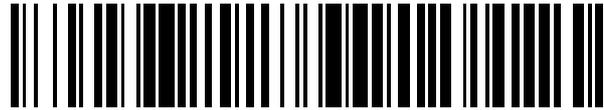


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 941**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2009 E 09748174 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2349341**

54 Título: **Pegilación de factores de coagulación sanguínea recombinantes en presencia de anticuerpos enlazados**

30 Prioridad:

15.10.2008 US 105548 P

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

07.02.2014

73 Titular/es:

**BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark (Opfikon), CH y
BAXTER INTERNATIONAL INC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MITTERER, ARTUR;
GRANINGER, MICHAEL y
HASSLACHER, MEINHARD**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 441 941 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

Pegilación de factores de coagulación sanguínea recombinantes en presencia de anticuerpos enlazados.

5 La presente invención se refiere a un método para conjugar el factor de coagulación sanguínea VIII (FVIII) con un polímero soluble en agua, incluyendo un óxido de (poli)alquileo tal como polietilenglicol (PEG) en presencia de anticuerpos enlazados. También se describen métodos para prolongar la vida media *in vivo* del FVIII en la sangre de un mamífero que padece un trastorno hemorrágico asociado a defectos funcionales o deficiencias de FVIII.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

20 El FVIII también se sintetiza como una proteína recombinante para uso terapéutico en caso de alteraciones hemorrágicas. Ya se han concebido diversos ensayos *in vitro* para determinar la eficacia potencial del FVIII recombinante (FVIIIr) como medicina terapéutica. Estos ensayos emulan los efectos *in vivo* del FVIII endógeno. El tratamiento de FVIII con trombina *in vitro* conduce a un rápido aumento y disminución subsiguiente de su actividad procoagulante, según medidas en ensayos *in vitro*. Esta activación e inactivación coincide con una proteólisis limitada específica tanto en las cadenas pesadas como en las ligeras que altera la disponibilidad de diferentes epítomos de unión en FVIII, por ejemplo permitiendo que el FVIII se disocie del FVW y se una a una superficie fosfolipídica o alterando la capacidad de unión a determinados anticuerpos monoclonales.

25 La falta o disfunción del FVIII está asociada al trastorno hemorrágico más frecuente, la hemofilia A. El tratamiento preferente para la hemofilia A es la terapia de sustitución con derivado plasmático o con concentrados de FVIIIr. En general, los pacientes de hemofilia A grave con niveles de FVIII por debajo del 1% se someten a una terapia profiláctica con el fin de mantener el FVIII por encima del 1% entre dosis. Teniendo en cuenta las vidas medias de los diversos productos de FVIII en la circulación, esto se consigue normalmente administrando FVIII dos o tres veces por semana.

30 En el mercado existen muchos concentrados para el tratamiento de la hemofilia A. Uno de estos concentrados es el producto recombinante Advate®, que se produce en células CHO y es fabricado por Baxter Healthcare Corporation. No se añade ninguna proteína o albúmina de plasma humano o animal en el proceso de cultivo celular, la purificación o la formulación final de este producto.

35 El objetivo de muchos fabricantes de concentrados de FVIII y fármacos de polipéptidos terapéuticos es desarrollar un producto de nueva generación con propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas mejoradas, manteniendo todas las demás características del producto.

40 Con frecuencia, los fármacos de polipéptidos terapéuticos son degradados rápidamente por enzimas proteolíticas y neutralizados por anticuerpos. Esto reduce su vida media y el tiempo de circulación, limitando así su eficacia terapéutica. Sin embargo, se ha demostrado que la adición de un polímero soluble o de un carbohidrato a un polipéptido previene la degradación y aumenta la vida media de los polipéptidos. Por ejemplo, la PEGilación de fármacos de polipéptido los protege y mejora sus perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos (Harris J M y Chess R B, Nat Rev Drug Discov 2003;2:214-21). El proceso de PEGilación une unidades de repetición de polietilenglicol (PEG) a un fármaco de polipéptido. La PEGilación de moléculas puede conducir a un aumento de la resistencia de los fármacos a la degradación enzimática, a un aumento de la vida media *in vivo*, a una reducción de la frecuencia de dosificación, a una menor inmunogenicidad, a un aumento de la estabilidad física y térmica, a un aumento de la solubilidad, a un aumento de la estabilidad en líquido y a una menor agregación.

50 Por consiguiente, una propuesta para mejorar las propiedades de un producto de FVIII consiste en la adición de un polímero soluble, por ejemplo por PEGilación. El estado actual de la técnica está documentado en diferentes patentes y solicitudes de patente.

La Patente US nº 6.037.452 describe un conjugado de óxido de (poli)alquileo-FVIII o FIX en el que la proteína está unida de forma covalente con un óxido de (poli)alquileo a través de los grupos carbonilo del FVIII.

El documento EP1258497B1 describe un método para preparar conjugados de FVIII y un polímero biocompatible. Esta patente se complementa mediante una publicación de Röstin y col. (Bioconj Chem 2000; 11:387-96). Los conjugados comprenden un FVIII recombinante con delección del dominio B modificado con monometoxipolietilenglicol. El conjugado tenía una función de FVIII reducida y la actividad coagulante disminuía rápidamente con el grado de modificación.

5

El documento WO04075923A3 describe un conjugado molecular de polímero-FVIII que comprende múltiples conjugados, teniendo cada conjugado de uno a tres polímeros solubles en agua unidos de forma covalente a una molécula de FVIII. La molécula de FVIII presenta una delección del dominio B.

10

La Patente US nº 4.970.300 describe un FVIII modificado donde un conjugado no fusible que comprende una proteína con actividad de FVIII está unido de forma covalente a un ligando no antigénico.

La Patente US nº 6.048.720 describe conjugados de un polipéptido y un polímero biocompatible.

El documento WO94/15625 describe un FVIII unido a polietilenglicol con un peso molecular preferente no superior a 5.000 Dalton.

15

No obstante, sigue existiendo la necesidad de un FVIII mejorado que tenga un polímero soluble unido para prolongar la vida media del FVIII *in vivo*, que mantenga la actividad funcional mientras proporciona una vida media prolongada *in vivo* en comparación con FVIII no modificado y otros agentes terapéuticos de FVIII modificado conocidos en la técnica.

SUMARIO DE LA INVENCION

20

De acuerdo con la presente invención se proporciona un método para conjugar un polímero soluble en agua (PSA) con factor FVIII (FVIII) según la reivindicación 1.

25

El método para conjugar un polímero soluble en agua (PSA) con una molécula de factor FVIII (FVIII) comprende (a) incubar el FVIII con un anticuerpo específico de FVIII bajo condiciones que permitan la unión de dicho anticuerpo a dicho FVIII formando un complejo anticuerpo:FVIII; (b) incubar el complejo anticuerpo:FVIII con dicho PSA bajo condiciones que permitan la conjugación del PSA con el complejo anticuerpo:FVIII; y (c) liberar el FVIII conjugado con PSA del anticuerpo.

