- 40 Figura 19: la determinación de la capacidad de unión de FVIII de FvWr madurado con furina en comparación con un FvWdp y FvWr no tratado, utilizando la tecnología de resonancia de plasmón superficial.
- Figura 20: los patrones de enfoque isoeléctrico del conjugado FvWr-ácido polisialico y FvWr bajo condiciones de reducción.
- 45 Figura 21: la farmacocinética del conjugado FvWr-ácido polisialico y FvWr en ratones con deficiencia de FvW.
- Figura 22: el desarrollo en el tiempo de la actividad de FVIII en ratones después de la administración de conjugado FvWr-ácido polisialico y FvWr en ratones con deficiencia de FvW.
- 50 Figura 23: la farmacocinética de PEG-FvWr (PEG 20K SG ramificado) y FvWr en ratones con deficiencia de FVIII.
- Figura 24: la farmacocinética de FVIIIr administrado por coin fusión con PEG-FvWr (PEG 20K SG ramificado) o FvWr en ratones con deficiencia de FVIII.
- Figura 25: la farmacocinética de FVIIIr administrado por coin fusión con diversas cantidades de PEG-FvWr (PEG 20K SG ramificado) en ratones con deficiencia de FVIII.
- 55 Figura 26: la farmacocinética de PEG-FvWr #A (5 mg PEG/mg proteína), PEG-FvWr #B (20 mg PEG/mg proteína) y FvWr nativo en ratones con deficiencia de FVIII.
- Figura 27: la farmacocinética de FVIIIr administrado por coin fusión con PEG-FvWr #A (5 mg PEG/mg proteína), PEG-FvWr #B (20 mg PEG/mg proteína) y FvWr nativo.
- 60 La presente invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos, sin que esto implique ninguna limitación a la misma.

Ejemplos**Ejemplo 1: Preparación de conjugado polímero - FvW por modificación de residuos carbohidrato**

5 Para la preparación del conjugado polímero - FvW a través de los residuos carbohidrato (Figura 1B) se preparó una solución de FvWr (concentración final: 500 µg/ml) en tampón de acetato de sodio 20 mM, pH 6,0 y se añadió NaIO₄ (concentración final 5 mM) para la oxidación de los residuos carbohidrato. La oxidación se llevó a cabo durante 20 minutos a 4°C y después se añadió bisulfito de sodio (concentración final 5 mM) para detener la reacción. A continuación se añadió mPEG-hidrazida (longitud de cadena: 3 kD) (concentración final 10 mM) y se llevó a cabo la PEGilación del FvW durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, el FvW PEGilado se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. La mezcla de reacción se dispuso en una columna cromatográfica (tamaño 26 mm x 840 mm) rellena de Sephacryl S-300 HR (Amersham) y el FvW PEGilado se separó de los reactivos utilizando tampón HEPES 20 mM, NaCl 10 mM, pH 7,4, que contenía un 5% de trehalosa. El FvW modificado se eluyó en el volumen vacío tal como se indica mediante mediciones de los niveles de FvW-antígeno y OD 280 nm. 10 Las fracciones que contenían FvW se dispusieron directamente en una columna de intercambio aniónico (tamaño: 10 mm x 108 mm) rellena con EMD TMAE 650 M (Merck) para mayor purificación. Después, el FvW PEGilado se eluyó con tampón HEPES 20 mM que contenía un 5% de trehalosa y NaCl 1.000 mM. 15

Ejemplo 2: PEGilación de residuos lisina de FvW con mPEG succinimidil succinato

20 Para la PEGilación de FvW por residuos lisina (Figura 1A) se preparó una solución de FvWr (concentración final: 500 µg/ml) en tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, que contenía un 5% de sacarosa, y se añadió mPEG succinimidil succinato (longitud de cadena: 5 kD) (concentración final 10 mM). El FvW se PEGiló durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, el FvW PEGilado se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño. La mezcla de reacción se dispuso en una columna de cromatografía rellena con Sephacryl S-300 HR (Amersham) y el FvW PEGilado se separó mediante el mismo sistema tampón utilizado para la reacción de PEGilación. El FvW se eluyó en el volumen vacío tal como se indica mediante mediciones de los niveles de FvW-antígeno y OD 280 nm. 25 Las fracciones que contenían FvW se dispusieron directamente en una columna de intercambio aniónico (tamaño: 26 mm x 840 mm) rellena con EMD TMAE 650 M (Merck) para mayor purificación. Después, el FvW PEGilado se eluyó con tampón HEPES 20 mM que contenía un 5% de sacarosa y NaCl 1.000 mM.

Ejemplo 3: PEGilación de residuos lisina de FvW con mPEG p-nitrofenil carbonato

30 Para la PEGilación de FvW con mPEG p-nitrofenil carbonato se preparó una solución de FvW derivado de plasma (concentración final: 500 µg/ml) en tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6, que contenía un 5% de sacarosa, y se añadió mPEG p-nitrofenil carbonato (longitud de cadena: 20 kD) (concentración final 10 mM). El FvW se PEGiló durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, el FvW PEGilado se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño. La mezcla de reacción se dispuso en una columna de cromatografía rellena con Sephacryl S-300 HR (Amersham) y el FvW PEGilado se separó mediante el mismo sistema tampón utilizado para la reacción de PEGilación. El FvW se eluyó en el volumen vacío tal como se indica mediante mediciones de los niveles de FvW-antígeno y OD 280 nm. 35

Ejemplo 4: PEGilación de residuos sulfhidrido de FvW con mPEG maleimida

40 Para la PEGilación de FvW a través de los residuos SH con mPEG maleimida se preparó una solución de FvWr (concentración final: 500 µg/ml) en tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6, que contenía un 4% de manosa y un 1% de trehalosa, y se añadió mPEG maleimida (longitud de cadena: 10 kD) (concentración final 10 mM). El FvW se PEGiló durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, el FvW PEGilado se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño. La mezcla de reacción se dispuso en una columna de cromatografía rellena con Sephacryl S-300 HR (Amersham) y el FvW PEGilado se separó mediante el mismo sistema tampón utilizado para la reacción de PEGilación. El FvW se eluyó en el volumen vacío tal como se indica mediante mediciones de los niveles de FvW-antígeno y OD 280 nm. 45

Ejemplo 5: Acoplamiento de dextrano al FvW

50 Se preparó una solución de dextrano (PM 40 kD) de 6 mg/ml en tampón acetato de sodio 20 mM, pH 6,0, y se añadió NaIO₄ (concentración final 10 mM) para generar grupos aldehído libres. La oxidación se llevó a cabo durante 1 hora a 4°C en oscuridad y después se añadió bisulfito de sodio (concentración final 5 mM) para detener la reacción. El dextrano activado se dializó contra tampón de fosfato de sodio 0,1M, pH 7,2, que contenía NaCl 0,15 M (tampón PBS). Después se añadieron 2,4 ml de esta solución de dextrano activado a 10 ml de una solución de FvWr (concentración: 0,6 mg/ml en tampón PBS). A esta mezcla se añadieron 50 ml de una solución de cianoborohidruro de sodio (64 mg/ml en tampón PBS) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante la noche en oscuridad. Luego se añadieron 3 ml de una solución de TRIS-HCl 1,0M, pH 7,2, para bloquear los grupos aldehído restantes y la mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se dializó contra tampón HEPES 20 mM, pH 7,4, que contenía un 5% de sacarosa. Después, el dextrano acoplado al derivado de FvWr se purificó adicionalmente por 55

5 cromatografía de exclusión por tamaño, disponiendo la mezcla en una columna de cromatografía (tamaño: 50 mm x 860 mm) rellena con Sephacryl S-300 HR (tampón: HEPES 20 mM, 5% de sacarosa, pH 7,4). El derivado de FvWr se eluyó en el volumen vacío tal como se indica por mediciones de los niveles de FvW-antígeno y OD 280 nm. Estas fracciones se recogieron y concentraron por ultrafiltración utilizando una membrana de celulosa regenerada de 100 kD (Millipore).

Ejemplo 6: Farmacocinética en ratones con EvW

10 Como modelo de EvW humana semejante a EvW severa de tipo III se utilizaron ratones con deficiencia de FvW, descritos detalladamente por Denis y col. (PNAS 95: 9524-9529, 1998). Grupos de 5 ratones recibieron una inyección de bolo en la vena caudal bien con PEG-FvWr (longitud de cadena 3 kD, PEGilación del FvWr de acuerdo con el Ejemplo 1), bien con FvWr nativo como control a una dosis de 40 U FvW:Ag/kg de peso corporal, basado en el FvW detectable (ELISA) después de la PEGilación. Los grupos con PEG-FvWr se anestesiaron 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 10 horas y 24 horas después de la inyección (5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 10 horas y 24 horas en el caso de los grupos control) y se preparó plasma de citrato de punción cardíaca. Los niveles de antígeno de FvW se siguieron en plasma. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 2. El FvWr nativo se elimina de la circulación de una forma normalmente bifásica, tal como se describe en la literatura (Lenting y col., J. Biol. Chem. 279: 12102-12109, 2004) y cae por debajo del límite de detección entre 600 minutos y 1.440 minutos, lo que equivale a 10 y 24 horas. En cambio, el FvWr PEGilado, tras un incremento inicial de 0 en el momento de la inyección a aproximadamente 0,6 U por ml de plasma 10 horas después de la inyección, seguía presente en un nivel esencialmente más alto de aproximadamente 0,4 U por ml incluso 24 horas después de la inyección, con un descenso plano entre las 10 horas y las 24 horas, indicando una persistencia mucho más larga del FvWr PEGilado. El aumento gradual del FvW mensurable con el tiempo indica la reversibilidad de la conjugación del PEG polimérico conjugado con FvW, que después de la liberación del polímero queda accesible para la medida. El largo tiempo de circulación del PEG-FvW en este modelo demuestra que esta preparación puede ser utilizada para el tratamiento profiláctico de la EvW.

Ejemplo 7: Farmacocinética en ratones K.O.-FVIII

15 Como modelo de hemofilia humana severa A se utilizaron ratones con deficiencia de FVIII, descritos detalladamente por Bi y col. (Nat. Genet. 10: 119-121, 1995). Grupos de 5 ratones recibieron una inyección de bolo (13 ml/kg) a través de la vena caudal bien con PEG-FvWr (longitud de cadena 3 kD, la PEGilación del FvWr se realizó de acuerdo con el Ejemplo 1), bien con FvWr nativo, en cada caso previamente mezclado con FVIIIr para alcanzar 3 U FVIII/ml y 3 U FvW:Ag/ml. Después de anestesia, se preparó plasma de citrato mediante punción cardíaca de los grupos respectivos, 5 minutos y 6 horas después de la inyección del producto. Un grupo de control recibió tampón y se sangró 5 minutos después de la inyección. Los niveles de antígeno de FvW se midieron en muestras de plasma. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 3. Las curvas indican que la eliminación normal de FvWr cae a cerca del nivel de base del FvW, presente en ratones con deficiencia de FVIII, mientras que después de la administración de FvWr PEGilado los niveles aumentaron dentro del período de observación de 6 horas. Esto indica de nuevo la reversibilidad de la conjugación del PEG polimérico conjugado con FvW, que después de la liberación del polímero queda accesible para la medida y continúa aumentando incluso después de 360 minutos (6 horas) después de la administración.

Ejemplo 8: Aumento del FVIII en ratones con EvW

20 Como modelo de EvW humana semejante a EvW severa de tipo III se utilizaron ratones con deficiencia de von Willebrand, descritos detalladamente por Denis y col. (PNAS 95: 9524-9529, 1998). Grupos de 4-5 ratones fueron tratados vía intravenosa a través de la vena caudal con PEG-FvWr (longitud de cadena 5 kD, la PEGilación del FvWr se llevó a cabo de acuerdo con el Ejemplo 2) en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 5% sacarosa pH 7,4 o con FvWr nativo. Un grupo de control se trató con tampón. (Dosis de PEG-FvWr 18 U FvW:Ag/kg basado en ELISA, 2700 µg/kg, dosis de FvWr nativo: 2400 µg/kg).

25 Cada ratón recibió una dosis con un volumen de 10 ml/kg. En determinados momentos después de la inyección de PEG-FvWr (5 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas, 10 horas, 24 horas y 48 horas) o FvWr nativo (5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 24 horas y 32 horas), los grupos de 4-5 ratones se anestesiaron, se preparó plasma de citrato de punción cardíaca y el nivel de actividad de FVIII (cromogénico en ensayo doméstico) se siguió en plasma. El grupo de control se sangró 15 minutos después de la inyección. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 4.

30 El nivel de FVIII endógeno en los ratones aumenta como resultado de la infusión de FvWr. El área bajo la curva (AUC) después de la administración de FvWr PEGilado era de 8,0 U·h/ml en comparación con solo 3,3 U·h/ml después de la administración de FvWr. Esto indica un tiempo de circulación esencialmente más largo del FvWr PEGilado. Los resultados muestran que el FvW PEGilado puede ser utilizado para el tratamiento profiláctico de la deficiencia de FVIII secundario en caso de EvW.

Ejemplo 9: Recuperación de FVIIIr y FvW en ratones K.O.-FVIII

Como modelo de hemofilia humana severa A se utilizaron ratones con deficiencia de FVIII, descritos detalladamente por Bi y col. (Nat. Genet. 10: 119-121, 1995). Grupos de 5 ratones recibieron una inyección de bolo (13 ml/kg) a través de la vena caudal bien con PEG-FvWr (HZ-PEG, 3K, acoplado a través de carbohidratos), bien con FvWr nativo, en cada caso previamente mezclado con FVIIIr para alcanzar 3 U FVIII/ml. Después de anestesia se preparó plasma de citrato mediante punción cardíaca de los grupos respectivos, 5 minutos y 6 horas después de la inyección. Los niveles de actividad de FVIII y de antígeno de FvW se midieron en muestras de plasma. Los resultados de este experimento se resumen en las Figuras 5 y 6.

El FvWr PEGilado para las dos preparaciones indujo una mayor recuperación del FVIIIr inyectado conjuntamente, en comparación con el FvWr no tratado. Los niveles de FvW aumentaron en el caso del FvWr PEGilado con el paso del tiempo, mientras que el FvWr normal se eliminó prácticamente por completo en un plazo de 360 minutos. Los resultados muestran que los complejos de FvW PEGilado con FVIII pueden ser utilizados para el tratamiento agudo de la hemofilia A con la ventaja de un mayor tiempo de circulación del FVIII.

Ejemplo 10: Aumento de la vida media del FVIII en ratones *knockout* doble FVIII x FvW

Los ratones *knockout* doble FVIII x FvW se obtuvieron mediante cruzamiento de ratones con deficiencia de FVIII y ratones con deficiencia de FvW. Estos ratones padecían deficiencia de FVIII y deficiencia de FvW, proporcionando así un modelo ideal para estudiar las interacciones de FVIII - FvW en un modelo animal.

Grupos de 5 ratones *knockout* doble FVIII x FvW (ratones con deficiencia de FVIII se cruzaron con ratones con deficiencia de FvW) recibieron una inyección de bolo (11 ml/kg) a través de la vena caudal con PEG-FvWr (longitud de cadena 5 kD, la PEGilación del FvWr se llevó a cabo de acuerdo con el Ejemplo 2 mediante modificación de los residuos lisina con mPEG succinimidil succinato) en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 5% sacarosa pH 7,4 o con FvWr SS-PEG nativo, o FvWr nativo, en cada caso mezclado previamente con FVIIIr para alcanzar 9 U FVIII/ml y 9 U antígeno de FvW/ml y 0,67 U FvW:RCo/ml. Los valores de antígeno de FvW se midieron con un método ELISA conforme a lo publicado (Ingerslev, Scand. J. Clin. Invest. 47: 143-149, 1987). La actividad de FvE:RCo funcional que refleja las propiedades de unión de las plaquetas del FvW en el proceso de la hemostasia primaria se midió de acuerdo con Macfarlane y col. (Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 306-308, 1975). Cinco minutos, 3 horas, 6 horas, 10 horas y 24 horas después de la inyección se preparó plasma de citrato de los grupos respectivos mediante punción cardíaca tras anestesia. Los niveles de actividad de FVIII y de antígeno de FvW se midieron en muestras de plasma.

La vida media del FVIII y el FvW se calculó utilizando el programa MicroMath Scientist (Micromath Research, Saint Luis, MO, US) empleando un modelo compartimentado de la biblioteca farmacocinética. La vida media del FVIII, administrado por infusión conjuntamente con FvWr o FvWr PEGilado, aumentó de 1,88 horas a 2,58 horas y el área bajo la curva (AUC) aumentó de 4,3 a 7,3 U· μ h/ml. La vida media del FvW aumentó de 3,1 a 10,4 y el área bajo la curva aumentó de 5,7 a 22,8. Los resultados se resumen en las Figuras 7 y 8. Los datos muestran que el PEG-FvW puede ser utilizado para el tratamiento agudo y profiláctico de la hemofilia A y de la EvW con la ventaja de largos tiempos de circulación de FvW y FVIII.

