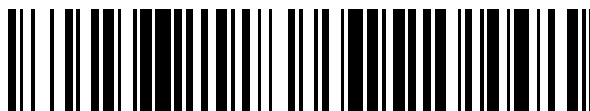


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 466 340**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2009** **E 09734192 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014** **EP 2280734**

54 Título: **Conjugados de Factor IX con semividas extendidas**

30 Prioridad:

24.04.2008 US 47544

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

10.06.2014

73 Titular/es:

**CANTAB BIOPHARMACEUTICALS PATENTS
LIMITED (100.0%)**

**Palazzo Pietro Stiges, 103 Strait Street
Valletta VLT 1436, MT**

72 Inventor/es:

HENRY, WILLIAM

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 466 340 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 Factor IX con semividas extendidas

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a conjugados poliméricos biocompatibles del Factor IX, composiciones que comprenden conjugados de Factor IX y usos de dichos conjugados para tratar la hemofilia. El Factor IX pegilado se describe por ejemplo, en el documento WO2007/135182.

2. Compendio de la invención

El solicitante ha determinado que la fabricación de Factor IX recombinante (denominado en esta memoria como FIX) puede mejorarse conjugando FIX a uno o más grupos polietilenglicol como se define en las reivindicaciones de manera que FIX puede separarse de forma efectiva del Factor IXa (denominado en esta memoria como FIXa). Las propiedades de fabricación mejoradas incluyen también la capacidad de producir conjugados de FIX de alta pureza.

Los conjugados de FIX proporcionarían beneficios terapéuticos, por ejemplo, cuando se compara con FIX no conjugado. Dichos beneficios terapéuticos incluyen, aunque no están limitados a, semivida de circulación aumentada, inmunogenicidad reducida, mayor actividad, menores necesidades de dosificación, y permitir rutas alternativas de administración (por ejemplo, de forma subcutánea).

Como se usan en esta memoria, los términos “conjugado de Factor IX” o “conjugado de FIX” se refiere al Factor IX que se ha modificado para incluir un resto que contiene polietilenglicol (PEG) en polímero biocompatible que da por resultado un perfil farmacocinético mejorado en comparación al Factor IX no modificado. La mejora en el perfil farmacocinético puede observarse como una mejora en uno o más de los parámetros siguientes: potencia, estabilidad, área bajo la curva y semivida circulante.

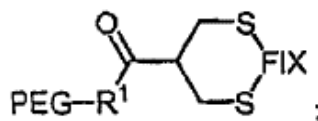
En una realización específica, los conjugados de FIX de alta pureza descritos en esta memoria están esencialmente libres de FIXa. Considerado un contaminante de las composiciones de FIX, incluso cantidades traza de FIXa pueden dar por resultado trombosis peligrosa según Gray et al. *Thromb. Haemost.* Abril de 1995, 73(4):675-9).

Como se usa en esta memoria, el término “esencialmente libre de FIXa”, en el contexto de purificación de FIX y conjugados de FIX, se refiere a cantidades de FIXa que están por debajo de 1 u de FIXa/1000 UI de FIX. Pequeñas concentraciones de FIXa pueden medirse según las técnicas descritas en Gray et al. *Thromb. Haemost.* Abril de 1995; 73(4):675-9. En algunas realizaciones, la cantidad de contaminante FIXa puede ser menor que 0,5 u de FIXa/1000 UI de FIX. En algunas realizaciones, la cantidad de contaminante FIXa puede ser menor que 0,25 u de FIXa/1000 UI de FIX. En algunas realizaciones, la cantidad de FIXa puede ser menor que 0,1 u de FIXa/1000 UI de FIX.

La conjugación de FIX con un polietilenglicol mejora la capacidad de separación del conjugado de FIX del FIXa y mejora así la utilidad de FIX en composiciones farmacéuticas. Además, el polietilenglicol puede proteger a FIX de la degradación y respuesta de anticuerpos. Los conjugados de FIX pueden tener una prolongada semivida circulante, lo que da por resultado un efecto que permite reducir la dosis y administración menos frecuente. En la invención, el FIX se conjugaba a uno o más restos de polietilenglicol (PEG) como se define en las reivindicaciones.