30

Aquí también se proporciona un constructo proteináceo que comprende (a) una molécula de factor FVIII (FVIII); y (b) al menos una molécula de polímero soluble en agua (PSA) unida a la molécula de factor VIII; estando conjugados dicho o dichos PSA con dicha molécula de FVIII en presencia de un anticuerpo que se une específicamente a FVIII. En una realización relacionada, la molécula de factor VIII es un factor VIII recombinante. En otra realización, la molécula de factor VIII es un factor VIII de longitud completa.

35

En otra realización de la invención, la molécula de PSA es una molécula de PEG. En una realización relacionada, la molécula de PSA tiene un peso molecular de entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 150.000 Da, o de entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 50.000 Da. En otra realización, la molécula de PSA tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. En otra realización más de la invención, la molécula de PSA tiene una estructura lineal o ramificada.

En otra realización de la invención, el anticuerpo mencionado está inmovilizado en una resina.

40

La presente invención contempla métodos para conjugar PSA de la invención. El método para conjugar un polímero soluble en agua (PSA) con factor VIII (FVIII) consiste en (a) incubar el FVIII con anticuerpo específico de FVIII bajo condiciones que permitan la unión del anticuerpo al FVIII para formar un complejo anticuerpo:FVIII; (b) incubar el complejo anticuerpo:FVIII con el PSA bajo condiciones que permitan la conjugación del PSA con el complejo anticuerpo:FVIII; y (c) liberar el FVIII conjugado con PSA del anticuerpo, seleccionándose el PSA de entre el grupo consistente en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, ácido polisiálico (APS), carbohidratos, polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, almidón, dextrano, carboximetildextrano,

45

óxido de polialquileno (OPA), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG) polioxazolina, poliacriloilmorfolina, alcohol polivinílico (APV), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, ácido polietileno-co-anhídrido maleico, poliestireno-co-anhídrido maleico, poli(1-hidroximetil-etilen-hidroximetilformal) (PHF), y/o fosfato de 2-metacrililoiloxi-2'-etiltrimetilamonio (MPC).

En otra realización, el FVIII es un FVIII de longitud completa.

50

En otra realización de la invención, se proporciona un método tal como el arriba mencionado donde el PSA tiene un peso molecular de entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 150.000 Da. En otra realización, el PSA tiene estructura lineal o ramificada. En una realización, el PSA es PEG. En otra realización, el PSA es APS. En otra

realización más de la invención, se proporciona el método arriba mencionado donde el anticuerpo está inmovilizado en una resina.

Además de los métodos mencionados, aquí también se describen constructos proteínicos. En un ejemplo se proporciona un constructo proteínico que comprende (a) un factor de coagulación sanguínea; y (b) al menos una molécula de polímero soluble en agua (PSA) unida al factor de coagulación sanguínea; estando conjugados el o los PSA con el factor de coagulación sanguínea en presencia de un anticuerpo que se une específicamente al factor de coagulación sanguínea, seleccionándose el factor de coagulación sanguínea de entre el grupo consistente en factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor von Willebrand (VWF), factor FV (FV), factor X (FX), factor XI, factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (FT) y ADAMTS 13 proteasa, y seleccionándose el APS de entre el grupo consistente en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, ácido polisialílico (PSA), carbohidratos, polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, almidón, dextrano, carboximetildextrano, óxido de polialquileño (OPA), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG) polioxazolina, poliácridilomorfolina, alcohol polivinílico (APV), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, polietileno-co-anhídrido maleico, poliestireno-co-anhídrido maleico, poli(1-hidroximetil-etileno-hidroximetilformal) (PHF) y/o fosfato de 2-metacriloloxi-2'-etiltrimetilamonio (MPC).

En otro ejemplo, se proporciona el constructo proteínico mencionado donde el factor de coagulación sanguínea es FVIII. En otro ejemplo, el FVIII es FVIII de longitud completa.

En otro ejemplo más, se proporciona un constructo proteínico mencionado donde el PSA tiene un peso molecular de entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 150.000 Da. En otro ejemplo, el PSA tiene estructura lineal o ramificada. En un ejemplo, el PSA es PEG. En otro ejemplo, el PSA es APS. En un ejemplo más se proporciona un constructo proteínico mencionado donde el anticuerpo está inmovilizado en una resina.

FIGURAS

Figura 1: muestra la pérdida de potencia del FVIII después de la PEGilación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las propiedades farmacológicas e inmunológicas de las proteínas terapéuticas se pueden mejorar mediante modificación química y conjugación con compuestos poliméricos. En general, las propiedades de los conjugados resultantes dependen en gran medida de la estructura y del tamaño del polímero. La PEGilación de factores de coagulación, por ejemplo de FVIII, por ejemplo con sustancias químicas de PEGilación reactiva con lisina, es factible, pero de manera concomitante se puede observar una considerable pérdida de potencia. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, el FVIII se modifica bajo condiciones donde parte de la superficie de la proteína se protege con anticuerpos monoclonales para que la zona superficial del FVIII sea inaccesible para la modificación, reduciendo así la pérdida de potencia del FVIII provocada por la reacción de sitio no específica.

Aquí también se describe un constructo proteínico que comprende una molécula de FVIII con al menos una parte del dominio B intacta, unida a un polímero soluble en agua que incluye un óxido de polialquileño, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, polioxazolina, poliácridilomorfolina, almidón, o un carbohidrato, como ácido polisialílico (APS) o dextrano. En un ejemplo, el polímero soluble en agua tiene un peso molecular superior a 10.000 Dalton. En otro ejemplo, el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de entre más de 10.000 Da y aproximadamente 125.000 Da, de entre aproximadamente 15.000 Da y 35.000 Da, o de entre aproximadamente 18.000 Da y aproximadamente 25.000 Da. En otro ejemplo, el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de 20.000 Da o superior. En un ejemplo, el constructo mantiene toda la actividad funcional de los productos terapéuticos de FVIII no modificado (nativo), proporcionando una vida media *in vivo* superior en comparación con los productos terapéuticos de FVIII no modificado. En otro ejemplo, el constructo mantiene al menos el 10, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 por ciento (%) de la actividad biológica en relación al factor VIII nativo. En un aspecto relacionado, las actividades biológicas del factor VIII modificado y nativo se determinan mediante los ratios de actividad cromogénica con respecto al valor de antígeno de FVIII (FVIII:Chr:FVIII:Ag). En otro ejemplo más, la vida media del FVIII modificado se reduce o aumenta 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces con respecto a la vida media *in vivo* del factor VIII nativo.

Polipéptidos

Tal como se describen aquí, las "proteínas de coagulación sanguínea" o "factores de coagulación sanguínea" incluyen factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor Von Willebrand (FVW), factor FV (FV), factor X (FX), factor XI, factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (FT) y ADAMTS 13 proteasa. Tal como se utilizan aquí, los conceptos "proteína de coagulación sanguínea" o "factor de coagulación sanguínea" se refieren a cualquier factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor VIIa (FVIIa), factor Von Willebrand (FVW),

factor FV (FV), factor X (FX), factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (FT) y ADAMTS proteasa u otro factor de coagulación sanguínea que presente una actividad biológica asociada con dicha proteína de coagulación sanguínea nativa particular.