Ejemplo 11: Demostración de la reversibilidad de la PEGilación en plasma de ratón

La reversibilidad de la PEGilación se demostró mediante experimentos *in vitro* con plasma deficiente en FvW. Se obtuvo plasma de citrato de ratones con deficiencia de FvW (Denis y col. PNAS 95: 9524-9529, 1998) mediante centrifugación a 1.100xg durante 15 minutos a 4°C. Cuatro volúmenes de plasma de ratón se mezclaron con 1 volumen de FvWr PEGilado preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 (acoplamiento de PEG por carbohidrato) o el Ejemplo 2 (acoplamiento de PEG por residuos lisina) y se mantuvieron a 37°C durante 48 horas. En ambos experimentos se utilizó como control FvWr no PEGilado. Inmediatamente después de la mezcla y 1 hora, 5,5 horas, 24 y 48 horas después se tomaron submuestras y el contenido de antígeno de FvW se analizó a partir de muestras congeladas con un sistema ELISA sándwich. Un anticuerpo anti-FvW policlonal (DAKO) se utilizó para revestir placas ELISA de 96 pocillos y se ensayó un conjugado de IgG antirratón de cabra-HRP (AXELL) en cuanto a la detección de factor FvW unido. Con el paso del tiempo se midieron cantidades crecientes de antígeno de FvW, lo que demuestra la reversibilidad de la conjugación de polietilenglicol con FvW también en muestras de plasma *ex vivo* (Figura 9).

Ejemplo 12: Determinación de la capacidad de unión a FVIII de preparaciones de FvW PEGilado

La capacidad de unión a FVIII de diferentes preparaciones de FvWr PEGilados se comparó mediante experimentos de resonancia de plasmón superficial (Karlsson y Fält, J. Immunol. Methods 200: 121-33, 1997) utilizando un instrumento BIACORE®3000 (BIACORE, Uppsala, Suecia). En general, se inmovilizan ligandos en un sensor y la unión de otros componentes con el ligando se determina mediante resonancia de plasmón superficial. Usando esta técnica se mide el cambio del índice de refracción de la solución cerca de la superficie del chip. Un cambio en la concentración de un componente unido en la superficie del chip se detecta en forma de una señal, que se expresa

en unidades de resonancia arbitrarias (RU). Existe una relación lineal entre la masa de proteína unida al ligando inmovilizado y las RU observadas. Las preparaciones de FvW PEGilado se inmovilizaron a 25°C en la superficie de dextrano del chip sensor BIACORE™ utilizando química NHS/EDC a 7000 - 9000 RU y a 25°C. Un tampón HEPES 10 mM pH 7,4, que contenía NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y un 0,005% de agente tensioactivo P20 (tampón HBS, BIACORE) se utilizó en un caudal de 15 µl/min. La unión de diferentes cantidades de un producto de FVIII comercial (ADVATE, Baxter AG, Viena, Austria) se midió tal como se ilustra en la Figura 10. Esta figura demuestra la capacidad de unión con FVIII de una preparación de FvWr PEGilado, modificada con mPEG maleimida 5000, preparada de acuerdo con el Ejemplo 4. Los resultados de los experimentos BIACORE con diferentes preparaciones de FvWr PEGilado se resumen en la Tabla 1. En esta tabla se indican las diferentes capacidades de unión con FVIII de las preparaciones de FvWr PEGilado en porcentaje de los valores RU de la preparación de referencia no PEGilada en el nivel máximo de la referencia en el intervalo de 10 - 20 UI FVIII/ml (ensayo cromogénico).

Tabla 1

Capacidades de unión con FVIII de preparaciones de FvWr PEGilado (FvWr no PEGilado = 100%)

| Reactivo | Concentración de reactivo | | | | |
|------------------|---------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 0 mM | 1 mM | 5 mM | 10 mM | 20 mM |
| mPEG SS 5000 | 100% | 30-40% | 20-30% | 0-20% | 0% |
| mPEG MAL 5000 | 100% | 70-90% | 40-60% | 30-50% | 20-40% |
| mPEG Hz 3000 (a) | 100% | 60-80% | 30-50% | 10-20% | 0-5% |

(a) Oxidado con 5 m NaIO₄

Ejemplo 13: Aumento de masa del FvW después de conjugación con polímero

El FvWr se PEGiló de acuerdo con el Ejemplo 2 utilizando mPEG succinimidil succinato (longitud de cadena: 5 kD) en diversas concentraciones (1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM y 10 mM). Las especies de FvW PEGilado se analizaron con dos métodos diferentes: electroforesis en gel de poliacrilamida SDS y análisis de multímeros de FvW. La electroforesis en gel SDS se llevó a cabo bajo condiciones reductoras utilizando un gel en gradiente del 3 - 8% (Tris Acetat Gel/Bio-Rad). El análisis de multímeros de FvW se llevó a cabo de acuerdo con Ruggeri y Zimmerman (Blood 57: 11450-43, 1981) utilizando un gel de agarosa 1,6%. La visualización de los multímeros de FvW se llevó a cabo de acuerdo con Aihara y col. (Thromb. Haemost. 55: 263-67, 1986).

La electroforesis en gel SDS (Figura 11) muestra una preparación de FvWr consistente en el FvW maduro (banda inferior) y pro-FvW (banda superior) y el aumento del peso molecular después de la PEGilación mediante el uso de diferentes concentraciones de reactivo. Además muestra el cambio del peso molecular de una preparación de seroalbúmina humana (HSA) después de PEGilación (la PEGilación se llevó a cabo de acuerdo con el Ejemplo 2), como una preparación de referencia. Se demuestra que el peso molecular de la HSA cambia de 66.000 Da a 190.000 Da, lo que muestra la eficacia del procedimiento de PEGilación.

La Figura 12 muestra el patrón multimérico del FvWr antes y después de la PEGilación con diferentes concentraciones de reactivo. En esta figura se demuestra claramente una ampliación y un cambio a un mayor peso molecular de diferentes multímeros con una concentración creciente de reactivo.

Ejemplo 14: PEGilación de residuos de lisina en FvW con mPEG succinimidil glutarato

Para la PEGilación de FvW a través de residuos de lisina (Figura 1A) se preparó una solución de FvWr (concentración final: 500 µg/ml) en tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, 5% sacarosa) y se añadió mPEG succinimidil glutarato (longitud de cadena: 5 kD) (concentración final: 200 mg PEG succinimidil glutarato / mg proteína). Después, el valor pH se ajustó a 7,4 con NaOH 0,1M. El FvW se PEGiló durante 1 hora a temperatura ambiente y se purificó tal como se describe en el Ejemplo 2.

Ejemplo 15: Aumento de la vida media del FVIII en ratones K.O.-FVIII

Como modelo de hemofilia humana severa A se utilizaron ratones con deficiencia de FVIII, descritos detalladamente por Bi y col. (Nat. Genet. 10: 119-121, 1995). Grupos de 5 ratones recibieron una inyección de bolo (13 ml/kg) a través de la vena caudal bien con PEG-FvWr (SS-PEG, 5K) preparado de acuerdo con el Ejemplo 2, bien con FvWr nativo, en cada caso previamente mezclado con FVIII recombinante para alcanzar 10 U FVIII/ml y 10 U FvW/ml. Después de anestesia, se preparó plasma de citrato mediante punción cardíaca de los grupos respectivos, 5 minutos, 3, 9 y 24 horas después de la inyección. Los niveles de actividad de FVIII y de recuperación de antígeno de FvW se midieron en muestras de plasma. Los resultados de este experimento se resumen en las Figuras 13 y 14.

La vida media del FVIII aumentó de 1,8 horas (en presencia de FvWr nativo) a 3,9 horas (administrado junto con PEG-FvWr), el área bajo la curva (AUC) aumentó de 4,1 a 7,8 U·h. La vida media del FvW aumentó de 3,2 a 13,6 y el AUC aproximadamente se cuadruplicó de 7,7 a 32,1 U·h.

Ejemplo 16: Determinación de la capacidad de unión a FVIII de preparaciones de FvW SS-PEGilado mediante diferentes métodos

- 5
- La capacidad de unión a FVIII de diferentes preparaciones de FvWr PEGilado se midió mediante un sistema de ensayo combinado ELISA y cromogénico (ECA) utilizando una modificación del método descrito por Bendetowicz y col. (Blood 92: 529-538, 1998). Placas de microtitulación se revistieron con 200 µl de 2,6 µg/ml de anticuerpo policlonal anti-FvW en 50 mmol/l de Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9,6. A continuación, las placas se lavaron después de cada paso con tampón PBS-Tween (Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6 y 0,05% Tween 20). Las placas se bloquearon durante 1 hora a 37°C en 0,1% leche deshidratada / benzamidina 2 mM en PBS-Tween. Se preincubaron cantidades crecientes de FvW durante 25 minutos a 37°C con 0,2 U/ml de FVIIIr (ADVATE, Baxter AG, Viena, Austria), y 100 µl de estas mezclas se añadieron a las placas. Después de incubación, la cantidad de FVIII unido al FvW capturado se midió con un ensayo cromogénico de FVIII (Technoclone, Viena, Austria). La capacidad de unión con FVIII se expresa como los cambios en la absorbancia medida a 405 nm (dA405) en 1 minuto. La Figura 15 muestra la unión con FVIII dependiente de la dosis de FvW de dos preparaciones de FvW PEGiladas, en ambos casos modificadas con mPEG succinimidil succinato (SS). La capacidad de unión con FVIII de las preparaciones de FvW modificado se calculó como el porcentaje de las preparaciones de FvW iniciales no modificadas, obteniéndose un resultado de un 20% en el caso del PEG-SS-FvWr-1 y un 50% de PEG-SS-FvWr-2.
- 10
- 15
- 20 La Figura 16 muestra la capacidad de unión con FVIII de las dos preparaciones de PEG-SS-FvWr, medida según el método de resonancia de plasmón superficial tal como se describe en el Ejemplo 12. La capacidad de unión calculada era del 25 y el 45%, respectivamente.

La Figura 17 demuestra los aumentos apropiados de la masa molecular de la molécula de FvWr después de la conjugación de PEG-SS, medidos por SDS-PAGE.

25 **Ejemplo 17: PEGilación de grupos sulfhidrilo de FvW con PEG maleimida ramificada**

- Para la PEGilación de FvW a través de residuos de SH con una PEG maleimida ramificada se prepara una solución de FvW recombinante (concentración final: 500 µg/ml) en tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6 que contenía un 3% de trehalosa. Después se añade una mPEG maleimida (longitud de cadena: 20 kD) suministrada por NOF Corporation (NOF Europe, Grobbendonk, Bélgica) (concentración final 10 mM). El FvW se PEGila durante 2 horas a temperatura ambiente bajo agitación suave. A continuación, el FvWr PEGilado se separa de los reactivos mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) utilizando una membrana de 100 kD de celulosa regenerada (Millipore).
- 30

Ejemplo 18: PEGilación de grupos carboxilo de FvW con mPEG hidrazida/EDC

- En primer lugar se prepara y purifica un FvWr madurado con furina de acuerdo con el Ejemplo 23. La preparación se dializa contra tampón fosfato 50 mM, pH 6,2 y se diluye a una concentración de 400 µg/ml. Después se añade mPEG hidrazida (mPEG Hz) con una longitud de cadena de 5 kD (concentración: 60 mg mPEG Hz / mg FvW). A 1 ml de la mezcla que contiene el FvW se añaden 30 µl de una solución recién preparada de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 500 mM y la mezcla se incubó a temperatura ambiente bajo agitación suave durante 5 horas. Los reactivos se separan del FvWr PEGilado mediante UF/DF contra tampón HEPES 20 mM (NaCl 150 mM, pH 7,4) utilizando una membrana de 100 kD (celulosa regenerada/Millipore).
- 35

40 **Ejemplo 19: Modificación de residuos lisina de FvW con ácido polisialico**

- La modificación de residuos de lisina con ácido polisialico (ácido colomínico, CA) se llevó a cabo de acuerdo con la descripción de Fernandes y Gregoriadis (Biochim. Biophys. Acta 1341: 26-34, 1997) y Jennings y Lugowski (J. Immunol. 127: 1011-1018, 1981). Una solución de ácido colomínico (concentración: 20 mg/ml) que contenía NaIO₄ 0,1M se agitó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente para oxidar el CA. Después se añadieron 2 ml de etilenglicol por ml de solución de CA activado y la mezcla se agitó durante otros 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La solución se dializó durante la noche contra tampón fosfato de sodio 0,05M, pH 7,2, en oscuridad. A continuación se añadió una parte alícuota de esta solución a una solución de FvWr (400 µg/ml) en fosfato de sodio 0,05M para obtener una concentración final de 50 mg de CA activado por mg de FvW. Esta mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se añadió NaCNBH₃ (1 mg/mg FvWr) y la mezcla se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente, en oscuridad bajo agitación suave. Después se añadió una solución acuosa de TRIS 1M, pH 7,2 (50 µl por mg NaCNBH₃) y la mezcla se agitó durante 1 hora para finalizar la reacción. Los reactivos libres se separaron del conjugado de FvWr-ácido polisialico mediante UF/DF utilizando una membrana de 100 kD (celulosa regenerada/Millipore).
- 45
- 50

La capacidad de unión con FVIII de esta preparación se determinó tal como se describe en el Ejemplo 16.

La conjugación de FvWr con ácido polisialico se demostró mediante el cambio del punto isoelectrico (PI) detectado por enfoque isoelectrico (IEF) bajo condiciones reductoras. La Figura 20 muestra una comparación de una preparación de FvW antes y después de la conjugación con ácido polisialico de acuerdo con este ejemplo. El sistema Ampholine PAGplate (pH 3,5 - 9,5) se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Bioscience). La introducción de grupos ácidos mediante la conjugación con ácido polisialico conduce a una sola banda ácida para el FvWr modificado.

Usando el ensayo ECA tal como se describe en el Ejemplo 16 se determinó una capacidad de unión con FVIII del 54%. Empleando el método de resonancia de plasmón superficial (Ejemplo 12) se determinó una capacidad de unión con FVIII del 70%.

Ejemplo 20: PEGilación bajo condiciones de esfuerzo de cizalladura

Se fabricó una cámara de perfusión de acuerdo con la descripción de Sakariassen y col. (J. Lab. Clin. Med. 102: 522-535, 1983), que se utilizó para la PEGilación de FvWr bajo condiciones de esfuerzo de cizalladura. Se preparó una solución de FvWr (500 µg/ml) en HEPES 20 mM, pH 7,4 que contenía un 3% de trehalosa. Después se añadió mPEG succinimidil succinato (concentración final: 5 mM), el valor pH se ajustó a 7,4 con NaOH 0,1M y se introdujo inmediatamente en el sistema de perfusión. Después se llevó a cabo la PEGilación a temperatura ambiente con una velocidad de cizalladura de 2.500 s⁻¹ usando una bomba peristáltica bajo las condiciones de perfusión descritas por Sakariassen y col. (J. Lab. Clin. Med. 102: 522-535, 1983).

Ejemplo 21: Preparación de FvWdp

La preparación de FvWdp se llevó a cabo de acuerdo con Thorell y Blombäck (Thromb. Res. 35: 431-450, 1984) con modificaciones. Para la preparación del FvWdp, 1,5 kg de crioprecipitado se disolvió a 20-30°C en 6 l de agua. Después de 1 hora de agitación, el precipitado de fibronectina se retiró por centrifugación, se añadieron 8 g de NaCl por litro de sobrenadante, la solución se calentó a temperatura ambiente y se añadió reactivo SD-stock (1% Tween 80 + 0,18% acetiltriethylcitrate concentración final) para la inactivación viral.

La solución se purificó adicionalmente en una columna EMD-TMAE Fractogel 650 M (XK50/180) preequilibrado con NaCl 0,2M, acetato de sodio 0,02M, pH 6,5 (tampón de lavado). Después de lavarlo con 20 volúmenes de columna de tampón de lavado, el FvW se eluyó con NaCl 0,5M, Na-citrato 0,02M, pH 6,9. Para la precipitación de FvW se añadieron glicina (concentración final 1M) y NaCl (concentración final 3M). El precipitado se disolvió en tampón y se dispuso en una columna Sephacryl S-400 HR (Amersham) equilibrada en CaCl₂ 0,3M, NaCl 0,15M, HEPES 20 mM, pH 7,4 para la purificación final.