Así en un primer aspecto, la invención proporciona un conjugado de Factor IX-polietilenglicol (PEG), en donde uno o más grupos de polietileno están unidos al Factor IX a través de un resto que contiene PEG que une en puente dos residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro en el Factor IX nativo.

Por lo tanto, la unión que contiene PEG une en puente el enlace disulfuro. En una realización específica, un conjugado de FIX-PEG puede ser según la fórmula:



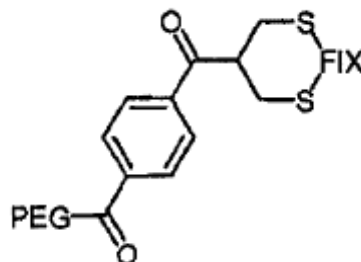
en donde R¹ representa un grupo de unión que puede ser un enlace directo, un grupo alquileo (preferiblemente un grupo alquileo C₁₋₁₀) o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; en donde los grupos arilo incluyen grupos fenilo, benzilo y naftilo;

en donde grupos heteroarilo adecuados incluyen piridina, pirrol, furano, pirano, imidazol, pirazol, oxazol, piridazina, pirimidina y purina;

en donde la unión al polímero puede ser por medio de un enlace hidrolíticamente lábil, o mediante un enlace no lábil.

Los sustituyentes que pueden estar presentes en un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos incluyen por ejemplo uno o más de los mismos o diferentes sustituyentes seleccionados de $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CO}_2\text{R}$, $-\text{COH}$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{COR}$, $-\text{OR}$, $-\text{OCOR}$, $-\text{OCO}_2\text{R}$, $-\text{SR}$, $-\text{SOR}$, $-\text{SO}_2\text{R}$, $-\text{NHCOR}$, $-\text{NRCOR}$, $-\text{NHCO}_2\text{R}$, $-\text{NR}'\text{CO}_2\text{R}$, $-\text{NO}$, $-\text{NHOH}$, $-\text{NR}'\text{OH}$, $-\text{C}=\text{N}-\text{NHCOR}$, $-\text{C}=\text{N}-\text{NR}'\text{COR}$, $-\text{N}^+\text{R}_3$, $-\text{N}^+\text{H}_3$, $-\text{N}^+\text{HR}_2$, halógeno, por ejemplo flúor o cloro, $-\text{C}=\text{CR}$, $-\text{C}=\text{CR}_2$ y $^{13}\text{C}=\text{CHR}$, en que cada R o R' representa independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (preferiblemente C_{1-6}) o un arilo (preferiblemente fenilo). La presencia de sustituyentes aceptores de electrones se prefiere especialmente.

En otra realización, PEG se conjuga con FIX según la fórmula:



El resto que contiene PEG puede tener un peso molecular de aproximadamente 10 kDa. El conjugado de FIX-PEG puede tener un resto que contiene PEG. De forma alternativa, el conjugado de FIX-PEG puede tener dos restos que contienen PEG.

Los conjugados de FIX pueden fabricarse de manera que estén esencialmente libres de FIXa. Bajo ciertas condiciones las velocidades a las que FIX y FIXa reaccionan con un sustrato polimérico biocompatible puede ser diferente. Sin estar atado por la teoría, la diferencia en velocidad de reacción puede deberse al diferente tamaño (FIX tiene un peso molecular que es 11 kDa mayor que FIXa) y/o diferentes estructuras conformacionales de FIX y FIXa. La estructura de FIX se muestra en la Figura 1, que incluye el dominio de activación que se escinde en la activación de FIX a FIXa. Como resultado, el residuo de cadena lateral que se va a conjugar puede ser más accesible estéricamente al reactivo que contiene polímero en FIX o FIXa, y cuanto más accesible sea el residuo reaccionará más rápido con el reactivo que contiene el polímero. Esta diferencia en reactividad permite en último lugar una separación cinética de FIX y FIXa.