5 En una realización de la invención, el material de partida de la presente invención es FVIII, que en diversos aspectos se deriva de plasma humano o se produce mediante técnicas de ingeniería recombinante, tal como se describe en las siguientes patentes: Patente US nº 4.757.006; US nº 5.733.873; US nº 5.198.349; US nº 5.250.421; US nº 5.919.766; EP 306 968. Aquí, el concepto "factor VIII" o "FVIII" se refiere a cualquier molécula de FVIII que presente una actividad biológica asociada a la del FVIII nativo. En una realización de la invención, la molécula de FVIII es un factor FVIII de longitud completa. La molécula de FVIII es una proteína codificada por secuencias de ADN capaces de hibridarse en ADN codificador de factor VIII: C. Tal proteína incluye delecciones de aminoácidos en diversos sitios entre los dominios A1- A2- BA3- C1- C2 o dentro de los mismos (Patente US nº 4.868.112). En otros aspectos, la molécula de FVIII es un FVIII análogo o nativo donde uno o más residuos aminoácidos han sido sustituidos por mutagénesis dirigida a sitio.

15 Las moléculas de factor de coagulación sanguínea, por ejemplo FVIII, incluyen una proteína de longitud completa, precursores de una proteína de longitud completa, subunidades biológicamente activas o fragmentos de una proteína de longitud completa, así como derivados biológicamente activos y variantes de cualquiera de estas formas de una proteína de FVIII. Por consiguiente, una referencia al FVIII incluye todas las formas potenciales de dichas proteínas. Así, una proteína de FVIII incluye aquellas que (1) tienen una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de aminoácidos superior a aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 99% o más, a lo largo de una región de al menos aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400 o más aminoácidos (hasta la secuencia de longitud completa de 406 aminoácidos en el caso de la proteína nativa madura), con respecto a un polipéptido codificado por un ácido nucleico de referencia o una secuencia de aminoácidos aquí descrita; y/o (2) se unen específicamente con anticuerpos, por ejemplo anticuerpos policlonales o monoclonales, generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de referencia tal como se describe aquí, un fragmento inmunogénico de la misma y/o una variante de la misma modificada de forma conservativa.

30 El concepto "factor de coagulación sanguínea recombinante", por ejemplo "factor VIII recombinante" (FVIIIr), "FVII recombinante" (FVIIr), que incluye FVIIr y "factor IX recombinante" (FIXr), incluye cualquier factor de coagulación sanguínea recombinante, por ejemplo FVIIIr, FVIIr y FIXr, u otro factor de coagulación sanguínea, heterólogo o natural, obtenido mediante tecnología de ADN recombinante. En determinadas realizaciones, dicho concepto incluye proteínas tal como se describe más arriba.

35 Tal como se utiliza aquí, el concepto "factor de coagulación sanguínea endógeno", por ejemplo "FVIII endógeno", "FVII derivado endógeno" o "FIX derivado endógeno", u otro factor de coagulación sanguínea derivado endógeno, incluye FVIII, FVII, FIX u otro factor de coagulación sanguínea procedente del mamífero destinado a recibir el tratamiento. Este concepto también incluye FVIII, FVII, FIX u otro factor de coagulación sanguínea transcrito a partir de un transgén o cualquier otro ADN extraño presente en dicho mamífero. Tal como se utiliza aquí, el concepto "factor de coagulación sanguínea exógeno", por ejemplo "FVIII exógeno" incluye FVIII que no procede de dicho mamífero.

40 Tal como se utiliza aquí, el concepto "proteína de coagulación sanguínea derivada de plasma", por ejemplo "FVIII derivado de plasma", "FVII derivado de plasma" o "FIX derivado de plasma", u otro factor de coagulación sanguínea derivado de plasma o "plasmático" incluye todas las formas de la proteína halladas en la sangre y obtenidas de un mamífero con la propiedad de activar el sistema de coagulación.

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

50 Los polipéptidos variantes o análogos incluyen variantes de inserción, donde uno o más residuos aminoácidos se añaden a un factor de coagulación sanguínea, por ejemplo FVIII, FVII o FIX, la secuencia de aminoácidos de la invención. Pueden existir inserciones en cualquiera de los dos extremos de la proteína o en ambos, y/o dentro de regiones internas de la secuencia de aminoácidos de FVIII. Las variantes de inserción, con residuos adicionales en cualquiera de los dos extremos, o en ambos, incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen marcadores aminoácidos u otras etiquetas. En un aspecto, la molécula de FVIII contiene opcionalmente una Met N-terminal, en especial cuando la molécula se expresa de forma recombinante en una célula bacteriana tal como *E. coli*.

5 En las variantes de delección, se suprimen uno o más residuos de aminoácidos en un factor de coagulación sanguínea, por ejemplo FVIII, FVII o FIX u otro polipéptido de factor de coagulación sanguínea tal como se describe aquí. Las delecciones se pueden llevar a cabo en uno o en los dos extremos del polipéptido de FVIII, y/o con supresión de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos de FVIII. Por consiguiente, las variantes de delección incluyen fragmentos de una secuencia de polipéptidos de FVIII.

10 En las variantes de sustitución, uno o más residuos aminoácidos de un factor de coagulación sanguínea u otro polipéptido de factor de coagulación sanguínea se suprimen y se sustituyen por residuos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son de naturaleza conservativa, bien conocidas en la técnica sustituciones conservativas de este tipo. Alternativamente, la invención también abarca sustituciones no conservativas. En Lehninger, [Biochemistry, 2ª Edición; Worth Publishers, Inc., Nueva York (1975), pp. 71-77], se describen ejemplos de sustituciones conservativas que se exponen a continuación.

SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS

Característica de la cadena lateral	Aminoácido
No polar (hidrófobo)	
A. Alifático	ALIVP
B. Aromático	FW
C. Con contenido de azufre	M
D. Límite	G
No cargado - polar:	
A. Hidroxilo	STY
B. Amidas	NQ
C. Sulfhidrilo	C
D. Límite	G
Cargado positivamente (básico)	KRH
Cargado negativamente (ácido)	DE

A continuación se muestran ejemplos de sustituciones conservativas alternativas.

SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS II

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

15

Polímeros solubles en agua

20 En un aspecto, un factor de coagulación sanguínea, por ejemplo FVIII, FVII o FIX, u otra molécula derivada de factor de coagulación sanguínea prevista, está unido a un polímero soluble en agua, incluyendo polímeros solubles en agua adecuados clínicamente aceptables tales como PEG, polietilenglicol propionaldehído, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, polioxazolona, poliacrililormorfolina, monometoxi-polietilenglicol, carboximetilcelulosa, poliacetales, alcohol polivinílico (APV), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de

etileno/anhídrido maleico, poli (beta-aminoácidos) (homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli(n-vinilpirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol (PPG) y otros óxidos de polialquileno, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (POG) (por ejemplo glicerol) y otros polioles polioxietilados, sorbitol polioxietilado o glucosa polioxietilada, ácidos cólicos u otros polímeros carbohidratos, Ficoll o dextrano y mezclas de los mismos.