Tabla 2

| Purificación de FvWdp | | | | |
|--|---|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Muestra | Act. Espec. [UI FvW:Ag/mg proteína] | FvW:CB/ FvW:Ag [UI/UI] | FvW:RCo/ FvW:Ag [UI/UI] | FvW:RCo/ FVIII Ag [UI/UI] |
| Material Inicial (n = 2) (Crioprecipitado resuspendido) | 1,3 | 0,35 | 0,17 | 0,33 |
| Centrifugación sobrenadante (n = 2) | 2,3 | 0,34 | 0,19 | 0,39 |
| Fractogel EMD- TMAE 650 M (n = 2) | 191 | 0,72 | 0,47 | 0,77 |
| Sephacryl S-400 HR (n = 2) | 192 | 0,91 | 0,56 | 40 |

Ejemplo 22: PEGilación de residuos lisina de FvWdp con PEG SS

El FvWdp se preparó de acuerdo con el Ejemplo 21 y se diluyó con tampón HEPES 20 mM pH 7,4 (que contenía NaCl 150 mM y un 3% de sacarosa) hasta una concentración final de 400 µg/ml. Después se añadió mPEG succinimidil succinato (longitud de cadena: 5 kD) (concentración: 10 mg PEG SS 5000 / mg FvW) y el FvWdp se PEGiló durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se separó el reactivo del FvW PEGilado mediante UF/DF utilizando una membrana de 100 kD de celulosa regenerada (Millipore).

Ejemplo 23: Maduración con furina y purificación del FvWr madurado con furina

143 kg de la fracción de flujo de una columna de anticuerpo anti-FVIII derivada de un proceso de fermentación y purificación de FVIIIr se trataron con furina para eliminar el propéptido de acuerdo con la descripción de Schlokot y col. (Biotechnol. Appl. Biochem. 24: 257-267, 1996) y se filtraron de forma estéril. El proceso se basaba en un trabajo previo (Fischer y col., FEBS Lett. 375: 259-262, 1995; Fischer y col. PCT/AT98/00034[WO 98/38219], 1-33, 1998, 18-2-1998 y Kaersgaard y Barington, J. Chromatogr. B 715: 357-367, 1998).

Después de dilución en un factor cuatro con agua a 16 mS/cm, 633 kg de solución diluida se dispusieron en una columna XK50/15 EMD-TMAE-Fraktogel 650M (300 ml gel; Merck; #K14540281) equilibrada con Tris 10 mM, NaAc 100 mM, NaCl 86 mM, pH 6,5, mS/cm (tampón de equilibrado). La columna se lavó con tampón de equilibrado y se eluyó con NaAc 100 mM, NaCl 250 mM, glicina 100 mM, CaCl₂ 3 mM.

4.506 g de eluato de TMAE se filtraron en Sartoclean GF (0,8 & 0,65 μ) y Sartobran P (0,45 & 0,2 μ), se diluyeron en un factor 1,5 a 29 mS/cm y se bombearon a través de un filtro Mustang Q (#H18770932) para retirar el ADN. Después de un tratamiento SD durante 60 minutos a 22 ± 2°C y dilución en un factor 2 con agua a 16 mS/cm, la solución se dispuso en una columna Amicon 70/29 UNOsphere S (600 ml gel; Bio-Rad, #78960C) equilibrada con tampón de equilibrado del paso de TMAE. La columna se lavó con tampón de equilibrado y se eluyó con tampón de elusión del paso de TMAE.

3.223 g de eluato UNO-S se concentraron en un factor 15 mediante ultrafiltración utilizando una membrana 30 kDa 0,1 m² (Hydrosart #01080217, Sartorius) consistente en celulosa regenerada. Finalmente se purificaron 201 g del concentrado mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna XK50/86.5 Superose 6 Prep Grade equilibrada con NaAc 100 mM, NaCl 500 mM, pH 7,0 (1698 ml gel; GE Healthcare #17-0489-01).

Tabla 3

| Purificación de FvWr procesado con furina | | | | | | |
|---|--|------------------------------|------------------------|------------------------------|--|----------------------------------|
| Muestra | Act. Espec. [UIFvW:Ag/ mg proteína] | FvW:CB/F vW:Ag [UI/UI] | CHO/FvW:A g [ng/UI] | Factor de purif. (CHO) | Factor de purif. por paso (CHO) | FvW: RCo/ FVIII Ag [UI/UI] |
| Material Inicial (n = 4) | 1 | 0,75 | 23678 | 1,0 | 1 | 0,69 |
| 1. Eluato TMAE (n = 5) | 34 | 0,84 | 2766 | 8,6 | 8,6 | 0,62 |
| Mustang Q (n = 4) | 44 | 0,70 | 2405 | 10 | 1,1 | 0,47 |
| Eluato UNO-S (n = 4) | 121 | 0,71 | 329 | 72 | 7,3 | 0,40 |
| Superose 6 PG (n = 2) | 160 | 0,99 | 4 | 6150 | 85 | 0,39 |

Ejemplo 24: PEGilación de FvWr madurado con furina

El FvW madurado con furina se preparó de acuerdo con el Ejemplo 23 y se dializó contra tampón HEPES 20 mM pH 7,4 (que contenía NaCl 150 mM y un 3% de sacarosa). Después, la solución se diluyó a una concentración final de 300 μg/ml con tampón HEPES 20 mM pH 7,4 (que contenía NaCl 150 mM y un 3% de sacarosa). A continuación se añadió mPEG succinimidil succinato (longitud de cadena: 5 kD) (concentración: 25 mg PEG SS 5000 / mg FvW) y el FvW madurado con furina se PEGiló durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, el reactivo se separó del FvW PEGilado mediante UF/DF utilizando una membrana de 100 kD de celulosa regenerada (Millipore).

Ejemplo 25: Caracterización *in vitro* del FvWr madurado con furina

La capacidad de unión a FVIII del FvWr madurado con furina se determinó mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial y ECA, tal como se describe en el Ejemplo 12 y en la Figura 15, respectivamente. Los resultados se compararon con preparaciones de FvW derivado de plasma libre de albúmina preparadas de acuerdo con el Ejemplo 21.

Tal como se demuestra en las Figuras 18 y 19, la capacidad de unión a FVIII del FvWr madurado con furina era comparable a una preparación de referencia derivada de plasma.

Ejemplo 26: Conjugación de FvW con ácido polisialico mediante reticulación con glutaraldehído

Para la conjugación de FvWr con ácido polisialico (ácido colomínico) utilizando glutaraldehído como reactivo de reticulación (Migneault y col., Biotechniques 37: 790-796, 2004), se prepararon 4 ml de una solución de ácido

colomínico (concentración: 20 mg/ml) en tampón HEPES 20 mM (NaCl 150 mM, pH 7,4) y el pH se ajusta a 7,4 mediante adición de NaOH 0,1M. Luego se añadió glutaraldehído hasta obtener una concentración final del 0,01%. A continuación se añadió 1 ml de una solución de FvWr (400 µg/ml) en tampón HEPES 20 mM (NaCl 150 mM, pH 7,4) en partes alícuotas de 100 µl y la mezcla se incubó durante 1 hora bajo agitación suave. Después, la mezcla se dializó, se añadió trehalosa (concentración final: 3%) y el conjugado de FvWr-ácido polisialílico se concentró por ultrafiltración.

Ejemplo 27: Aumento de la vida media del FvW en ratones deficientes en FvW

Como modelo de EvW humana se utilizaron ratones con deficiencia en FvW, descritos por Denis y col. (PNAS 95: 9524-9529, 1998). Grupos de 5 ratones recibieron una inyección de bolo (10 ml/kg) a través de la vena caudal bien con conjugado de FvWr-ácido polisialílico preparado de acuerdo con el Ejemplo 19, bien con FvWr nativo para alcanzar 100 40 U FvW:Ag/kg. Después de anestesia, se preparó plasma de citrato mediante punción cardíaca de los grupos respectivos, 5 minutos, 1, 3, 6, 9 y 21 horas después de la inyección. Los niveles de recuperación de antígeno de FvW y de actividad de FVIII de ratón endógeno se midieron en muestras de plasma. Los resultados de este experimento se resumen en las Figuras 21 y 22.

La vida media del FvW se calculó utilizando el programa MicroMath Scientist (Micromath Research, Saint Luis, MO, EE.UU.) empleando un modelo compartimentado de la biblioteca farmacocinética. El área bajo la curva correspondiente a la actividad de GFVIII se calculó con un modelo trapezoidal con sustracción de la línea base.

La vida media del FvW aumentó de 1,3 horas (FvWr nativo) a 2,4 horas (conjugado de FvWr-ácido polisialílico, la AUC correspondiente al FVIII aumentó de 3,3 U·h/ml a 5,3 U·h/ml, respectivamente.

Ejemplo 28: Acoplamiento de mPEG propionaldehído con grupos lisina por aminación reductora

En primer lugar se preparó una solución de FvWr (400 µg/ml) en tampón fosfato de sodio 0,05M, pH 7,2 y se añadió mPEG propionaldehído (longitud de cadena 5 kDa) hasta obtener una concentración final de 10 mg de mPEG propionaldehído por mg de FvW. Esta mezcla se agitó durante 30 minutos. Después se añadió NaCNBH₃ (1 mg/mg FvWr) y la mezcla se incubó durante 15 horas a temperatura ambiente bajo agitación suave. Luego se añadió una solución acuosa de TRIS 1M (50 µl por mg de NaCNBH₃) y se agitó durante 1 hora para terminar la reacción. A continuación, el FvWr PEGilado se separó de los reactivos por ultradialfiltración/ diafiltración utilizando una membrana de 100 kD (celulosa regenerada/ Millipore).

Ejemplo 29: PEGilación N-terminal de FvW

La PEGilación N-terminal de FvWr se llevó a cabo de acuerdo con la descripción de Lee y col. (Pharm. Res. 20: 818-825, 2003). Se preparó una solución de FvWr (concentración final: 500 µg/ml) en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5,5 y se añadió mPEG propionaldehído (longitud de cadena: 5 kD) (concentración: 10 mg mPEG propionaldehído/mg FvW). La PEGilación se llevó a cabo durante 24 horas a temperatura ambiente en presencia de NaCNBH₃ 2 mM como agente reductor. A continuación, el FvWr PEGilado se separó de los reactivos por ultrafiltración/ diafiltración utilizando una membrana de 100 kD (celulosa regenerada/ Millipore).

Ejemplo 30: PEGilación secuencial de residuos lisina y SH de FvWr

El FvWr se PEGila a través de los residuos de lisina con mPEG succinimidil succinato (longitud de cadena: 5 kD) de acuerdo con el Ejemplo 2. La PEGilación se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora y los reactivos libres se separan del conjugado de FvWr PEG mediante UF/DF contra tampón HEPES 20 mM, pH 7,4, que contenía un 5% de sacarosa, utilizando una membrana de 100 kD (celulosa regenerada/ Millipore). Después, el pH de la solución se ajusta a 7,6 con NaOH 0,1M y se añade mPEG maleimida (longitud de cadena 5 kD/ concentración final 10 mM) para la PEGilación de grupos SH libres. La PEGilación se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente bajo agitación suave. Después, los reactivos se separan de nuevo de la mezcla de reacción utilizando una membrana de 100 kD (celulosa regenerada/ Millipore).

Ejemplo 31: Oxidación enzimática de residuos carbohidrato y PEGilación subsiguiente con PEG-Hz

La oxidación enzimática de los residuos carbohidrato (Wilchek y Bayer, Meth. Enzymol. 138; 429-442, 1987) en FvWr para crear grupos aldehído se lleva a cabo de acuerdo con la descripción de Avigad y col. (J. Biol. Chem. 237: 2736-43, 1962) usando galactosa-oxidasa de *Dactylium dendroides* (Sigma). La solución obtenida se dializa contra tampón fosfato 50 mM, pH 7,2, y se diluye a una concentración de FvW de 400 µg/ml. Después se añade mPEG hidrazida (mPEG Hz) con una longitud de cadena de 5 kD (concentración final: 40 mg mPEG-Hz/mg FvW). La mezcla se incuba a temperatura ambiente bajo agitación suave durante 3 horas. Los reactivos se separan del FvWr PEGilado mediante UF/DF contra tampón HEPES 20 mM (NaCl 150 mM, pH 7,4) que contiene un 5% de sacarosa, utilizando una membrana de 100 kD (celulosa regenerada/ Millipore).

Ejemplo 32: PEGilación de FvWr con bloqueo del sitio de unión de FVIII mediante FVIIIr

Para la preparación de FvWr PEGilado con sitio de unión de FVIII no modificado se preparan 3 ml de una solución que contiene FVIIIr (200 U/ml) y FvWr (40 U FvW:Ag/ml) en tampón HEPES 50 mM (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, 2% trehalosa, pH 7,4) y se incuban durante 1 hora a 37°C. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se añade PEG succinimidil succinato (PEG-SS/longitud de cadena: 5 kD) (concentración final: 1 mg PEG-SS/U FvW:Ag), y luego se incuba durante 1 hora bajo agitación suave. Después se añade CaCl₂ bajo agitación suave hasta obtener una concentración final de 400 mM. Esta solución se dispone en una columna cromatográfica (2,6 x 80 cm) rellena de Sephacryl S-400 HR (Amersham) y el FvWr PEGilado con un sitio de unión libre para FVIII se separa del FVIIIr mediante cromatografía de exclusión por tamaño (tampón de elución: tampón HEPES 50 mM, CaCl₂ 400 mM, pH 7,4).

Ejemplo 33: PEGilación de FvWr con bloqueo del sitio de unión de FVIII mediante heparina

En primer lugar se preparan 5 ml de una solución de FvWr (300 µg/ml) en tampón HEPES 50 mM, pH 7,4, y se añaden a 2 ml de una suspensión de Heparin-Sepharose CL-6B (Amersham Bioscience) en el mismo tampón. La mezcla se incuba durante 2 horas bajo agitación suave y el FvW se une al gel (de Romeuf y Mazurier, Thromb. Hamost. 69: 436-440, 1993). A continuación se añade mPEG succinimidil succinato (200 mg/mg FvW) a la mezcla y se lleva a cabo la PEGilación a temperatura ambiente bajo agitación suave durante 1 hora. La mezcla se diluye con un volumen igual de tampón HEPES, pH 7,4, que contiene NaCl 2M. El gel se separa del sobrenadante por filtración. Después, el gel se lava 3 veces con 2 ml de tampón HEPES, pH 7,4 (HEPES 20 mM, NaCl 1M) y el sobrenadante y se combinan las soluciones de lavado. A continuación, la solución que contiene el FvW PEGilado se concentra por ultrafiltración y se diafiltra contra tampón HEPES 20 mM, pH 7,4 (NaCl 150 mM, 3% sacarosa) utilizando una membrana de 100 kD de celulosa regenerada (Millipore). El derivado obtenido muestra plena capacidad de unión con FVIII usando la tecnología Biacore o el ensayo RECA (los sistemas de ensayo se describen en la Solicitud de Patente Provisional US n° 60/668.378, presentada el 4 de abril de 2005).

Ejemplo 34: Conjugación de FvW con ácido hialurónico

La modificación de los residuos de lisina con ácido hialurónico (AH) se llevó a cabo mediante aminación reductora utilizando ácido hialurónico de Sigma (C 53747). El AH se disolvió en una solución de NaIO₄ recién preparada hasta obtener una concentración final de 5 mg AH/ml. Después se llevó a cabo la oxidación durante 15 minutos en oscuridad y bajo agitación suave. La reacción se detuvo mediante la adición de 2 ml de etilenglicol por ml de solución de AH oxidado y agitación adicional durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La solución se dializó durante la noche contra tampón fosfato de sodio 0,05M, pH 7,2, en oscuridad a 4°C. A continuación se añadió una parte alícuota de esta solución a una solución de FvWr (40 U FvW:Ag/ml) en tampón fosfato de sodio 0,05M, pH 7,2, para obtener una concentración final de 50 mg de AH activado por mg de proteína. Esta mezcla se agitó durante 120 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se añadió NaCNBH₃ (1 mg/mg de proteína) y la mezcla se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente en oscuridad bajo agitación suave. Después se añadieron 100 µl de tampón Tris 1M, pH 7,2, por ml de esta mezcla y se agitó durante 1 hora para terminar la reacción. Los reactivos libres se separaron del conjugado de FvWr AH mediante UF/DF utilizando una membrana de 100 kD (celulosa regenerada/ Millipore).

Ejemplo 35: Caracterización bioquímica *in vitro* de FvW conjugado con PSA

El FvWr se polisialiló de acuerdo con el Ejemplo 19. Además de los parámetros descritos en este ejemplo, como el isoelectroenfoque (Figura 20), la determinación de la capacidad de unión con FVIII mediante ensayo ECA (54%) de acuerdo con el Ejemplo 16 y mediante resonancia de plasmón superficial (70%) de acuerdo con el Ejemplo 12, también se calculó la relación FvW:RCo/FvW:Ag. El nivel de antígeno de FvW se determinó con un sistema de ensayo comercial (Asserachrom vWF, Roche, Basilea, Suiza). La actividad funcional de la preparación se determinó con el ensayo de cofactor de ristocetina de acuerdo con la descripción de Macfarlane y col. (Thromb. Diath. Haemorrh 34: 306-308, 1975). La relación de 0,39 calculada en el caso del material inicial de FvWr disminuye a 0,13 después de la polisialilación.