El FIX producido de forma recombinante puede contener pequeñas cantidades de FIXa como un contaminante. A veces estas cantidades pueden ser extremadamente pequeñas, del orden de 1 u de FIXa/1000 UI de FIX (Gray et al. Thromb. Haemost. Abril de 1995; 73(4):675-9). Bajo algunas condiciones la velocidad de formación de un conjugado de FIX, tal como FIX-PEG, puede ser más rápido que la velocidad de formación para FIXa-PEG. En esta situación, una cantidad estequiométrica o sub-estequiométrica del reactivo PEG respecto a FIX puede añadirse a la mezcla de reacción. En este ejemplo, todo el reactivo PEG se consume en la formación del conjugado FIX-PEG, mientras que FIXa permanece sin reaccionar. Las propiedades del conjugado de FIX-PEG, tal como peso molecular y polaridad, le permiten separarse fácilmente de FIXa usando técnicas de purificación conocidas en la técnica, que incluyen aunque no están limitadas a cromatografía de exclusión por tamaño y/o de intercambio iónico que pueden usarse en la etapa de purificación.

Bajo algunas condiciones la velocidad de formación de un conjugado de FIXa, tal como FIXa-PEG, es más rápida que la velocidad de formación para FIX-PEG. Bajo estas condiciones, puede añadirse exceso estequiométrico del reactivo PEG respecto a FIXa a la mezcla de reacción. En este ejemplo, es importante asegurarse de que todo el FIXa se consume en la formación de FIXa-PEG, mientras la mayoría de FIX, si no todo el FIX permanece sin reaccionar en su estado no conjugado. Las propiedades del conjugado de FIXa-PEG, tal como peso molecular y polaridad, le permiten separarse fácilmente del FIX no conjugado usando técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el FIX no conjugado se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño o de filtración en gel. El FIX puro resultante puede entonces conjugarse con PEG, que da por resultado un conjugado de FIX-PEG puro.

Los conjugados de FIX tienen una o más de las actividades biológicas de FIX no modificado (es decir, FIX sin PEG unido). Un conjugado de FIX puede activarse *in vivo* por el Factor XIa o VIIa y factor tisular, para dar Factor IXa. La actividad biológica de los conjugados de FIX puede determinarse usando los ensayos descritos en esta memoria.

Comparado con FIX no modificado, los conjugados de FIX de la invención pueden mostrar una mejora en uno o más parámetros del perfil farmacocinético, que incluye área bajo la curva (ABC), C_{max} , aclaramiento (AC), semivida, tiempo de residencia en plasma y biodisponibilidad en comparación con FIX no modificado.

El "área bajo la curva" o "ABC", como se usa en esta memoria en el contexto de administrar un fármaco peptídico a un paciente, se define como área total bajo la curva que describe la concentración de fármaco en circulación sistémica en el paciente como una función de tiempo de cero a infinito.

Como se usa en esta memoria el término “aclaramiento” o “aclaramiento renal” se define como el volumen de plasma que contiene la cantidad de fármaco excretada por minuto.

Como se usa en esta memoria el término “semivida” o “ $t_{1/2}$ ”, en el contexto de administrar un fármaco peptídico a un paciente, se define como el tiempo necesario para que se reduzca la concentración en plasma de un fármaco en un paciente a la mitad. Puede haber más de una semivida asociada con el fármaco peptídico dependiendo de múltiples mecanismos de aclaramiento, redistribución y otros mecanismos bien conocidos en la técnica. Normalmente, se definen semividas alfa y beta de manera que la fase alfa se asocia con redistribución, y la fase beta se asocia con aclaramiento. Sin embargo, con fármacos de proteína que, en la mayor parte, están confinados a la corriente sanguínea, puede haber al menos dos semividas de aclaramiento. El impacto preciso de PEGilación en semividas de fase alfa y fase beta variará dependiendo del tamaño y otros parámetros, como se conoce bien en la técnica. La explicación adicional de “semivida” se encuentra en Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin y RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Ámsterdam, págs. 101 120).