Los polímeros polisacáridos son otro tipo de polímeros solubles en agua que pueden utilizarse para modificar proteínas o péptidos. La modificación de proteínas o péptidos por la adición de un polisacárido (s), por ejemplo por glicosilación, puede aumentar la vida media, reducir la antigenicidad, aumentar la estabilidad y reducir la proteólisis. Los dextransos son polímeros polisacáridos consistentes en subunidades individuales de glucosa unidas predominantemente mediante enlaces α 1-6. El propio dextrano está disponible en muchos intervalos de peso molecular y está fácilmente disponible con pesos moleculares entre aproximadamente 1 kD y aproximadamente 70 kD. El dextrano es un polímero soluble en agua adecuado para su uso en la presente invención como vehículo *per se* o en combinación con otro vehículo (por ejemplo Fc). Véase, por ejemplo, WO 96/11953 y WO 96/05309. Ya se ha informado sobre el uso de dextrano conjugado con inmunoglobulinas terapéuticas o diagnósticas; véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Europea nº 0 315 456. Un dextrano de entre aproximadamente 1 kD y aproximadamente 20 kD es preferente cuando se utiliza dextrano como vehículo de acuerdo con la presente invención.

En una realización de la invención se proporciona un polímero soluble en agua, incluyendo polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, ácido polisiálico (APS), carbohidrato, polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, almidón, dextrano, carboximetildextrano, óxido de polialquileno (OPA), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG) polioxazolina, poliacriloilmorfolina, alcohol polivinílico (APV), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, polietileno-co-anhídrido maleico, poliestireno-co-anhídrido maleico, poli(1-hidroximetil-etileno-hidroximetilformal) (PHF) y/o fosfato de 2-metacrililoixi-2'-etiltrimetilamonio (MPC).

El polímero soluble en agua puede ser una molécula de ácido siálico. En un ejemplo, el constructo conserva toda la actividad funcional de los factores de coagulación sanguínea terapéuticos estándar, por ejemplo FVIII, FVII o FIX, u otros productos de factor de coagulación sanguínea, y proporciona una vida media *in vivo* prolongada en comparación con los productos de FVIII terapéuticos nativos. El FVIII, FVII o FIX modificado, u otro factor de coagulación sanguínea, conserva al menos el 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 por ciento (%) de la actividad biológica en relación con el factor VIII, FVII o FIX nativo, u otro factor de coagulación sanguínea. En un aspecto relacionado, las actividades biológicas del factor VIII modificado y nativo se determinan mediante las proporciones de actividad cromogénica con respecto al valor de antígeno de FVIII (FVIII:Chr:FVIII:Ag). En otro ejemplo más, la vida media del FVIII modificado se reduce o aumenta 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces con respecto a la vida media *in vivo* del factor VIII nativo.

Polinucleótidos

Los ácidos nucleicos que codifican un factor de coagulación sanguínea recombinante, por ejemplo FVIII, de la invención incluyen, por ejemplo, genes, pre-ARNm, ARNm, variantes polimórficas, alelos, mutantes sintéticos y naturales. Las proteínas incluidas en el término FVIIIr incluyen, por ejemplo, las proteínas y polipéptidos arriba descritos, proteínas codificadas por los ácidos nucleicos arriba descritos, homólogos interespecie y otros polipéptidos donde:

Los polinucleótidos que codifican un factor de coagulación sanguínea, por ejemplo FVIII, FVII o FIX, u otro factor de coagulación sanguínea de la invención, también incluyen aquellos que (1) se hibridan específicamente bajo condiciones de hibridación estrictas en un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de referencia tal como se describe aquí, y variantes de los mismos modificadas de forma conservativa; (2) presentan una secuencia de ácidos nucleicos con una identidad de secuencia de nucleótidos superior aproximadamente al 95%, a aproximadamente el 96%, a aproximadamente el 97%, a aproximadamente el 98%, a aproximadamente el 99% o más a lo largo de una región de al menos aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 500, aproximadamente 1.000 o más nucleótidos (hasta la secuencia de longitud completa de 1.218 nucleótidos de la proteína madura), con respecto a una secuencia de ácidos nucleicos de referencia tal como se describe aquí.

La secuencia de polinucleótidos o polipéptidos "natural" procede normalmente de un mamífero, incluyendo primates, por ejemplo un humano; roedores, por ejemplo rata, ratón, hámster; vaca, cerdo, caballo, oveja o cualquier mamífero. Los ácidos nucleicos y proteínas de la invención pueden ser moléculas recombinantes (por ejemplo, heterólogas y codificadoras de la secuencia de tipo salvaje o una variante de la misma, o no naturales).

Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos incluyen, por ejemplo, UniProtKB/ Swiss- Prot P00451 (FA8_HUMAN); Gitschier J y col., Characterization of the human Factor VIII gene, Nature, 312 (5992) : 326- 30

- (1984); Vehar GH y col., Structure of human Factor VIII, Nature, 312 (5992) : 337- 42 (1984); y Thompson AR. Structure and Function of the Factor VIII gene and protein, Semin Thromb Hemost, 2003: 29; 11- 29 (2002), Factor VII: números de acceso GenBank J02933 en el caso de la secuencia genómica, M13232 en el caso del ADNc (Hagen y col. PNAS 1986; 83: 2412- 6), y P08709 para la secuencia de polipéptidos. Ya se han descrito diversos polimorfismos del FVII, véase, por ejemplo, Sabater-Lleal y col. (Hum Genet. 2006; 118: 741- 51); Factor IX: número de acceso UniProtKB/ Swiss- Prot P00740, Patente US nº 6.531.298; y VWF: números de acceso GenBank NM_000552 y NP_000543.

Producción de factores de coagulación sanguínea

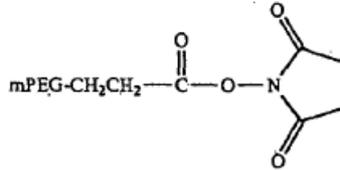
- La producción de un factor de coagulación sanguínea, por ejemplo FVIII, FVII o FIX, u otro factor de coagulación sanguínea, incluye cualquier método conocido en la técnica para (i) producir ADN recombinante mediante ingeniería genética, (ii) para introducir ADN recombinante en células procariotas o eucariotas, por ejemplo mediante transfección, electroporación o microinyección, (iii) para cultivar dichas células transformadas, (iv) para expresar FVIII, por ejemplo de forma constitutiva o tras inducción, y (v) para aislar dicho FVIII, por ejemplo del medio de cultivo o mediante recolección de las células transformadas para (vi) obtener FVIIIr purificado.
- En otros aspectos, el FVIII, FVII, FIX u otro factor de coagulación sanguínea se produce mediante expresión en un sistema huésped procariota o eucariota adecuado que produce una molécula de FVIIIr farmacológicamente aceptable. Ejemplos de células eucariotas son células de mamífero, por ejemplo CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2.
- Para la preparación de FVIIIr, FVII, FIX u otro factor de coagulación sanguínea se utiliza una gran variedad de vectores seleccionados de entre vectores de expresión eucariota o procariota. Ejemplos de vectores para la expresión procariota incluyen plásmidos tales como, de forma no limitativa, pRSET, pET y pBAD, incluyendo los promotores utilizados en vectores de expresión procariotas uno o más de lac, trc, trp, recA o araBAD. Ejemplos de vectores para la expresión eucariota incluyen: (i) para expresión en levadura, vectores tales como pAO, pPIC, pYES o pMET, utilizando promotores tales como AOX1, GAP, GAL1 o AUG1; (ii) para la expresión en células de insecto, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB o pBAC, utilizando promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64 o polh, y (iii) para la expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3 o pBPV, y vectores derivados, en un aspecto, de sistemas virales tales como virus vaccinia, adenosvirus asociados, virus herpes o retrovirus, utilizando promotores tales como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV β -actina.