Ejemplo 36: Conjugación de FvWr con PEG ramificado a través de residuos de lisina

En primer lugar se preparó una solución de FvWr maduro (35 U FvW:Ag/ml) en tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, que contenía un 0,5% de sacarosa, de acuerdo con el Ejemplo 23. Después se añadió a esta solución mPEG succinimidil glutarato (PE-SG/longitud de cadena: 20 kD) suministrado por NOF Corporation (NOF Europe, Grobbendonk, Bélgica) bajo agitación suave (5 mg PEG-SG / mg de proteína) y el pH se ajustó a 7,4 mediante adición gota a gota de NaOH 0,5M. Luego se llevó a cabo la PEGilación bajo agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se dispuso sobre una resina de cromatografía de intercambio iónico equilibrada (Fractogel EMD TMAE 650M) en tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, que contenía un 0,5% de sacarosa. Después se lavó la columna con 20 VC de tampón de equilibrado para eliminar el reactivo en exceso y el FvWr PEGilado se eluyó con tampón de elución (HEPES 20 mM, NaCl 0,5 M, 0,5% de sacarosa, pH 7,4). El eluato se concentró por ultrafiltración/diafiltración con una membrana de celulosa regenerada y

con un corte de peso molecular de 100 kD utilizando un sistema tampón consistente en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5% sacarosa, pH 7,4. El derivado PEGilado obtenido mostraba una relación FvW:RCo/FvW:Ag de 0,79, ligeramente reducida en comparación con el material inicial de FvWr (relación FvW:RCo/FvW:Ag: 0,89). Además, el material inicial de FvWr PEGilado tenía una capacidad de unión con FVIII del 83%, medida mediante el ensayo ECA (Ejemplo 16).

Ejemplo 37: Farmacocinética de FvW conjugado con PEG ramificado en ratones K.O.-FVIII

Como modelo de hemofilia A humana severa se utilizaron ratones con deficiencia de FVIII (Bi y col., Nat. Genet. 10: 119-121, 1995). Grupos de 5 ratones recibieron una inyección de bolo (10 ml/kg) a través de la vena caudal bien con una mezcla de PEG-FvWr (PEG ramificado, SG) y FVIIIr, bien con una mezcla de FvWr nativo y FVIIIr, para alcanzar 30 U de FVIII/ml y 25 U FvW/ml. Cinco minutos, 3, 9, 24 y 32 horas después de la inyección se preparó plasma de citrato de los grupos respectivos mediante punción cardíaca tras anestesia. Los niveles de actividad de FVIII y de recuperación de antígeno de FvW se midieron en muestras de plasma. La Figura 23 y la Figura 24 muestran las curvas de eliminación correspondientes al FvW y el FVIII. La vida media del FvW aumentó de 1,4 a 9,7 horas, el ABC correspondiente al FvW aumentó de 11,8 a 49,2 U·h/ml. La vida media del FVIII aumentó de 1,2 horas (en presencia de FvWr nativo) a 4,4 horas (administrado junto con PEG-FvWr), el área bajo la curva (AUC) aumentó de 12,1 a 30,5 U·h/ml.

Ejemplo 38: Farmacocinética comparativa de FVIII mezclado con diferentes cantidades de PEG-FvW en ratones K.O.-FVIII

Grupos de ratones K.O. con deficiencia de FVIII recibieron una inyección de bolo (10 ml/kg) a través de la vena caudal con diferentes mezclas de PEG-FvWr (PEGilación de residuos de lisina con 25 mg de PEG-SG 20000 ramificado / mg de proteína) y FVIIIr (A: 20 UI PEG-FvWr/ml + 20 UI FVIII/ml; B: 10 UI PEG-FvWr/ml + 20 UI FVIII/ml; C: 3 UI PEG-FvWr/ml + 20 UI FVIII/ml). Para el FvWr PEGilado se calculó una relación de 3 mol PEG/mol de lisina. Mediante la comparación de las mismas cantidades (basadas en unidades) de PEG-FvWr y FVIIIr en las diferentes mezclas de PEG-FvWr/FVIIIr se pudieron calcular las siguientes relaciones de PEG/FVIII: 3:1 (A); 1,5:1 (B); 0,45:1 (C). Después de anestesia se preparó plasma de citrato mediante punción cardíaca de los grupos respectivos 5 minutos, 1, 3, 9 y 24 horas después de la inyección. No se observó ninguna diferencia relevante en la vida media del FVIII (A: 2,1 horas, B: 2,0 horas, C: 2,5 horas) y el AUC (A: 18,9, B: 14,5 y C: 13,2 U·h/ml). En la Figura 25 se muestran las curvas de eliminación correspondientes a FVIII.

Ejemplo 39: Farmacocinética comparativa utilizando preparaciones de PEG-FvW con diferentes grados de PEGilación

Se obtuvieron ratones *knockout* doble FVIII x FvW por cruzamiento de ratones con deficiencia de FVIII y ratones con deficiencia de FvW. Estos ratones padecían deficiencia de FVIII y deficiencia de FvW. A unos grupos de 5 ratones *knockout* doble FVIII x FvW se les administró por infusión a través de la vena caudal una mezcla de FvWr nativo/FVIIIr (100/150 UI/kg), o con FvWr PEGilado #A mezclado con FVIIIr (100/150 UI/kg), o FvWr PEGilado #B mezclado con FVIIIr (150/150 UI/kg). El PEG-FvWr #A (5 mg PEG-SS 5000/mg proteína) y el PEG-FvWr #B (20 mg PEG-SS 5000/mg proteína) se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 24. Para la preparación #A se calculó una relación de 2,5 moles de PEG/mol de lisina y para la preparación #B se calculó una relación de 10 moles de PEG/mol de lisina. Para ello se prepararon muestras de plasma de citrato 5 minutos, 1, 3, 9 y 24 horas después de la administración de la muestra. Los niveles de actividad en plasma de FvW:Ag y FVIII se midieron y expresaron como porcentaje del nivel máximo de plasma, que se alcanza generalmente 5 minutos después de la inyección. En la Figura 26 y la Figura 27 se muestran las curvas de eliminación de FvW y FVIII, respectivamente. La vida media fue de 6,3 horas y 8,1 horas en el caso del PEG-FvWr #A y #B, respectivamente. En el caso del FvWr nativo se calculó una vida media de 2,0 horas. El AUC normalizado (% d máximo x h) en el caso de los dos FvWr PEGilados aumentó de 360 %·h (FvWr nativo) a 901 %·h (#A) y 1.064 %·h (#B). El tiempo de circulación del FVIIIr administrado por coinfusión mejoró mediante el FvWr PEGilado en comparación con el FvW nativo. La vida media del FVIII era de 0,8 horas en presencia de FvWr nativo y aumentó a 1,5 y 1,8 horas cuando se administró por infusión con FvWr PEGilado #A y #B, respectivamente. El AUC para el FVIII era de 214, 370 y 358 %·h.

Ejemplo 40: PEGilación de dímero de FvW

En primer lugar se preparó una solución de dímero de FvW (58 UI FvW:Ag/ml), purificada a partir del medio acondicionado de una línea celular de CHO recombinante (Baxter BioScience), en tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, que contenía un 0,5% de sacarosa. A esta solución se le añadió mPEG succinimidil glutarato ramificado (PE-SG/longitud de cadena: 20 kD) suministrado por NOF Corporation, bajo agitación suave (5 mg PEG-SG/mg proteína) y el pH se ajustó a 7,4 mediante adición gota a gota de NaOH 0,5M. La PEGilación se llevó a cabo bajo agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se dispuso sobre una resina de cromatografía de intercambio iónico equilibrada (Fractogel EMD TMAE 650M) en tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, que contenía un 0,5% de sacarosa. Después se lavó la columna con 20 VC de tampón de equilibrado para eliminar el reactivo en exceso y el FvWr PEGilado se eluyó con tampón de elución (HEPES 20 mM, NaCl 0,5 M, 0,5% de sacarosa, pH 7,4). El eluato se concentró por ultrafiltración/diafiltración con una membrana de

celulosa regenerada (Millipore) y con un corte de peso molecular de 100 kD utilizando un sistema tampón consistente en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5% sacarosa, pH 7,4.

Ejemplo 41: PEGilación y caracterización *in vitro* de FvWr multimérico bajo

5 En primer lugar se purificó un FvWr maduro de acuerdo con el Ejemplo 23. El procedimiento de purificación incluyó pasos de cromatografía de intercambio iónico y un paso de filtración final en gel en Superose 6, realizado en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, en el que el FvWr multimérico alto (17 multímeros) se eluyó en el volumen vacío. El análisis de multímeros de FvW se llevó a cabo de acuerdo con Ruggeri y Zimmerman (Blood 57: 1140-43, 1981) utilizando un gel de agarosa al 1,0%. Después se obtuvo una preparación de FvWr multimérico bajo (6 multímeros) de una fracción lateral, eluyendo con mayores tiempos de retención. Esta fracción se estabilizó mediante la adición de un 0,5% de sacarosa, pH 7,4. Después, el FvWr multimérico bajo se PEGiló utilizando mPEG succinimidil succinato (PEG-SS). El PEG-SS se añadió a esta solución bajo agitación suave (5 mg PEG-SS/mg proteína) y el pH se ajustó a 7,4 mediante adición gota a gota de NaOH 0,5M. La PEGilación se llevó a cabo bajo agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, el reactivo en exceso se retiró por ultrafiltración/diafiltración con una membrana consistente en celulosa regenerada y con un corte de peso molecular de 100 kD utilizando un sistema tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5% sacarosa, pH 7,4. La capacidad de unión con FVIII, determinada mediante el ensayo ECA de acuerdo con el Ejemplo 16, disminuyó ligeramente del 49% en el caso del material inicial al 34% en el caso de la preparación PEGilada. La relación FvW:RCo/FvW:Ag de 0,02 medida en el caso del FvWr multimérico bajo no resultó afectada por el procedimiento de PEGilación.

20 **Ejemplo 42: Derivación de FvW con epítomos de unión con FVIII bloqueados de forma reversible (bloqueo con FVIII y heparina)**

Una columna cromatográfica (15 mm X 148 mm) se rellenó con Heparin HyperD (Bio-Septra) y se equilibró con un tampón de equilibrado consistente en HEPES 20 mM, NaCl 68 mM, 0,5% de sacarosa, pH 7,4. Después, una solución de FvWr maduro (48 UI FvW:Ag / ml) en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5% sacarosa, se diluyó con H₂O para obtener una conductividad de 7-8 mS/cm y se dispuso en dicha columna utilizando un caudal lineal de 1,5 cm/minuto. A continuación, un mPEG succinimidil glutarato ramificado (longitud de cadena: 20 kD) suministrado por NOF Corporation (NOF Europe, Grobbendonk, Bélgica) se disolvió recientemente en 15 ml de tampón de equilibrado para obtener una concentración final de 5 mg PEG-SG / mg de proteína unida. Después, esta solución de reactivo se bombeó en la columna y la PEGilación se llevó a cabo durante 2 horas bajo condiciones estáticas. Luego se lavó la columna con 10 VC de tampón de equilibrado que contenía un 0,05% de lisina. A continuación, el FvWr PEGilado con epítomo de unión con FVIII protegido se eluyó con un tampón HEPES 20 mM, NaCl 1M, 0,5% sacarosa, pH 7,4. Por último, esta solución se concentró mediante ultrafiltración/diafiltración contra tampón HEPES 20 mM, pH 7,4 (NaCl 150 mM, 0,5% sacarosa) utilizando una membrana de 100 kD consistente en celulosa regenerada (Millipore). El derivado obtenido presentaba una relación FvW:RCo/FvW:Ag de 0,48, que era idéntica a la del material inicial de FvWr (relación 0,47). A diferencia del procedimiento de PEGilación de FvWr con PEG-SG 20000 ramificado tal como se describe en el Ejemplo 36, la capacidad de unión con FVIII no resultó afectada por este procedimiento de PEGilación con caperuza de epítomo de FVIII de acuerdo con la medición mediante el ensayo ECA (Ejemplo 16).

Ejemplo 43: Conjugación de FvW con PEG degradable a través de residuos de lisina

Un FvWr maduro se purifica de acuerdo con el Ejemplo 23. Después se prepara una solución de este FvWr (40 U FvW:Ag/ml) en tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, que contiene un 0,5% de sacarosa. A continuación se lleva a cabo la PEGilación mediante la adición de éster N-hidroxisuccinimida de ácido mPEG-(carboximetil)-3-hidroxi-butanoico (longitud de cadena: 5 kD) a esta solución bajo agitación suave (5 mg reactivo PEG/mg proteína) y el pH se ajusta a 7,4 mediante adición gota a gota de NaOH 0,5M. Luego se lleva a cabo la PEGilación bajo agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, el reactivo en exceso se separa el FvWr PEGilado mediante ultrafiltración/diafiltración con una membrana consistente en celulosa regenerada y con un corte de peso molecular de 100 kD utilizando un sistema tampón consistente en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5% sacarosa, pH 7,4.

REIVINDICACIONES

1. Constructo proteínico que no está unido a Factor VIII (FVIII) para su uso en el tratamiento de una alteración hemorrágica asociada a defectos funcionales o a deficiencias de FVIII, de FvW o de ambos en un mamífero, mediante la prolongación de la vida media *in vivo* del FVIII endógeno en la sangre del mamífero; comprendiendo el constructo proteínico
- 5
- a) una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un precursor, subunidad o fragmento de FvW que tiene una actividad biológica del FvW determinada en un ensayo de cofactor de ristocetina o un ensayo de unión de colágeno, y dímeros y multímeros de los mismos; y
- 10 b) al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a dicha molécula de FvW;
- teniendo dicho constructo la capacidad de unirse a la molécula de FVIII endógena del mamífero y, cuando se administra al mamífero, la vida media *in vivo* del constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula de FvW, y la vida media *in vivo* de la molécula de FVIII endógena unida a dicho constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula de FVIII unida a FvW y no unida con al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable.
- 15
2. Constructo proteínico que no está unido a Factor VIII (FVIII) para su uso en el tratamiento de una alteración hemorrágica asociada a defectos funcionales o a deficiencias de FVIII, de FvW o de ambos en un mamífero, mediante la prolongación de la vida media *in vivo* del FVIII o de un precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII en la sangre del mamífero; comprendiendo el constructo proteínico
- 20
- a) una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un precursor, subunidad o fragmento de FvW que tiene una actividad biológica del FvW determinada en un ensayo de cofactor de ristocetina o un ensayo de unión de colágeno, y dímeros y multímeros de los mismos; y
- 25 b) al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a dicha molécula de FvW; administrándose al mamífero una primera dosis de al menos una molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII;
- teniendo dicho constructo la capacidad de unirse a la molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII administrado y, cuando se administra al mamífero, la vida media *in vivo* del constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula de FvW, y la vida media *in vivo* de la molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII administrado unido a dicho constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula o precursor, subunidad o fragmento de FVIII unido a FvW y no unido con al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable.
- 30
3. Molécula de FVIII o un precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII, para su uso en el tratamiento de una alteración hemorrágica asociada a defectos funcionales o deficiencias de FVIII, de FvW o de ambos en un mamífero, mediante la prolongación de la vida media *in vivo* del FVIII o de un precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII en la sangre del mamífero;
- 35
- administrándose al mamífero una primera dosis de al menos un constructo proteínico que no está unida a FVIII y que comprende:
- 40
- a) una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un precursor, subunidad o fragmento de FvW que tiene una actividad biológica del FvW determinada en un ensayo de cofactor de ristocetina o un ensayo de unión de colágeno, y dímeros y multímeros de los mismos; y
- 45 b) al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a dicha molécula de FvW;
- teniendo dicho constructo la capacidad de unirse a la molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII administrado y, cuando se administra al mamífero, la vida media *in vivo* del constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula de FvW, y la vida media *in vivo* de la molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII administrado unido a dicho constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula o precursor, subunidad o fragmento de FVIII unido a FvW y no unido con al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable.
- 50
4. Complejo para su uso en el tratamiento de una alteración hemorrágica asociada a defectos funcionales o a deficiencias de FVIII, de FvW o de ambos en un mamífero, mediante la prolongación de la vida media *in vivo* del FVIII o de un precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII en la sangre del mamífero; comprendiendo el complejo:
- 55

un constructo proteínico que incluye

- a) una molécula de FvW seleccionada de entre el grupo consistente en factor de von Willebrand (FvW) plasmático, FvW recombinante, un precursor, subunidad o fragmento de FvW que tiene una actividad biológica del FvW determinada en un ensayo de cofactor de ristocetina o un ensayo de unión de colágeno, y dímeros y multímeros de los mismos; y
- b) al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a dicha molécula de FvW; y

una molécula de FVIII o un precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII, unido al constructo proteínico;

y, cuando se administra al mamífero, la vida media *in vivo* de dicho constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula de FvW, y la vida media *in vivo* de la molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII unido al constructo se incrementa en comparación con la vida media *in vivo* de la molécula o precursor, subunidad o fragmento de FVIII unido a FvW y no unido con al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable.