Como se usa en esta memoria el término “tiempo de residencia”, en el contexto de administrar un fármaco peptídico a un paciente, se define como el tiempo promedio que el fármaco permanece en el cuerpo del paciente después de la dosificación.

Las composiciones que comprenden conjugados de FIX, que están esencialmente libres de FIXa demuestran seguridad mejorada. Además, las composiciones que comprenden conjugados de FIX, que están esencialmente libres de FIXa son menos probables que den por resultado trombosis. En una realización específica, las composiciones que comprenden conjugados de FIX puro son menos probables que den por resultado trombosis venosa. En otra realización específica, las composiciones que comprenden conjugados de FIX puro son menos probables que den por resultado trombosis arterial.

Los conjugados de FIX de la presente invención son útiles para tratar hemofilia B. Como se usa en esta memoria, los términos “tratar”, “tratando” o “tratamiento de” significan que la gravedad de un proceso del sujeto se reduce o al menos aumenta o mejora parcialmente y/o que algún alivio, mitigación o disminución en al menos un síntoma clínico se alcanza y/o hay una inhibición o retraso en la progresión del proceso y/o retraso en la progresión del comienzo de la enfermedad o padecimiento. Los términos “tratar”, “tratando” o “tratamiento de” también significa gestión del estado de la enfermedad, por ejemplo, hemofilia B.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de FIX de la invención para usar en el tratamiento de pacientes que sufren de hemofilia B.

Como se usa en esta memoria, una cantidad “terapéuticamente efectiva” como se usa en esta memoria es una cantidad que proporciona alguna mejora o beneficio al sujeto. Afirmado alternativamente, una cantidad “terapéuticamente efectiva” es una cantidad que proporciona algún alivio, mitigación y/o disminución en al menos un síntoma clínico. Los síntomas clínicos asociados con el trastorno que pueden tratarse por los métodos de la invención se conocen bien por los expertos en la técnica. Además, los expertos en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, mientras se proporcione algún beneficio al sujeto.

En una realización específica, las composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de FIX de la invención que está libre de FIXa son para usar en la reducción del riesgo de hemartrosis, hemorragia, sangrado gastrointestinal y menorragia en mamífero con hemofilia B.

Como se usa en esta memoria, la “puntuación media de trombo” se define como sigue. Los trombos pueden puntuarse en una escala de 0-4. Una puntuación de 0 representa sangre completamente fluida; la presencia de pequeños puntos de fibrina se puntúan con un 1, varios pedazos más grandes de coágulo se puntúan con un 2; un coágulo que está parcialmente ocluido se puntúa como un 3, y una puntuación de 4 representa un molde sólido del segmento. La puntuación media de trombo de la composición puede ser menos que 1, menos que 0,5 o 0 después de tres experimentos independientes. La puntuación media de trombo se determinaría a partir de tres o más experimentos independientes siguiendo el protocolo de Wessler et al, J. Appl. Physiol. 14:943-946 (1959).

En otra realización específica, las propiedades mejoradas de los conjugados de FIX proporcionan un método para el tratamiento profiláctico de hemofilia B. En otra realización específica, las composiciones que comprenden un conjugado de FIX pueden administrarse a pacientes que sufren de hemofilia B, que se someten a un procedimiento quirúrgico o se recuperan de un procedimiento quirúrgico.

La administración de conjugados de FIX a un paciente para el tratamiento de hemofilia B puede combinarse con otros agentes terapéuticos, tal como, ácido tranexámico, ácido aminocaproico, Factor II (protrombina) y/o Factor X (Factor de Stuart Prower).