Pegilación

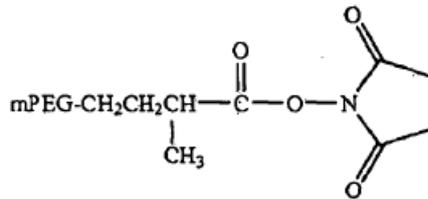
- En determinados aspectos, los factores de coagulación sanguínea, por ejemplo FVIII, FVII, FIX u otras moléculas de factor de coagulación sanguínea se conjugan en un polímero soluble en agua mediante cualquiera de diversos métodos químicos (Roberts JM y col., Advan Drug Delivery Rev 2002; 54: 459-76). Por ejemplo, en una realización se modifica FVIII mediante la conjugación de PEG para liberar grupos amino de la proteína utilizando ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS). En otra realización, el polímero soluble en agua, por ejemplo PEG, se acopla con grupos SH libres utilizando química de maleimida o el acoplamiento de PEG hidrazidas o PEG aminas con fracciones de carbohidrato del FVIII después de oxidación previa.
- En un aspecto, la conjugación se lleva a cabo mediante acoplamiento directo (o acoplamiento a través de sistemas de enlace) del polímero soluble en agua con el factor de coagulación sanguínea, por ejemplo FVIII, con formación de enlaces estables. Además, en determinados aspectos de la presente invención se utilizan sistemas de enlace degradables, liberables o hidrolizables (Tsubery y col. J Biol Chem 2004; 279: 38118-24 / Greenwald y col., J Med Chem 1999; 42:3657-67 / Zhao y col., Bioconj Chem 2006;17:341-51 / WO2006/138572A2 / US7259224B2 / US7060259B2).
- En una realización de la invención, el FVIII se modifica a través de residuos de lisina mediante el uso de derivados de polietilenglicol que contienen un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) activo, tal como succinato de succinimidilo, glutarato de succinimidilo o propionato de succinimidilo. Estos derivados reaccionan con los residuos de lisina o FVIII bajo condiciones suaves formando de un enlace amida estable. En una realización de la invención, la longitud de cadena del derivado de PEG es de 5.000 Da. En diversas realizaciones se utilizan otros derivados de PEG con longitudes de cadena de 500 a 2.000 Da, de 2.000 a 5.000 Da, de más de 5.000 a 10.000 Da o de más de 10.000 a 20.000 Da, o de más de 20.000 a 150.000 Da, incluyendo estructuras lineales y ramificadas.
- Otros métodos alternativos para la PEGilación de grupos amino son la conjugación química con carbonatos de PEG para formar enlaces uretano, o la reacción con aldehídos o cetonas mediante aminación reductora para formar enlaces amida secundarios.
- En una realización de la presente invención, una molécula de FVIII se modifica químicamente utilizando derivados de PEG comerciales. En aspectos alternativos, estos derivados de PEG tienen una estructura lineal o ramificada. Más abajo se citan ejemplos de derivados de PEG que contienen grupos NHS.

Los siguientes derivados de PEG son ejemplos comerciales de Nektar Therapeutics (Huntsville, Ala.; véase www.nektar.com/PEG reagent catalog; Nektar Advanced PEGylation, price list 2005-2006):

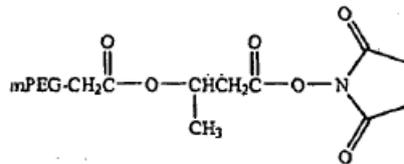
propionato de mPEG-succinimidilo (mPEG-SPA)



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

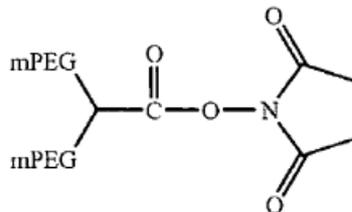


mPEG- CM- HBA- NHS (CM = carboximetilo; HBA = ácido hidroxibutírico)



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

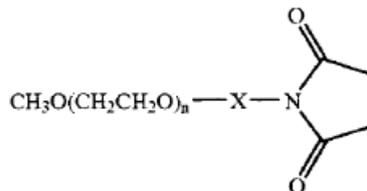
10 PEG N-hidroxisuccinimida ramificada (mPEG2-NHS)



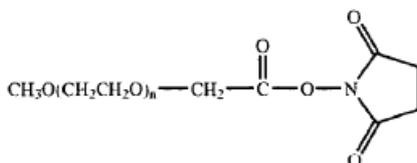
Kozlowski y col. (BioDrugs 2001;5:419-29) describen más detalladamente este reactivo de estructura ramificada.

Otros ejemplos de derivados de PEG se pueden adquirir comercialmente en NOF Corporation (Tokio, Japón; véase www.nof.co.jp/english: Catalogue 2005).

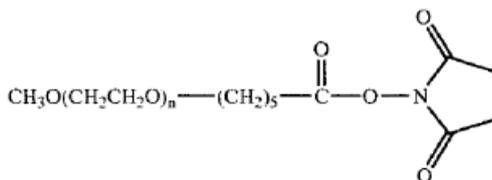
15 Estructura general de derivados de PEG lineales (NOF Corp.):



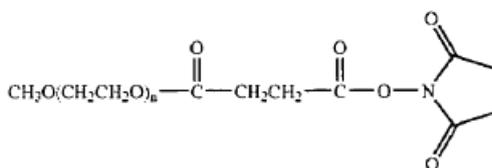
X = carboximetilo



X = carboxipentilo



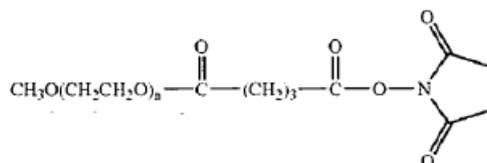
x = succinato



5

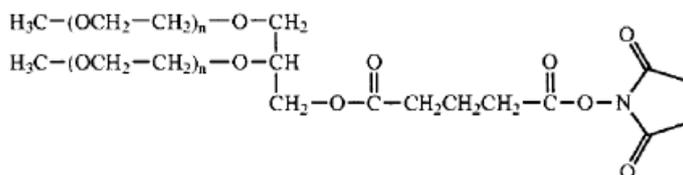
Succinato de mPEG succinimidilo

x = glutarato

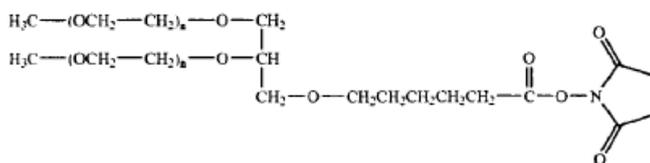


Glutarato de mPEG succinimidilo

- 10 Estructuras de derivados de PEG ramificados (NOF Corp.): 2,3-bis(metilpolioxi-etilen-oxi)-1-(1,5-dioxo-5-succinimidiloxi, pentiloxi)propano