5. Constructo proteínico para su uso según la reivindicación 2, o molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII para su uso según la reivindicación 3, caracterizado porque se administra la molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII o para la administración simultánea con dicho constructo proteínico.
6. Constructo proteínico para su uso según la reivindicación 2, o molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII para su uso según la reivindicación 3, caracterizado porque se administra o se administra secuencialmente la molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII antes o después de la administración de dicho constructo proteínico.
7. Constructo proteínico para su uso según la reivindicación 1 o 2, o molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII para su uso según la reivindicación 3, o complejo para su uso según la reivindicación 4, caracterizado porque dicha o dichas moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables están unidas a un residuo carbohidrato de dicho FvW o dicho precursor, subunidad o fragmento de FvW.
8. Constructo proteínico para su uso según la reivindicación 1 o 2, o molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII para su uso según la reivindicación 3, o complejo para su uso según la reivindicación 4, caracterizado porque dicha o dichas moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables están unidas a un residuo lisina de dicho FvW o dicho precursor, subunidad o fragmento de FvW.
9. Constructo proteínico para su uso según la reivindicación 1 o 2, o molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII para su uso según la reivindicación 3, o complejo para su uso según la reivindicación 4, caracterizado porque dicha molécula polimérica fisiológicamente aceptable se selecciona de entre el grupo consistente en poli(alquilenglicol), poli(propilenglicol), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioli poli(oxetilado), alcohol poli(olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmacrilamida), poli(hidroxiálquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), alcohol poli(vinílico), polifosfaceno, polioxazolona y poli(N-acrilolmorfolina).
10. Constructo proteínico para su uso según la reivindicación 1 o 2, o molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII para su uso según la reivindicación 3, o complejo para su uso según la reivindicación 4, caracterizado porque dicha molécula polimérica fisiológicamente aceptable es polietilenglicol (PEG) o un derivado del mismo.
11. Constructo proteínico para su uso según la reivindicación 1 o 2, o molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII para su uso según la reivindicación 3, o complejo para su uso según la reivindicación 4, caracterizado porque dicha molécula polimérica fisiológicamente aceptable es ácido polisiálico (PSA) o un derivado del mismo.
12. Constructo proteínico para su uso según la reivindicación 1 o 2, o molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII para su uso según la reivindicación 3, o complejo para su uso según la reivindicación 4, caracterizado porque el FvW incluido en dicho constructo mantiene la actividad biológica de FvW de acuerdo con la determinación en un ensayo de cofactor de ristocetina o un ensayo de unión de colágeno.
13. Constructo proteínico para su uso según la reivindicación 1 o 2, o molécula de FVIII o precursor, subunidad o fragmento de FVIII que tiene la actividad biológica del FVIII para su uso según la reivindicación

3, o complejo para su uso según la reivindicación 4, caracterizado porque el FvW o dicho precursor, subunidad o fragmento de FvW es un producto recombinante.