2,3-bis(metilpolioxi-etilen-oxi)-1-(succinimidil-carboxipentiloxi)propano



- 15 Estos derivados de propano presentan un esqueleto glicerol con un patrón de sustitución 1,2. En la presente invención también se tienen en cuenta derivados de PEG ramificados basados en estructuras de glicerol con sustitución 1,3 u otras estructuras ramificadas descritas en el documento US 2003/143596A1.

También se tienen en cuenta derivados de PEG con sistemas de enlace degradables (por ejemplo hidrolizables), tales como los descritos por Tsubery y col. (J Biol Chem 2004; 279:38118-24) y Shechter y col. (WO 04089280A3).

- 20 Sorprendentemente, el factor FVIII PEGilado de esta invención presenta actividad funcional en combinación con una prolongada vida media de FVIII *in vivo*. Además, el FVIIIr PEGilado parece ser más resistente contra la inactivación de trombina.

Ácido siálico

5 Tal como se utiliza aquí, "fracciones de ácido siálico" incluye monómeros o polímeros de ácido siálico ("polisacáridos") que son solubles en solución o suspensión acuosa y tienen muy poco o ningún impacto negativo, por ejemplo efectos secundarios, para los mamíferos después de la administración del conjugado de APS-FVIII en una cantidad farmacéuticamente eficaz. En un aspecto, los polímeros se caracterizan porque tienen de 1 a 4 unidades. En ciertos aspectos, diferentes unidades de ácido siálico se combinan en una cadena.

10 En diversos aspectos de la invención, las fracciones de ácido siálico están unidas al factor de coagulación sanguínea FVIII, por ejemplo por el método descrito en la Patente US nº 4.356.170. En diversas realizaciones de la invención, el compuesto de polisacárido es un polisacárido natural, un derivado de un polisacárido natural o un derivado natural de un polisacárido. En general, todos los demás residuos de sacárido del compuesto son residuos de ácido siálico.

15 También se conocen otras técnicas para acoplar APS a polipéptidos. Por ejemplo, la Publicación US nº 2007/0282096 describe la conjugación de derivados de amina o hidrazida, por ejemplo de APS, en proteínas. Además, la Publicación US nº 2007/0191597 describe derivados de APS que contienen un grupo aldehído para la reacción con sustratos (por ejemplo proteínas) en el extremo terminal reductor.

20 En una realización de la invención, la parte de ácido polisialílico del compuesto de polisacárido es altamente hidrófila, y en otra realización todo el compuesto es altamente hidrófilo. El carácter hidrófilo es conferido principalmente por los grupos carboxilo laterales de las unidades de ácido siálico, así como por los grupos hidroxilo. En diversos aspectos, la unidad de sacárido contiene (otros) grupos (funcionales), como grupos amina, hidroxilo o sulfato o combinaciones de los mismos. Estos grupos están presentes en los compuestos sacárido naturales o se introducen en compuestos polisacáridos derivados.

25 En un aspecto, los compuestos polisacáridos de uso particular para la invención son aquellos producidos por bacterias. Algunos de estos polisacáridos naturales son conocidos como glicolípidos. En una realización, los compuestos polisacárido están esencialmente libres de unidades de galactosa terminales.

Anticuerpos de factor de coagulación sanguínea

30 Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos quiméricos, anticuerpos bifuncionales/biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y anticuerpos injertados con región determinante de la complementariedad (CDR), que son específicos para la proteína diana o fragmentos de la misma. El término "anticuerpo" también incluye la transferencia génica de anticuerpos terapéuticos *in vivo*. La invención también prevé fragmentos de anticuerpo, incluyendo FAB, FAB', F(ab')₂, scFv y Fv. En algunas realizaciones preferentes, los anticuerpos pueden ser monoclonales, humanizados, primatizados, de cadena simple o quiméricos.

35 Tal como se utiliza aquí, el término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico de un polipéptido. En algunas realizaciones, un epítipo puede incluir 3 o más aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítipo. En algunas realizaciones, los epítipos son epítipos lineales o conformacionales. En general, un epítipo consiste en al menos 4 de estos aminoácidos, y de modo más usual, en al menos 8-10 de estos aminoácidos. En la técnica se conocen métodos para determinar la conformación espacial de aminoácidos, que incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona de entre el grupo consistente en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo primatizado, un anticuerpo presentado en fago, un anticuerpo de cadena simple o un fragmento de cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones preferentes, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados se pueden obtener mediante diversos métodos, incluyendo, por ejemplo: (1) injerto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas en una región de estructura humana y constante (un proceso designado en la técnica como "humanización"), o alternatively (2) trasplante de los dominios variables no humanos completos, pero "cubriéndolos" con una superficie de tipo humana mediante sustitución de residuos superficiales (un proceso denominado en la técnica como "chapado"). En la presente invención, los anticuerpos humanizados incluirán tanto anticuerpos "humanizados" como anticuerpos "chapados". Del mismo modo, los anticuerpos humanos se pueden preparar introduciendo *loci* de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo ratones donde los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o totalmente inactivados. Después de la provocación se observa una producción de anticuerpos humanos que se parecen mucho a los observados en humanos en todos los aspectos, incluyendo la reorganización, unión y repertorio de anticuerpos. Este método se describe, por ejemplo, en las Patentes US nº 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., *Bio/ Technology* 10, 779 783 (1992); Lonberg y col., *Nature* 368 856 859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812 13 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnology* 14, 845 51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65 93 (1995); Jones y col., *Nature*

321: 522- 525 (1986); Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 81: 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44: 65- 92 (1988); Verhoeyer y col., Science 239: 1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28: 489- 498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31 (3): 169- 217 (1994); y Kettleborough, C.A. y col., Protein Eng. 4 (7): 773- 83 (1991).

- 5 Los anticuerpos de la presente invención también pueden estar unidos a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o para la purificación de factor de coagulación sanguínea PEGilado, FVIIIr. Estos soportes sólidos incluyen vidrio, celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

10 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando el método de Kohler y col. (1975) Nature 256: 495-496, o una modificación del mismo. Típicamente, un ratón se inmuniza con una solución que contiene un antígeno. La inmunización se puede llevar a cabo mezclando o emulsionando la solución que contiene el antígeno en una solución salina, preferentemente en un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión vía parenteral. Para obtener los anticuerpos monoclonales de la invención se puede utilizar cualquier método de inmunización conocido en la técnica. Después de la inmunización del animal, el bazo (y opcionalmente varios nodos linfáticos grandes) se retiran y disocian en células individuales. Las células del bazo se pueden clasificar aplicando una suspensión celular a una placa o pocillo revestido con el antígeno de interés. Las células B que expresan inmunoglobulina unida a membrana específica para el antígeno se unen a la placa y no se eliminan por lavado. Después se induce la fusión de las células B resultantes, o de todas las células de bazo disociadas, con células de mieloma para formar hibridomas, que se cultivan en un medio selectivo. Las células resultantes se disponen en placas mediante dilución en serie o limitativa y se ensayan en cuanto a la producción de anticuerpos que se unen específicamente al anticuerpo de interés (y que no se unen con antígenos no relacionados). Los hibridomas seleccionados que segregan el anticuerpo monoclonal (mAb) se cultivan *in vitro* (por ejemplo, en botellas de tejido de cultivo o fermentadores de fibra hueca), o *in vivo* (como ascitis en ratones).

20 Como alternativa al uso de hibridomas para la expresión, también se pueden producir anticuerpos en una línea celular tal como una línea celular de CHO o líneas celulares de mieloma, tal como se da a conocer en las Patentes US nº 5.545.403, 5.545.405 y 5.998.144. En resumen, la línea celular se transfecta con vectores capaces de expresar una cadena ligera y una cadena pesada respectivamente. Mediante la transfección de las dos proteínas en vectores separados se pueden producir anticuerpos quiméricos. Immunol. 147:8; Banchereau y col. (1991) Clin. Immunol. Spectrum 3:8; y Banchereau y col. (1991) Science 251:70.

Administración

30 En un aspecto, para administrar las composiciones que comprenden un constructo proteínico de la presente invención a humanos o animales de ensayo, las composiciones comprenden uno o más soportes farmacéuticamente aceptables. Los conceptos "farmacéuticamente" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades y composiciones moleculares que son estables, que inhiben la degradación proteínica tal como productos de agregación y disociación, y además no producen reacciones alérgicas u otras reacciones adversas al ser administradas utilizando vías bien conocidas en la técnica, tal como se describe más abajo. Los "soportes farmacéuticamente aceptables" incluyen todos y cada uno de los disolventes clínicamente útiles, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de absorción, incluyendo los agentes arriba descritos.

40 Las composiciones se administran vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, mediante spray de inhalación, vía vaginal, rectal o mediante inyección intracranial. Tal como se utiliza aquí, el término parenteral incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intracisternal, o técnicas de infusión. También se proporciona una administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar o implante quirúrgico en un sitio particular. En general, las composiciones están esencialmente libres de pirógenos y de otras impurezas que podrían ser nocivas para el receptor.

45 El médico que realiza el tratamiento selecciona las administraciones simples o múltiples de las composiciones con los niveles de dosis y el patrón de administración. Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosis apropiada dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal como se describe más arriba, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el fármaco se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y la respuesta al fármaco, y del criterio del médico tratante. Tal como se utiliza aquí, "cantidad eficaz" incluye una dosis adecuada para tratar a un mamífero que presenta una alteración hemorrágica tal como se resume más arriba.

55 Aquí también se da a conocer una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un constructo proteínico tal como se define más arriba. En diversos aspectos, la composición farmacéutica comprende además soportes, diluyentes, sales, tampones o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica de la invención incluye soluciones o productos liofilizados. Opcionalmente, las soluciones de la composición farmacéutica se someten a cualquier proceso de liofilización adecuado.

Aquí también se describen *kits* que comprenden una composición aquí descrita empaquetada de un modo que facilite su uso para la administración a un sujeto. Un *kit* de este tipo incluye un compuesto o composición tal como se describe aquí (por ejemplo una composición que comprende un constructo proteínico), empaquetado en un recipiente tal como una botella o recipiente sellado, con una etiqueta fijada al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o composición para poner en práctica el método. El *kit* puede contener un primer recipiente que tiene una composición que comprende un constructo proteínico y un segundo recipiente que tiene una solución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición del primer recipiente. En un aspecto, el compuesto o composición está envasado en una forma de dosificación unitaria. El *kit* también puede incluir un dispositivo adecuado para administrar la composición según una vía de administración específica. Preferentemente, el *kit* incluye una etiqueta que describe el uso de la composición proteínica o peptídica terapéutica.

Ejemplos

Ejemplo 1: PEGilación de residuos de lisina en FVIIIr

A. Inmovilización de FVIII

Una muestra de FVIIIr se incubó con una resina de inmovilización anti-FVIII equilibrada bajo condiciones adecuadas para saturar por completo el mAb anti-FVIII inmovilizado sobre la resina (> 3 mg FVIII/g resina). En una realización, un mAb anti-FVIII se une a un epítipo en la molécula de FVIIIr asociada con la actividad de un FVIIIr, bloqueando este epítipo frente a la conjugación con un polímero soluble en agua. La incubación se llevó a cabo en un dispositivo de rodillos a 2-8°C durante una noche. La resina con el FVIII unido se recogió por filtración con una frita de vidrio y se lavó dos veces con tampón AQ2 (Hepes 20 mM, CaCl₂ 20 mM, NaCl 0,5M, 0,1% (p/p) Polysorbate 80 en WFI; pH 6,8 ± 0,2 a TA).

B. PEGilación

La PEGilación del FVIII inmovilizado se llevó a cabo de acuerdo con un procedimiento aplicado para la producción de FVIII PEGilado a escala piloto utilizando un reactivo de PEGilación suministrado por la compañía NEKTAR (San Carlos, California). El reactivo era un PEG de 20 kDa con una química que conduce a conjugados de FVIII-PEG estables. La tasa de PEGilación se controló con el exceso molar de reactivo de PEGilación con respecto a la proteína de FVIII. Después de la reacción, el exceso de reactivo de PEGilación no reaccionado se inactivó mediante la adición de una solución de glicina.

C. Recuperación del FVIII PEGilado

La resina anti-FVIII con el FVIII PEGilado unido se empaquetó en columna y se lavó con tampones AQ2 y AM3 (MES 20 mM, CaCl₂ 20 mM, NaCl 0,5M, 0,1% (p/p) Polysorbate 80 en WFI; pH 5,9 ± 0,2 a TA). La desorción de FVIII se proporcionó bombeando tampones AH2 (Hepes 20 mM, CaCl₂ 20 mM, NaCl 250 mM, 0,1% (v/v) Polysorbate 80 en WFI; pH 6,8 ± 0,2 a TA) a través de la columna, seguidos de tampón AE1 (50% (v/v) etilenglicol, L-histidina 20 mM, CaCl₂ 20 mM, NaCl 250 mM, 0,01% (v/v) Polysorbate 80 en WFI; pH 6,8 ± 0,2 a TA), que contenía un 50% de etilenglicol. El FVIII PEGilado se recogió en fracciones y se reunió de acuerdo con la señal de UV280.