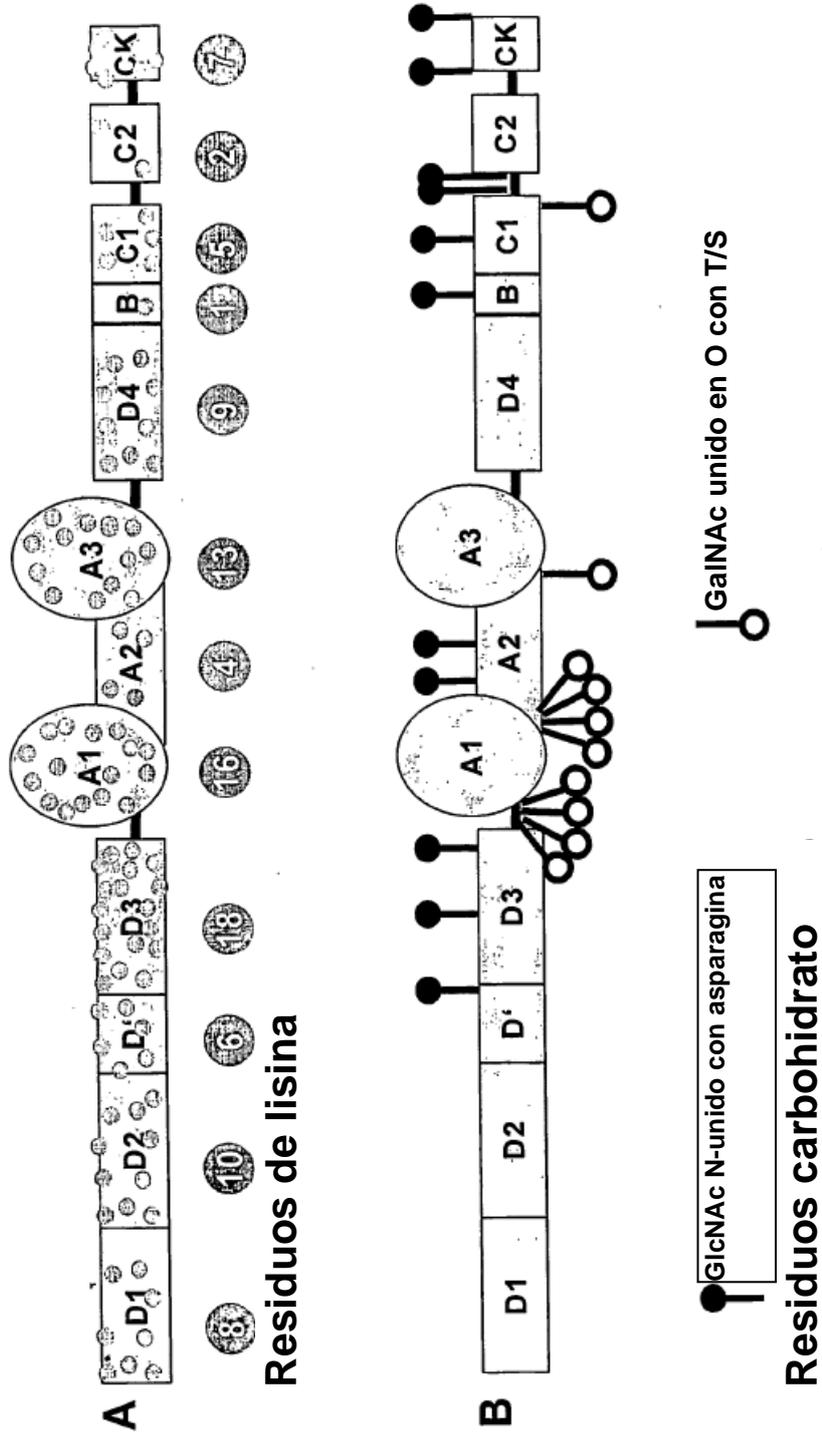


Figura 1

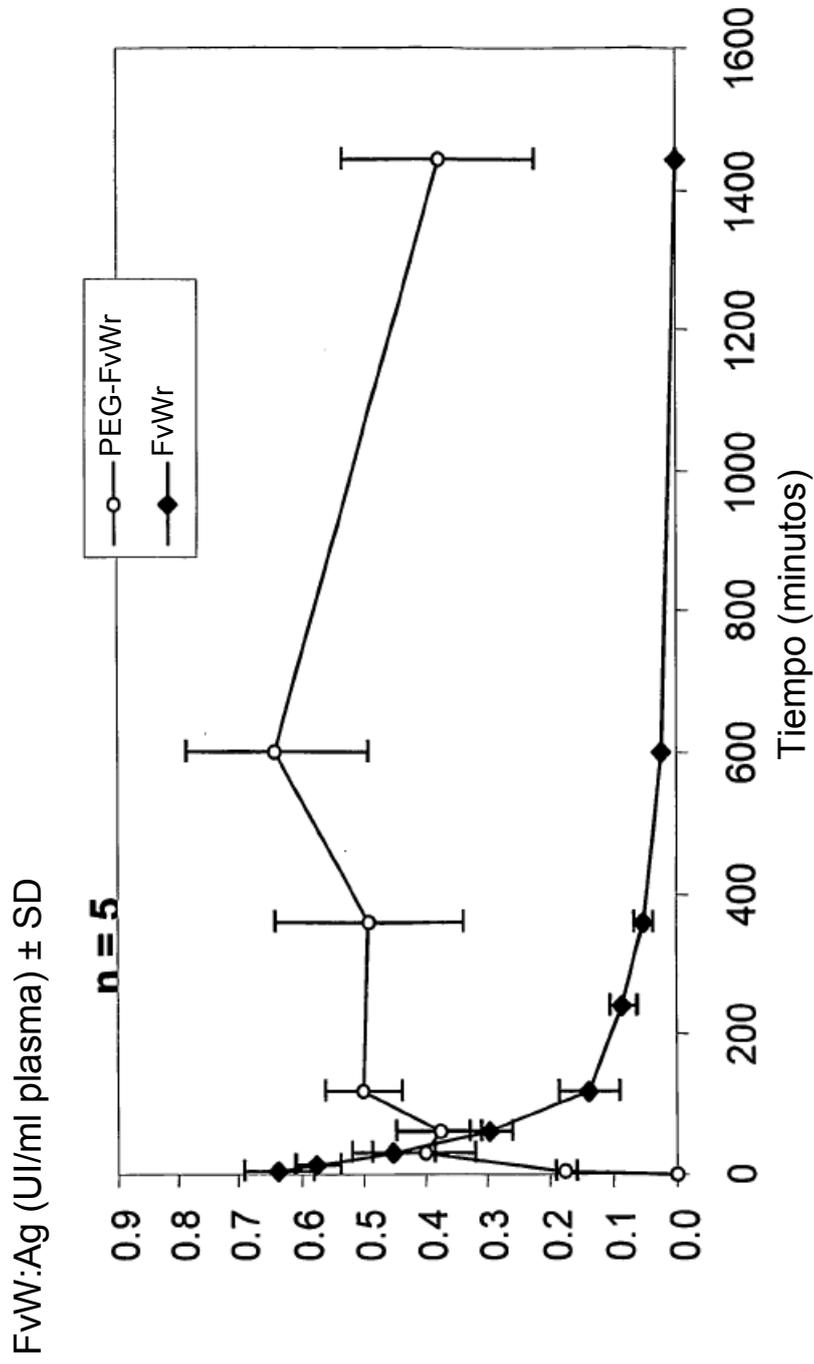


Figura 2

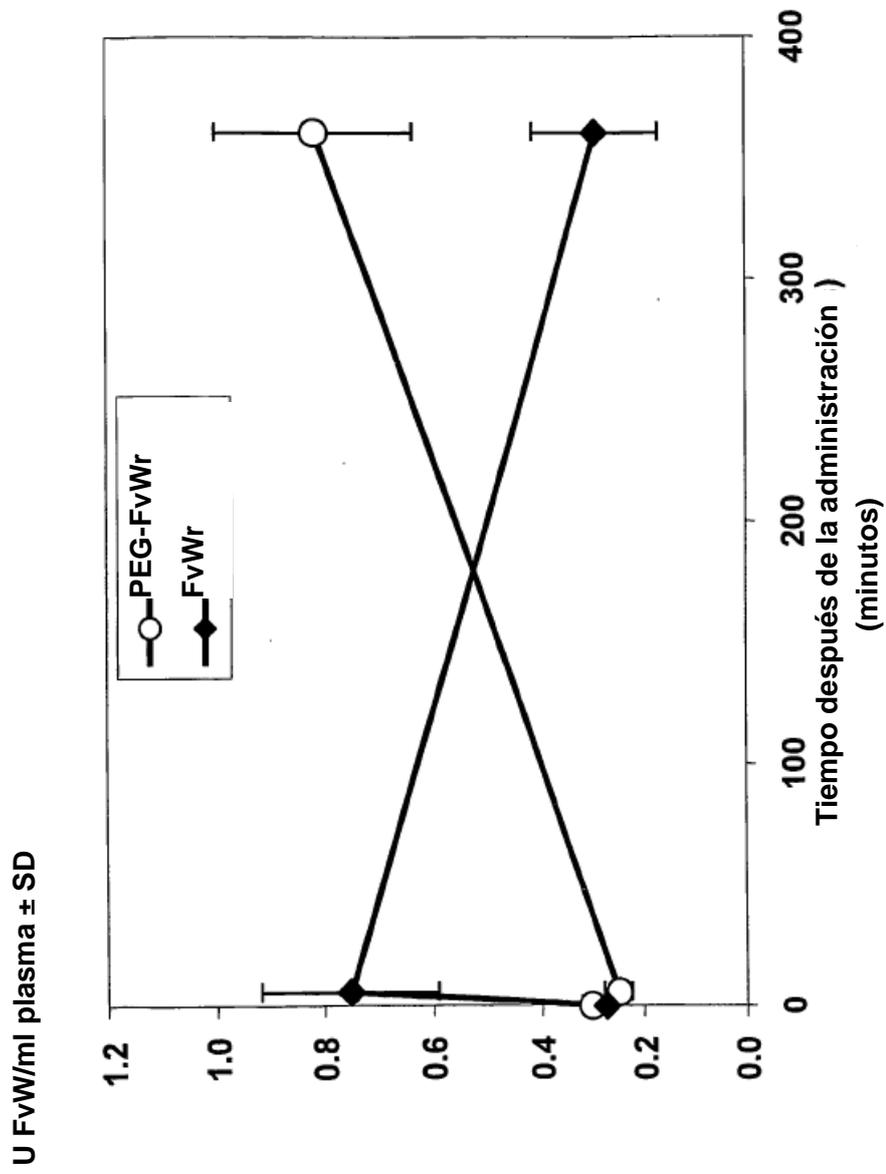


Figura 3

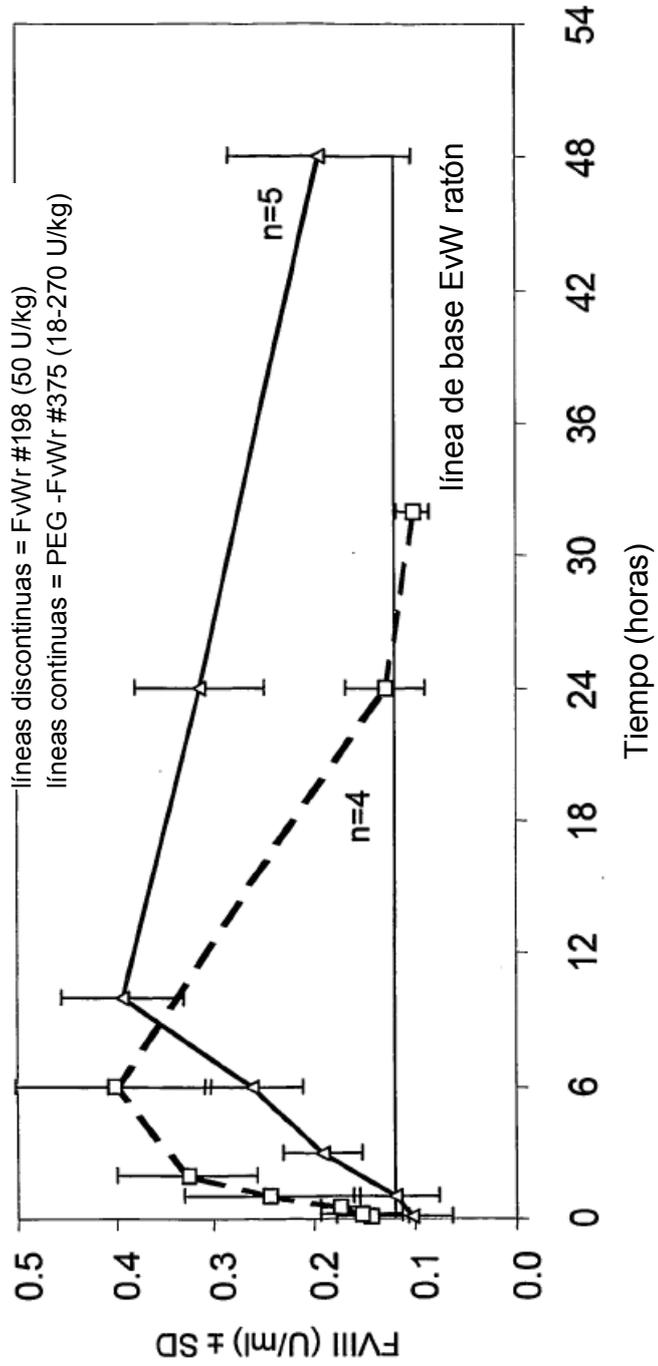


Figura 4

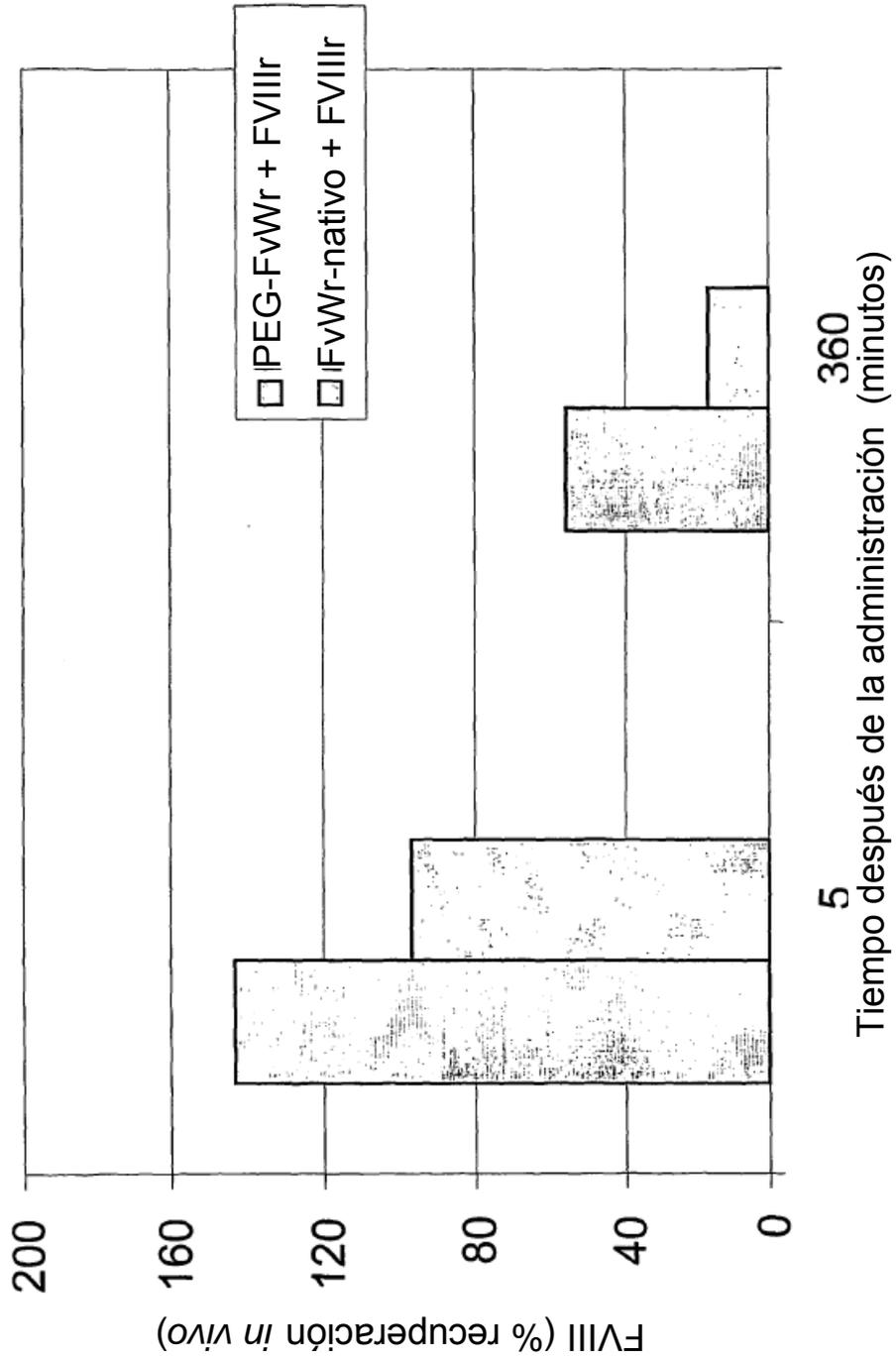


Figura 5

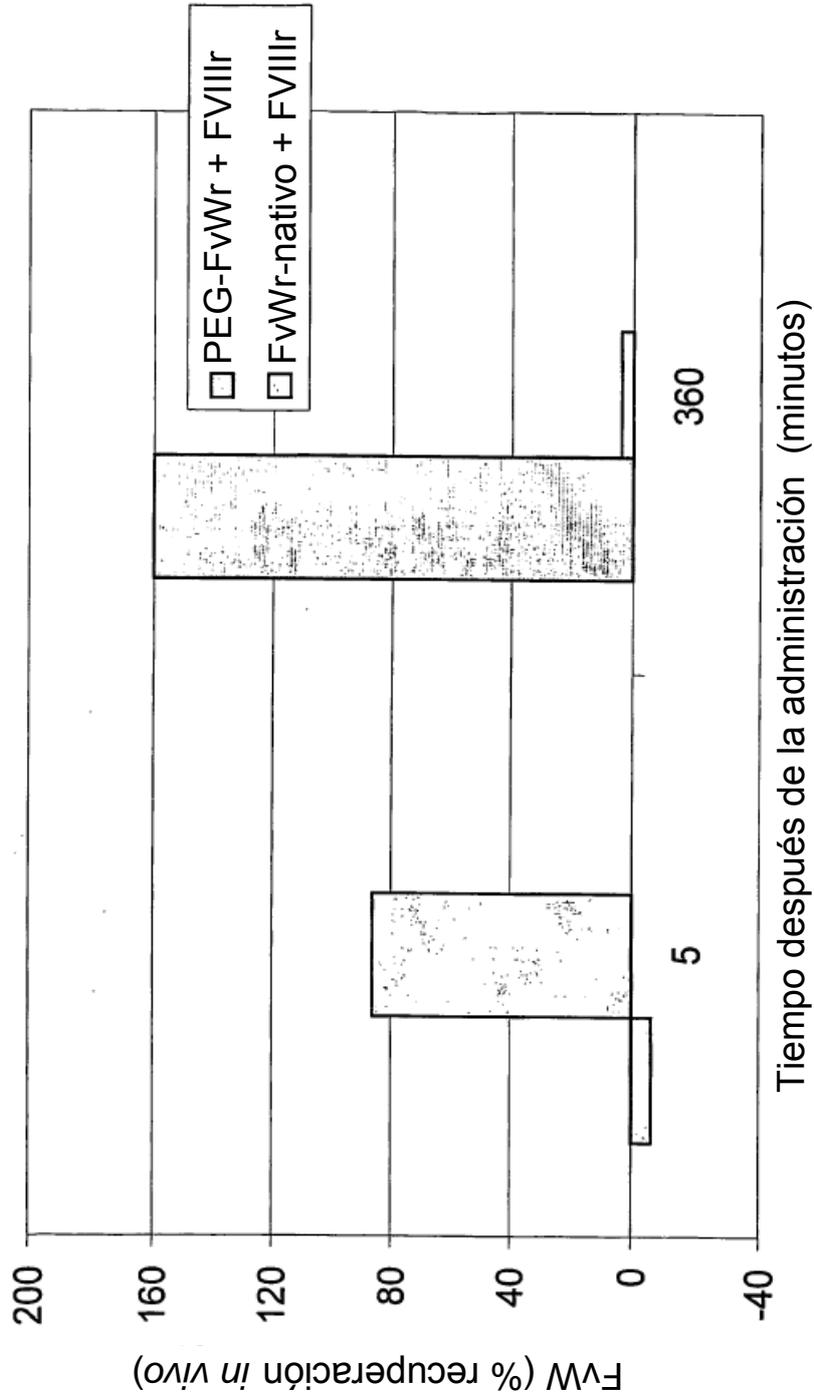