D. Analítica

La proteína total se determinó mediante absorción UV280 utilizando un factor de conversión determinado experimentalmente de 1.315 (1 mg/ml proteína = 1.315 UV280 absorción). El factor se derivó de una determinación de proteína total de acuerdo con un método Bradford (DF 1013/024).

El grado de PEGilación de FVIII se determinó mediante un método HPLC utilizando un detector ELSD (detector por difusión de luz por evaporación). La muestra se disoció mediante Pronase y los péptidos resultantes se separaron en una columna monolítica C 18 y los péptidos que contenían PEG se controlaron con el monitor ELSD.

E. Resultados

Los experimentos de PEGilación de FVIII se llevaron a cabo con moléculas de polietilenglicol 20K lineal en un complejo de FVIIIr con el anticuerpo monoclonal F8.1 que se une a un epítipo localizado en la región A2 del FVIII.

El complejo se formó incubando una cantidad en exceso de FVIIIr (Advate BDS) con el anticuerpo monoclonal inmovilizado en una Sepharose CL 4B. El FVIIIr no unido se retiró lavando la resina mAb con diversos tampones en una columna de vidrio y el complejo inmovilizado en una Sepharose CL 4B se vertió en un recipiente de vidrio.

Después, se inició la reacción de PEGilación añadiendo el reactivo de PEGilación que tenía un grupo reactivo N-hidroxisuccinimida que preferentemente reaccionaba con aminas primarias del polipéptido de FVIII (lisinas, extremo N) bajo las condiciones aplicadas. El grado de PEGilación se controló mediante el exceso de reactivo PEG utilizado

para la reacción de PEGilación, oscilando el exceso molar entre 25 y 250 veces la proteína de FVIII en la reacción. Después de 6-10 horas de tiempo de reacción química a temperatura ambiente, el experimento finalizó añadiendo una solución madre de glicina 100 mM. La Sepharose CL 4B se empaquetó de nuevo en columna y el reactivo de PEG en exceso se retiró mediante diversos pasos de lavado de 2-10 CV con tampones AM3 y AQ2.

- 5 Los conjugados de FVIII-PEG estables resultantes se separaron del mAb bombeando tampón de elución AE1 a través de la columna y los productos recogidos se analizaron en cuando a la actividad de FVIII y el grado de PEGilación tal como se describe en el Ejemplo 2 más abajo.

Ejemplo 2: Caracterización bioquímica de FVIIIr PEGilado *in vitro*

Los resultados de la caracterización bioquímica del FVIIIr PEGilado se resumen en las siguientes Tablas 1 y 2.

10

Tabla 1

Ej.	FVIII	Exceso reactivo PEG	Rendimiento		Grado de PEGilación	Actividad específica de FVIII		
						Material inicial	Material PEGilado	Reducción de actividad
	Unidades	Mol PEG/mol FVIII	% proteína	% act. crom.	Mol PEG/mol FVIII	Unidades/mg proteína		%
1	13244	25	24	40	0,6	4836	3671	24
2	22156	25	50	48	0,5	4836	3672	28
3	23082	250	44	24	3,35	3904	1944	50
4	41325	75	32	21	2,3	5018	2965	40

Tabla 2

Ej.	FVIII	Exceso reactivo PEG	Rendimiento		Grado de PEGilación	Actividad específica de FVIII		
						Material inicial	Material PEGilado	Reducción de actividad
	Millones de unidades	Mol PEG/mol FVIII	% proteína	% act. crom.	Mol PEG/mol FVIII	Unidades/mg proteína		%
1	5,11	50	77,6	5,6	4,4	9718	496	92,8
2	7,19	50	65,5	14,5	2,9	9718	2147	78
3	4,39	50	78,4	14,9	4,1	9718	1608	84
4	3,48	50	62,8	16,4	5,4	4145	974	76,5

15

La **Tabla 1** muestra que bajo las condiciones aplicadas se obtuvo un grado de PEGilación de 0,6 - 3,4 mol PEG/mol de FVIII con una reducción de la actividad específica de FVIII con mAb antes de la reacción de PEGilación. Los resultados de 4 lotes mostrados en la **Tabla 2** indican que, bajo condiciones no protectoras, la pérdida de potencia (actividad específica) de FVIII era considerablemente más alta que en el caso de los experimentos de PEGilación llevados a cabo en presencia de mAb. Además, cuando los resultados se representan gráficamente se puede observar que la pérdida de actividad específica de FVIII depende, al menos parcialmente, de la extensión de PEGilación (véase la Figura 1).

20

Resumiendo estos resultados, la PEGilación de complejos de FVIII/mAB conduce a una molécula de FVIII PEGilada que mantiene una mayor actividad específica en comparación con las reacciones de PEGilación con FVIII solo. La pérdida de actividad específica de FVIII también depende de la extensión de PEGilación, que se puede controlar mediante la proporción de reactivo de PEGilación con respecto a proteína de FVIII.

25

Ejemplo comparativo 3: PEGilación de residuos de lisina en factores de coagulación sanguínea

30

En la presente invención se prevé la PEGilación de proteínas de coagulación sanguínea de acuerdo con el anterior Ejemplo 1. Por consiguiente, el Ejemplo 1 se repite utilizando cualquiera de los siguientes componentes: factor IX (FIX), factor VIIa (FVIIa), factor Von Willebrand (FVW), factor FV (FV), factor X (FX), factor XI, factor XII (FXII), trombina (FII), proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular (FT) y ADAMTS 13 proteasa. Para cada factor de coagulación sanguínea identificado, un anticuerpo utilizado puede, aunque esto no es necesario, tener una afinidad de unión por un epítipo en un factor de coagulación sanguínea asociado con la actividad de dicho factor de coagulación sanguínea.

REIVINDICACIONES

1. Método para conjugar un polímero soluble en agua (PSA) en un factor FVIII (FVIII) que consiste en:
- 5 (a) incubar FVIII con anticuerpo específico de FVIII bajo condiciones que permiten la unión de dicho anticuerpo a dicho FVIII formando un complejo anticuerpo:FVIII;
- (b) incubar el complejo anticuerpo:FVIII con dicho PSA bajo condiciones que permiten la conjugación del PSA con el complejo anticuerpo:FVIII; y
- (c) liberar el FVIII conjugado con PSA del anticuerpo, y
- 10 seleccionándose el PSA de entre el grupo consistente en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, ácido polisiálico (APS), carbohidrato, polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, almidón, dextrano, carboximetildextrano, óxido de polialquileño (OPA), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG) polioxazolina, poliacriloilmorfolina, alcohol polivinílico (APV), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, polietileno-co-anhídrido maleico, poliestireno-co-anhídrido maleico, poli(1-hidroximetiletilen-hidroximetilformal) (PHF) y/o fosfato de 2-
- 15 metacrililoiloxi-2'-etiltrimetilamonio (MPC).
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el FVIII es FVIII de longitud completa.
3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el PSA tiene un peso molecular de entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 150.000 Da.
4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque el PSA tiene estructura lineal o ramificada.
- 20 5. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque el PSA es PEG.
6. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque el PSA es APS.
7. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo está inmovilizado sobre una resina.

Figura 1