Figura 6

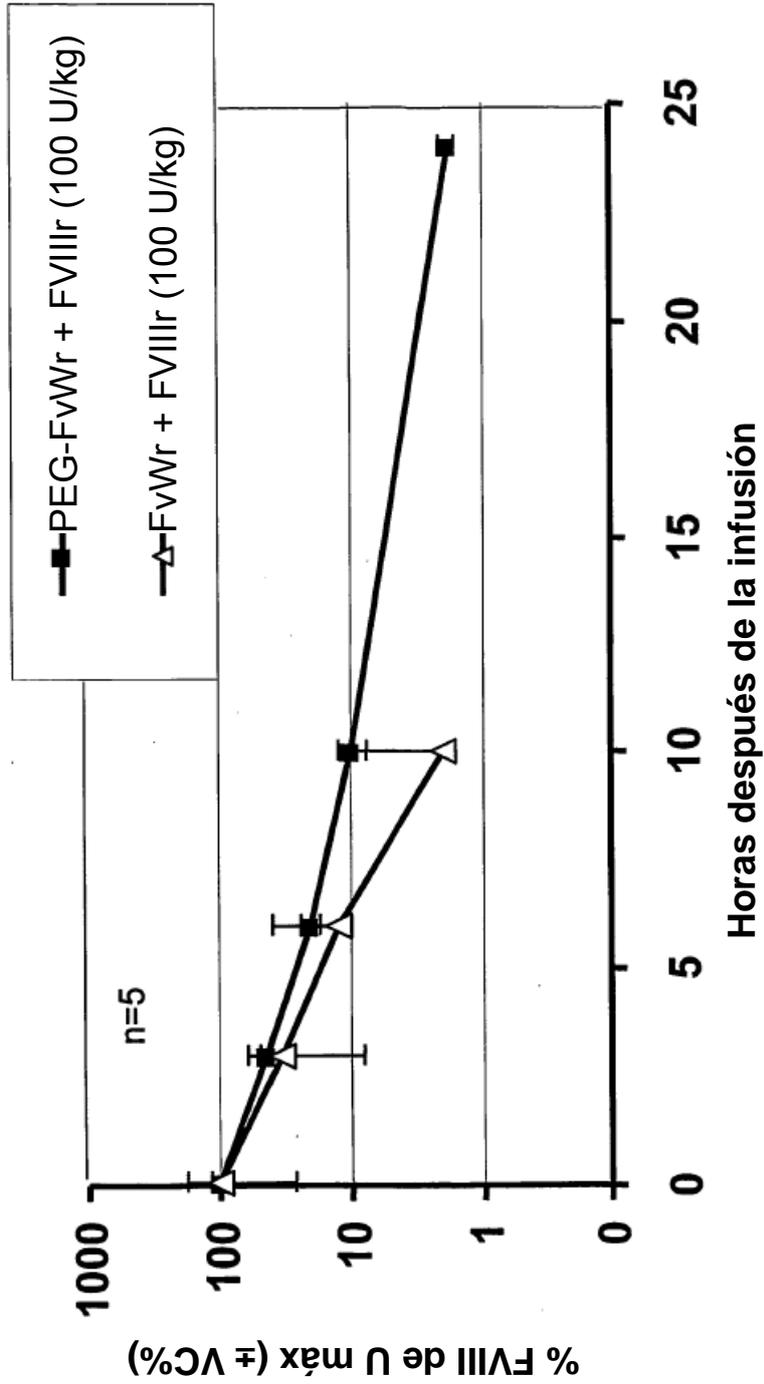


Figura 7

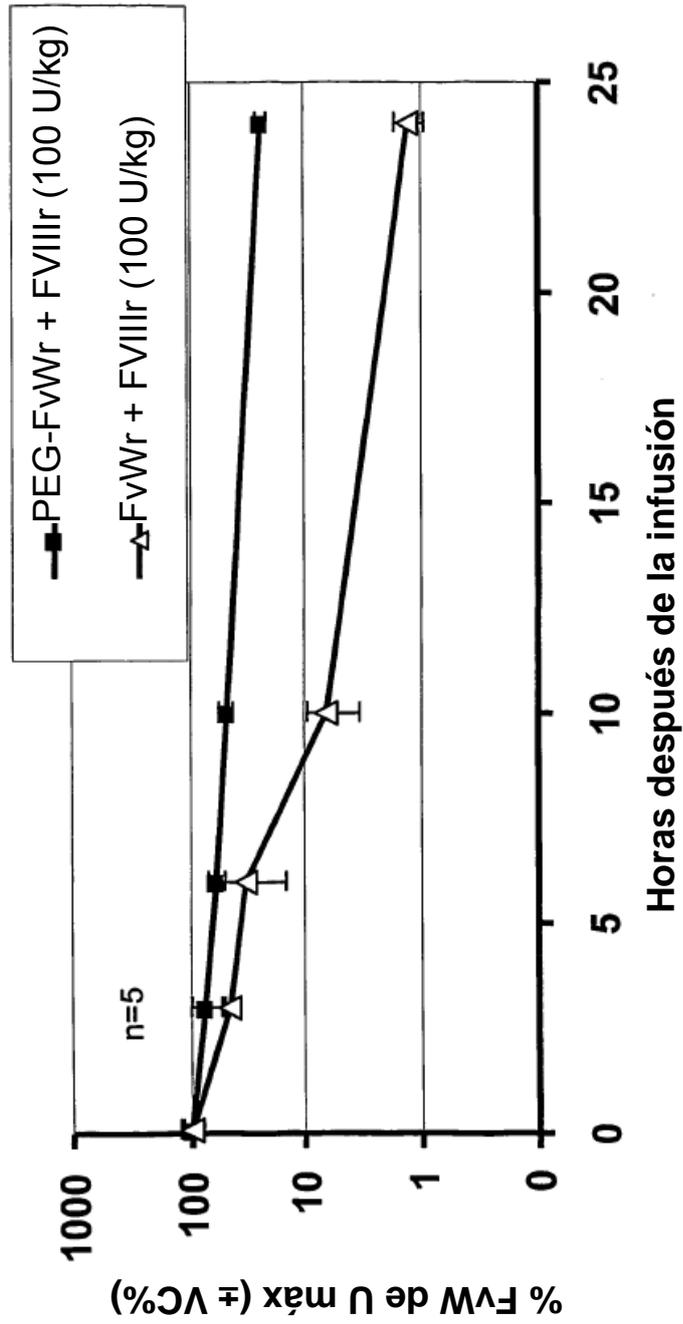


Figura 8

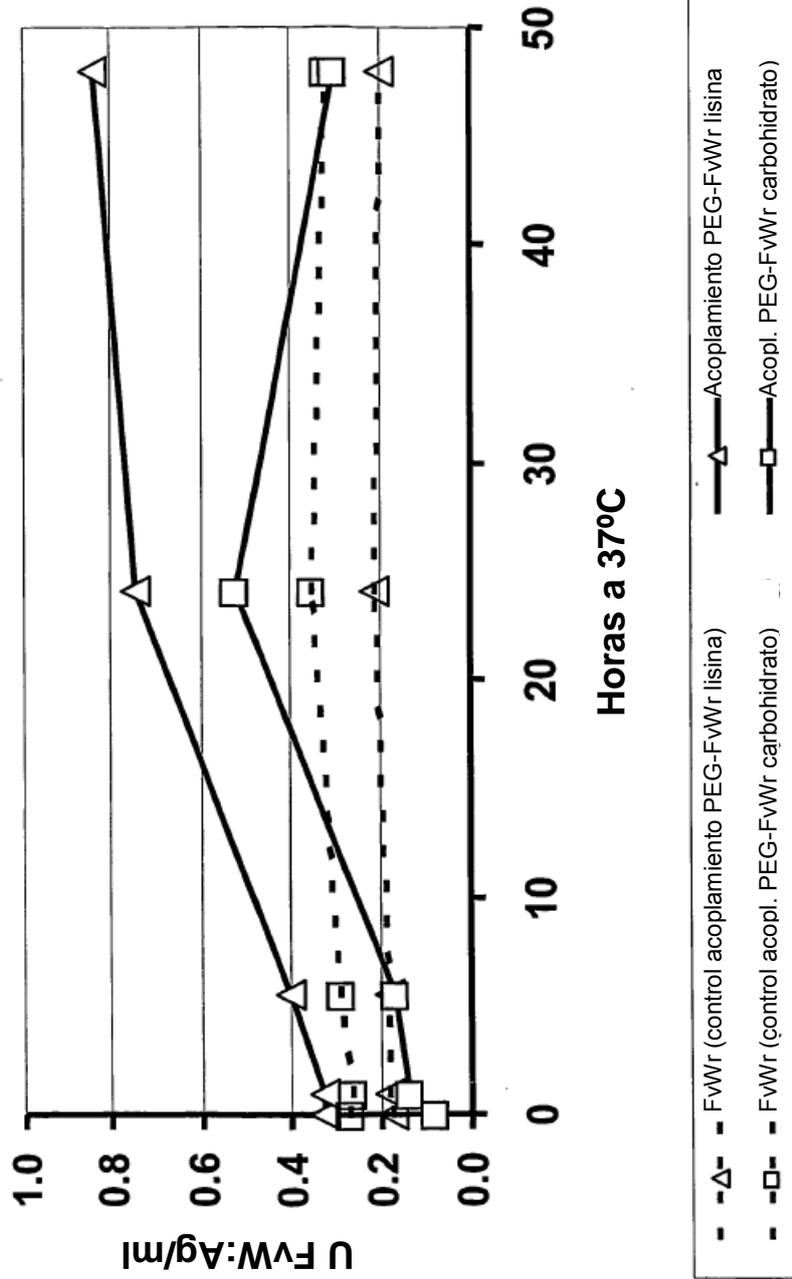


Figura 9

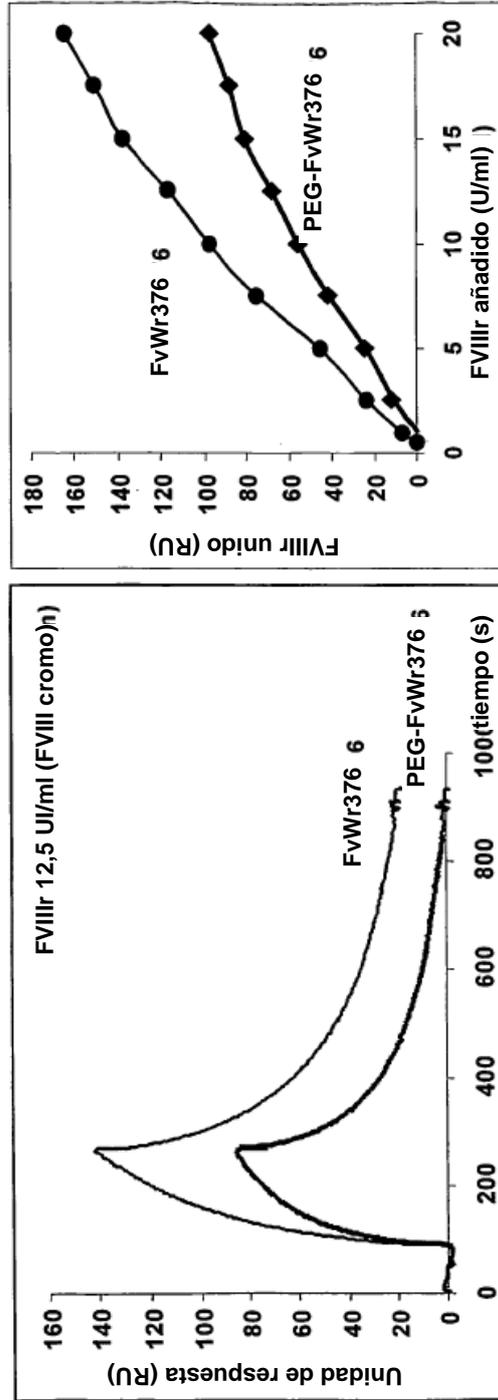
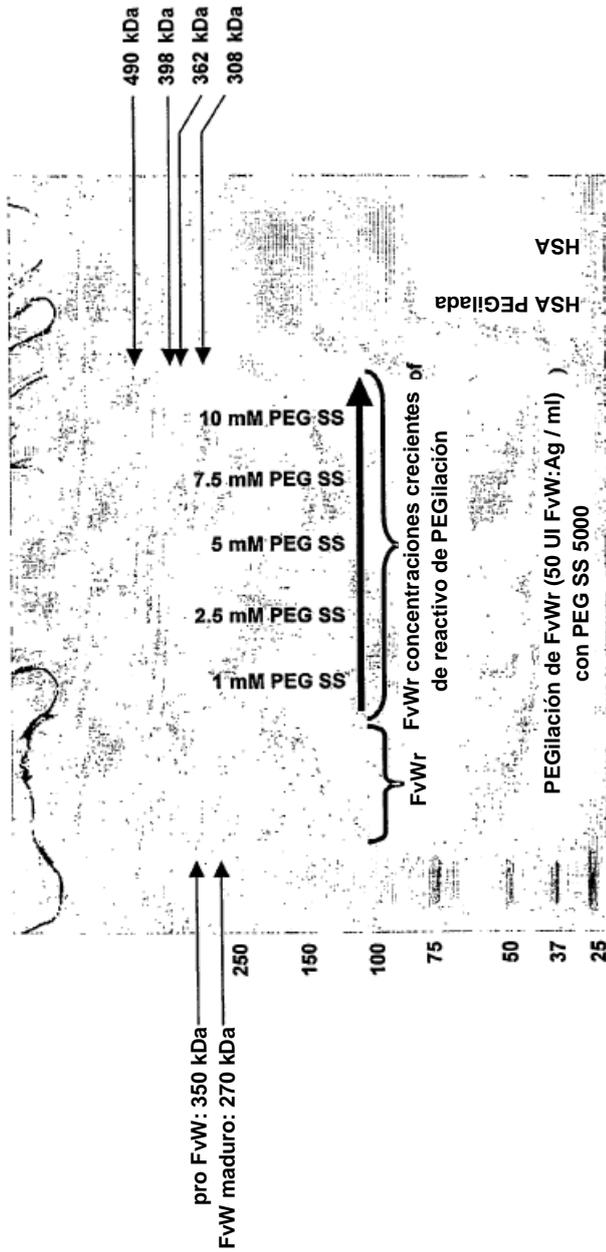


Figura 10



Mecanismo de PEGilación:

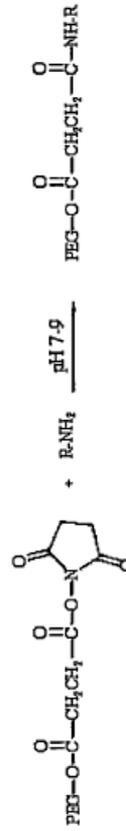


Figura 11

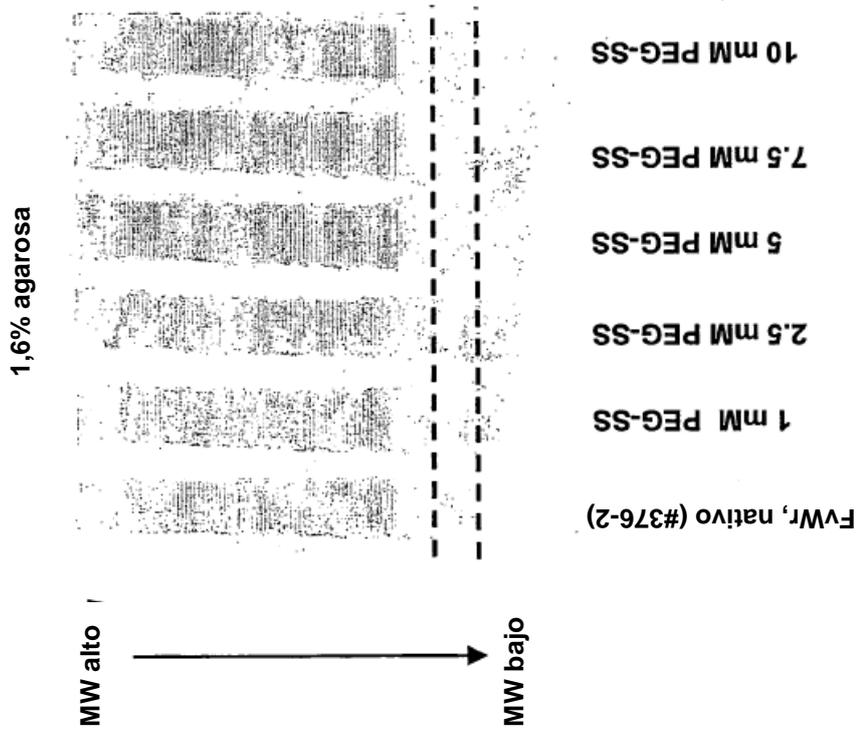


Figura 12

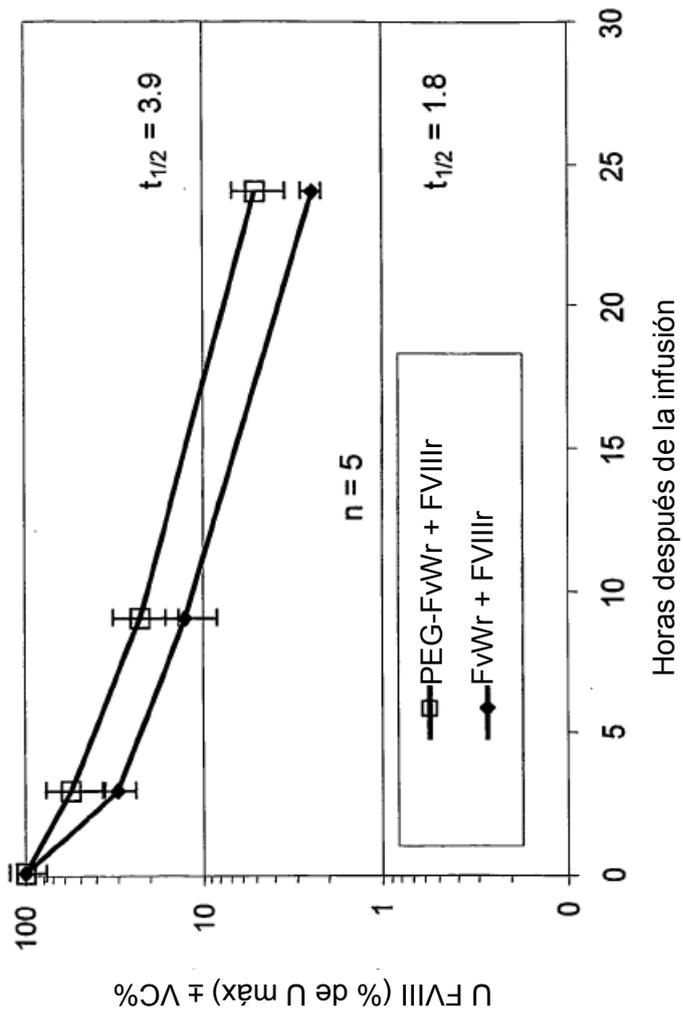


Figura 13

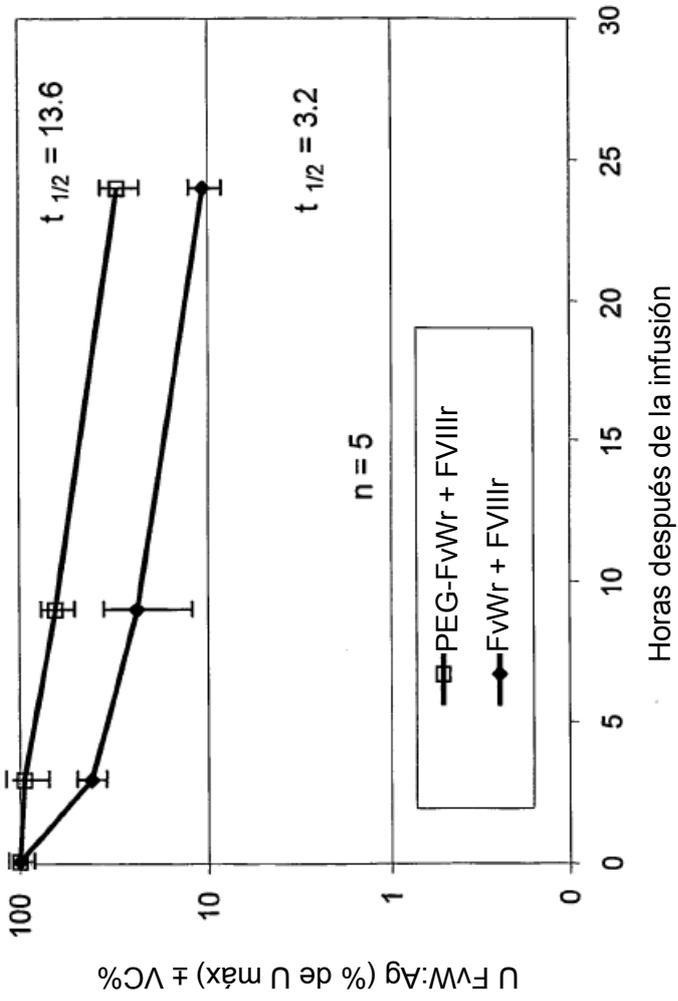


Figura 14

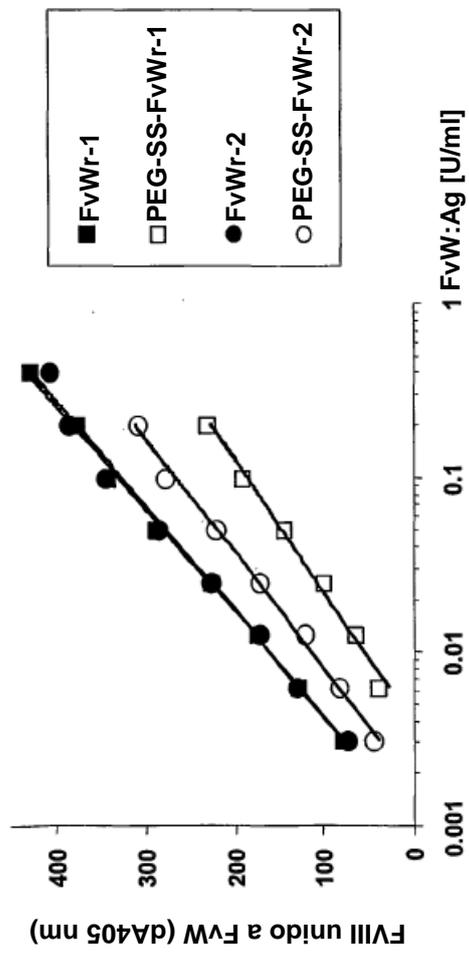


Figura 15

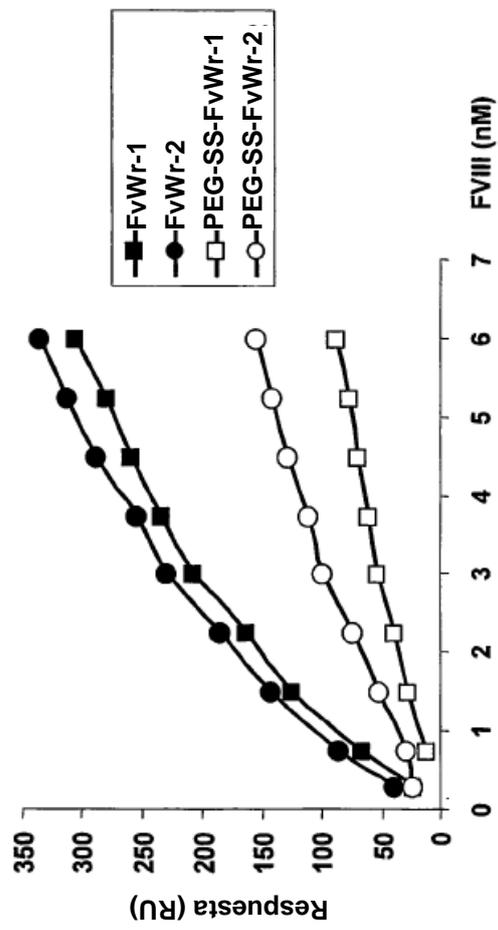


Figura 16

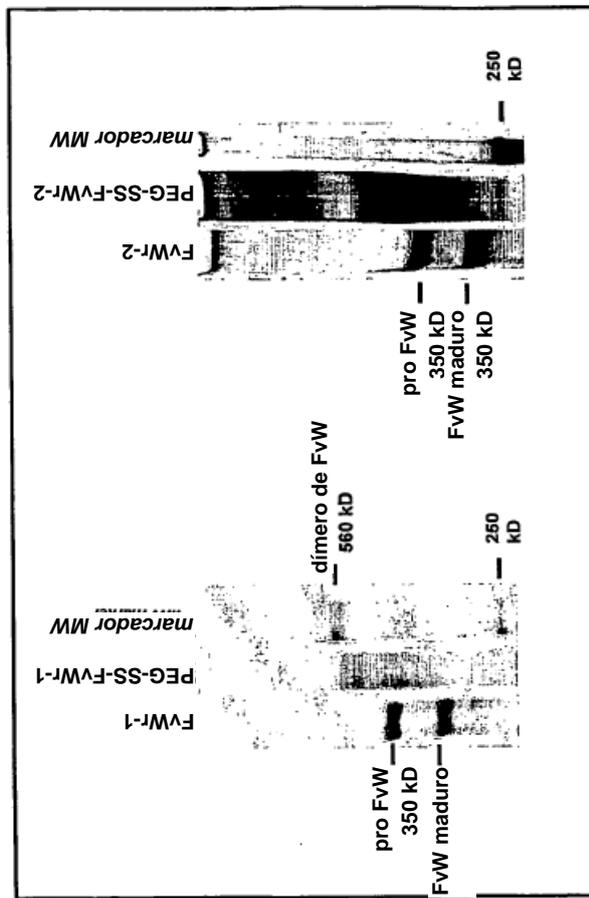


Figura 17

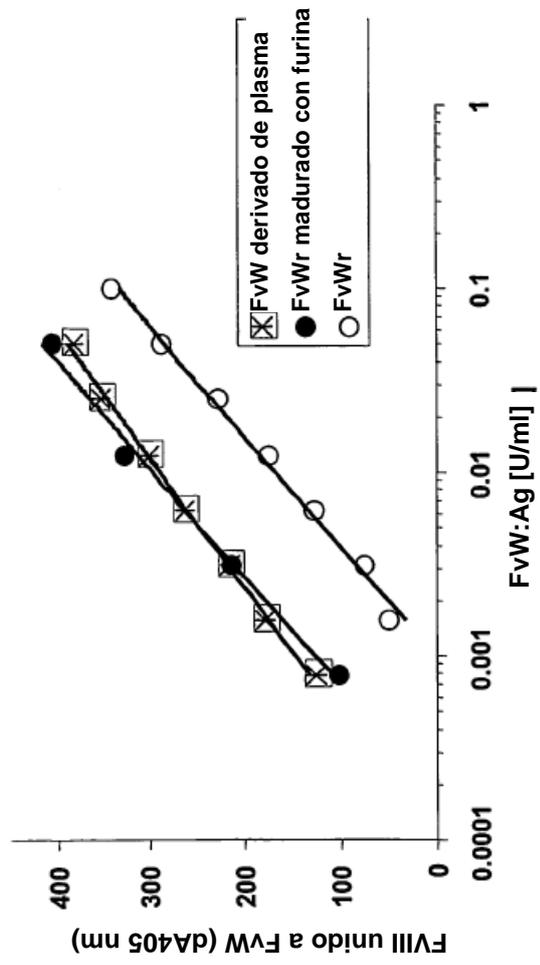


Figura 18

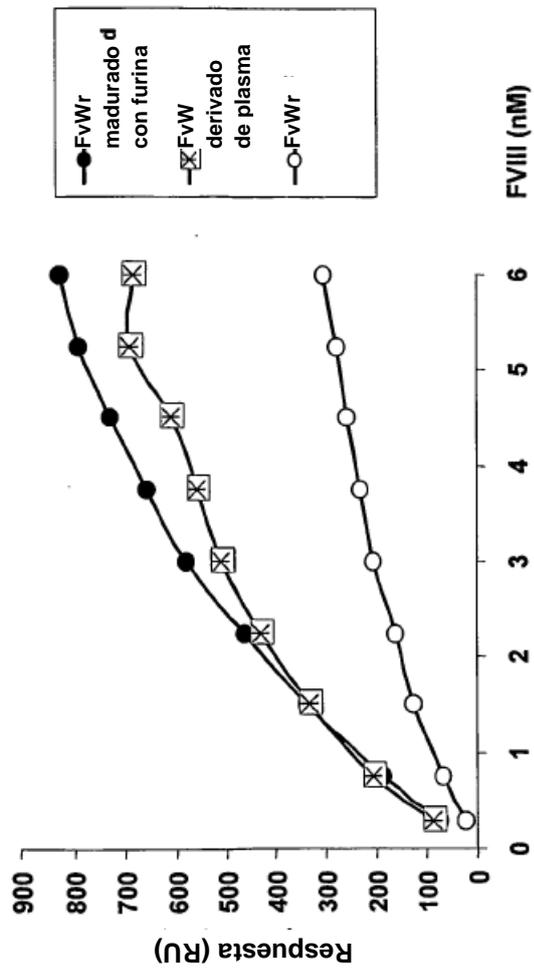


Figura 19

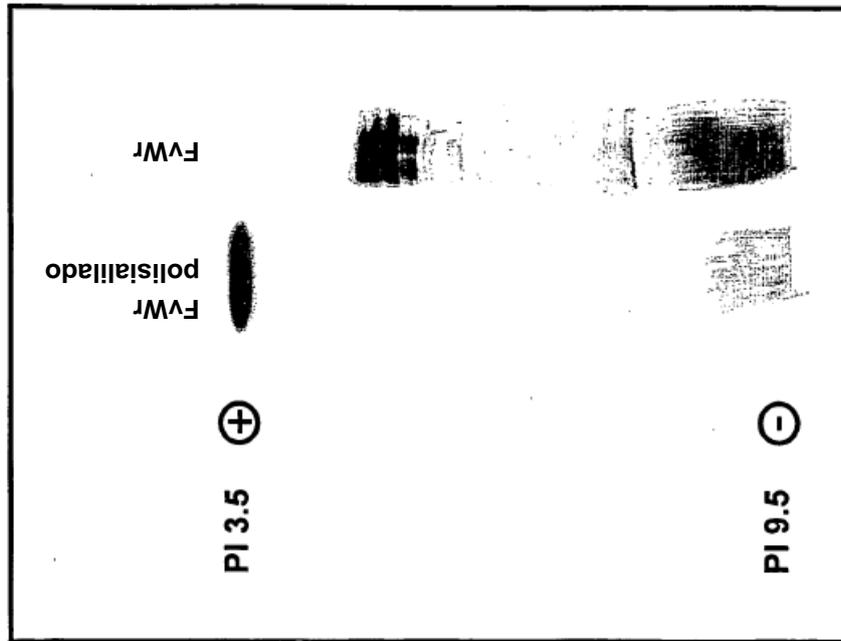


Figura 20

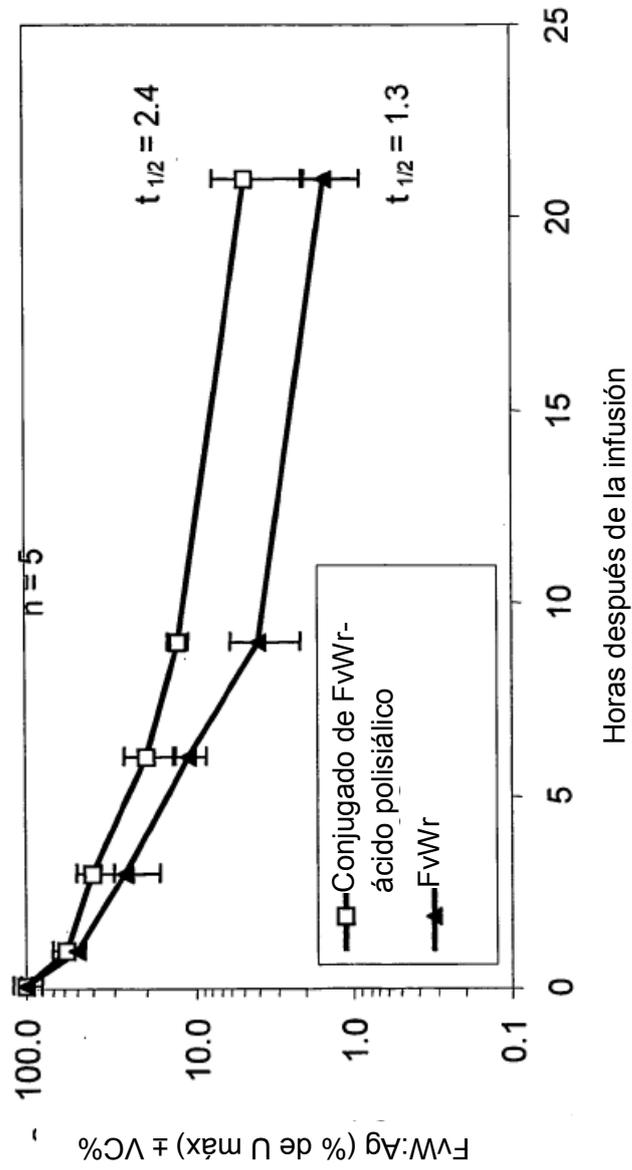


Figura 21

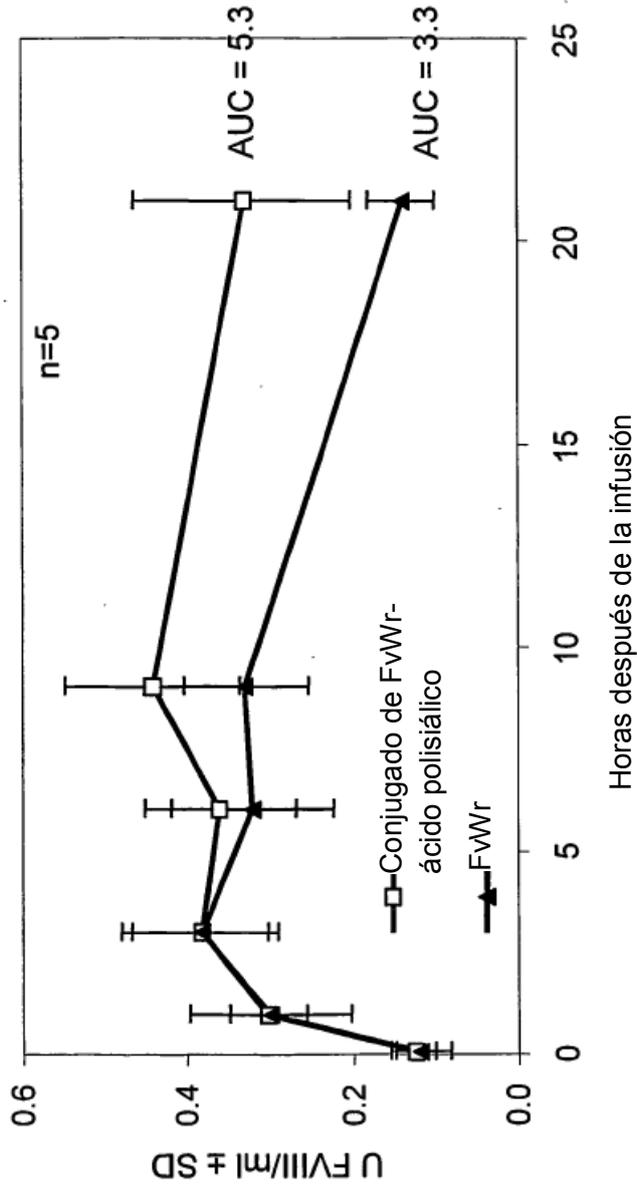


Figura 22

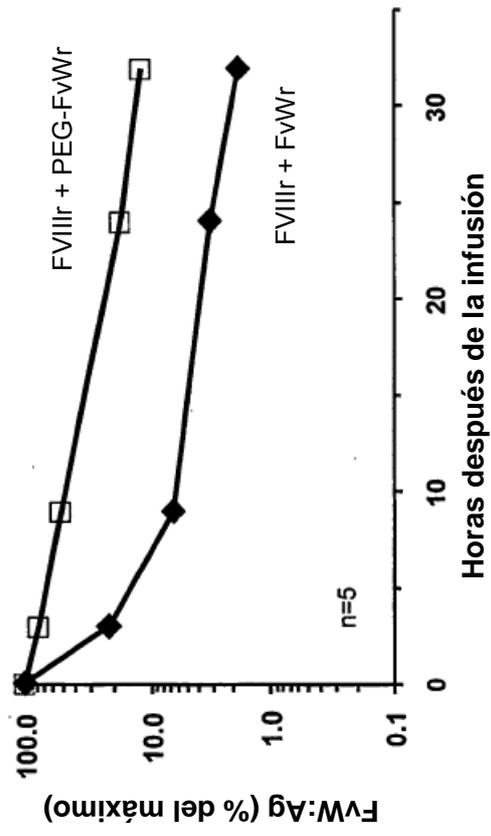


Figura 23

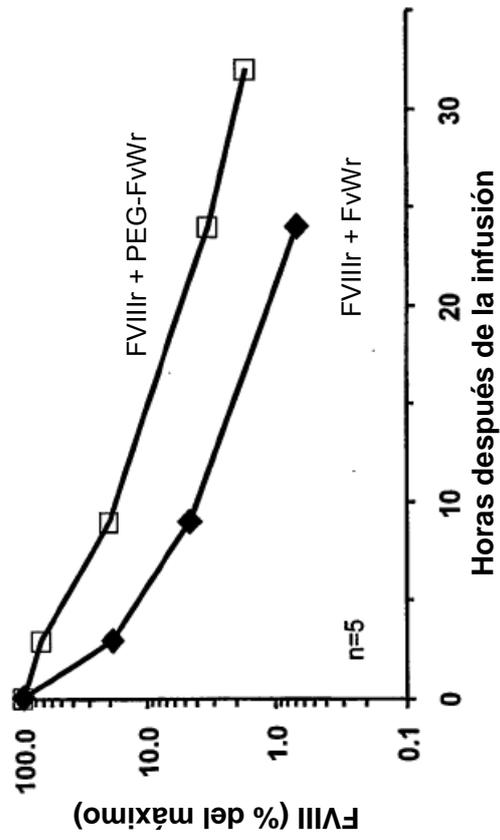


Figura 24

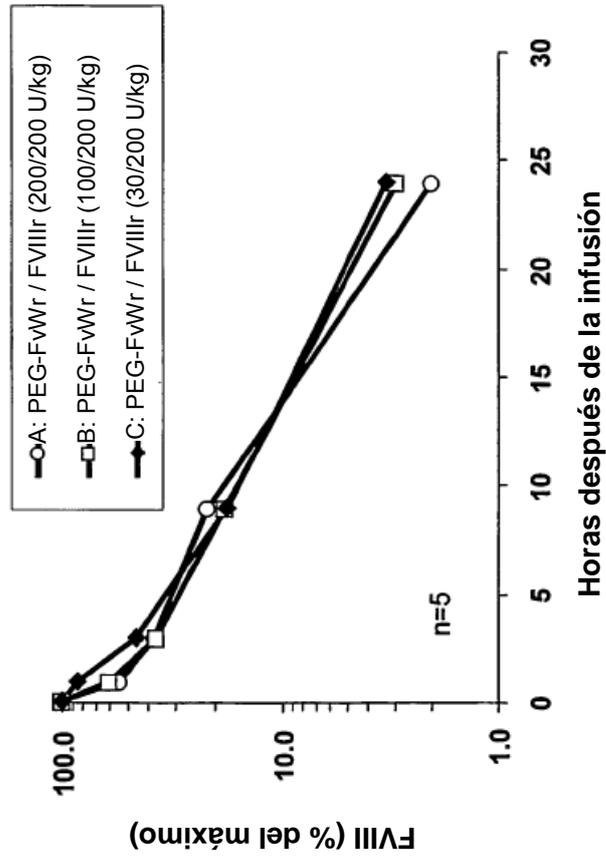


Figura 25:

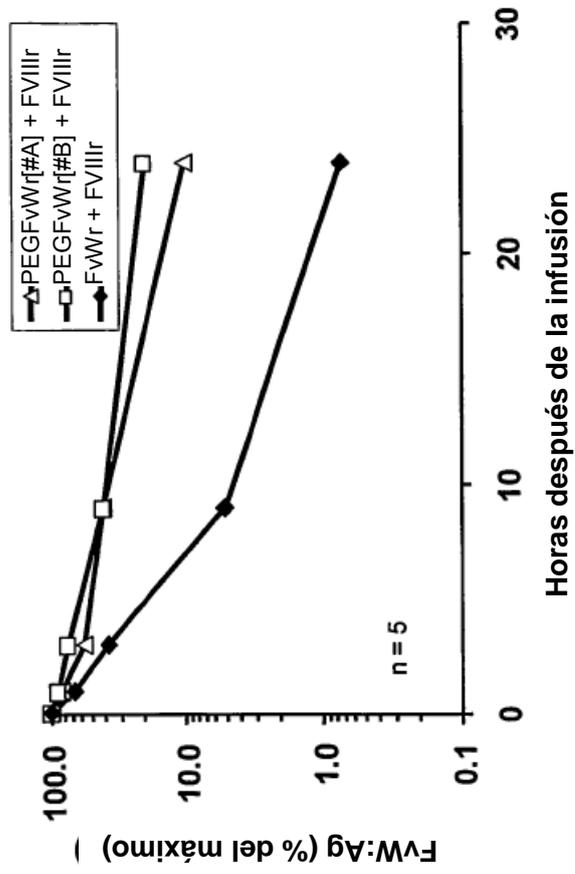


Figura 26

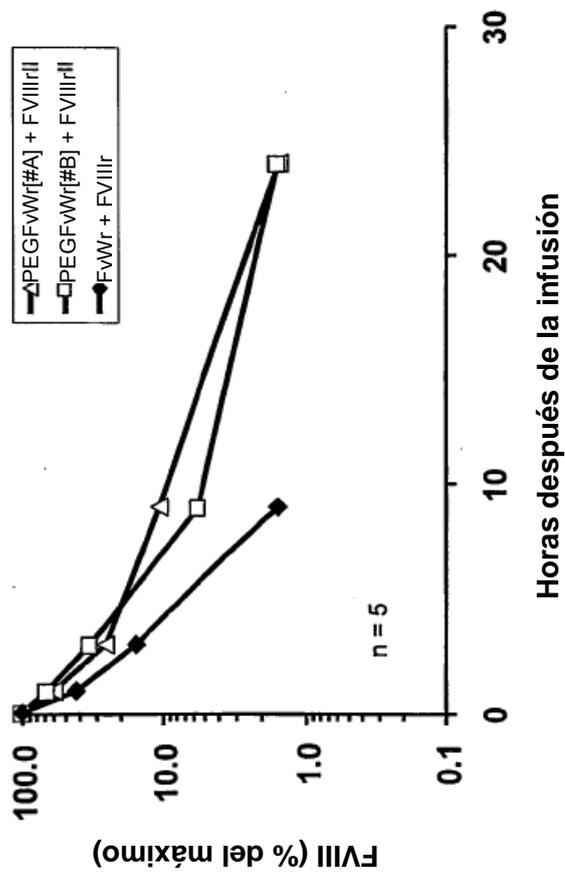


Figura 27