Los conjugados de FIX, descritos en esta memoria, pueden formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en esta memoria, el término “farmacéuticamente aceptable” cuando se usa en referencia a las formulaciones de la presente invención denota que una formulación no da por resultado un nivel inaceptable de irritación en el sujeto al que se administra la formulación mediante cualquier régimen de administración conocido. Ejemplos de irritación incluyen reacciones de hipersensibilidad a FIX.

Debido a la semivida aumentada de conjugados de FIX, las composiciones farmacéuticas pueden contener una menor dosis de FIX que se administra típicamente para tratar efectivamente la hemofilia. Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para administración parenteral, que incluye, aunque no está limitada a, inyecciones intradérmicas, subcutáneas e intramusculares, e infusiones intravenosas o intraóseas. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones que incluyen un conjugado de FIX-PEG, y un diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, dependiendo de la ruta de administración.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan para repartir una dosis terapéutica de un conjugado de FIX. La dosificación del conjugado de FIX puede expresarse en unidades internacionales (UI). Como se usa en esta memoria, el término "unidad internacional" o "UI" se refiere a la asignación de actividad que está referenciada al Patrón Internacional de la Organización Mundial de la Salud. Según esta asignación, una UI de actividad de Factor IX por kg de peso corporal es aproximadamente igual a la actividad del Factor IX en 1 mL de plasma humano normal acumulado, y aumenta la concentración de plasma de Factor IX en 1%.

La dosis de los conjugados de FIX contenidos en la formulación farmacéutica puede oscilar de 1 UI a 10.000 UI. En ciertas realizaciones, la dosis del conjugado de FIX puede oscilar de 100 UI a 5000 UI, o 200 UI a 2500 UI. En ciertas realizaciones, la dosis del conjugado de FIX puede ser aproximadamente 250 UI, aproximadamente 500 UI, aproximadamente 1000 UI o aproximadamente 2000 UI.

El conjugado de FIX se administra en una cantidad suficiente para tratar hemofilia B. Como se usa en esta memoria, una "cantidad suficiente" o una "cantidad suficiente para" alcanzar un resultado particular se refiere a una cantidad de un conjugado de FIX que es efectiva para producir un efecto deseado, que es opcionalmente un efecto terapéutico (es decir, por administración de una cantidad terapéuticamente efectiva). Por ejemplo, una "cantidad suficiente" o "una cantidad suficiente para" puede ser una cantidad que es efectiva para reducir el riesgo de hemartrosis, hemorragia, sangrado gastrointestinal y menorragia.

En ciertas realizaciones, la dosificación de un conjugado de FIX es una suficiente de manera que la concentración de actividad de Factor IX circulante es 1 UI/kg a 150 UI/kg. En otra realización, la composición se administra a una dosis tal que la concentración de actividad de Factor IX circulante es 10 UI/kg a 120 UI/kg. En otra realización, la composición se administra a una dosis tal que la concentración de actividad de Factor IX circulante es 20 UI/kg a 100 UI/kg.

Los conjugados de la invención pueden usarse de la misma manera que el FIX no modificado. Sin embargo, por las propiedades mejoradas de los conjugados de FIX, las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse menos frecuentemente que el FIX no conjugado. Por ejemplo, los conjugados de FIX pueden administrarse una vez a la semana en vez de la vez diaria para FIX recombinante no modificado. La presente invención también abarca regímenes de dosificación en donde los derivados de FIX pueden administrarse dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos, tres o cuatro días, o una vez a la semana para tratar efectivamente la hemofilia B. Se espera que la frecuencia de administración disminuida de por resultado la conformidad del paciente mejorada que lleva a resultados de tratamiento mejorados, además de calidad de vida del paciente mejorada.

3. Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una representación esquemática del Factor IX que muestra la secuencia de aminoácidos, estructura y varios dominios.

La FIG. 2 ilustra la semivida de circulación de FIX-PEG no conjugado en suero de ratón.

La FIG. 3 ilustra la semivida de circulación de FIX-PEG de 10 kDa en suero de ratón.

La FIG. 4 ilustra la semivida de circulación de FIX-PEG de 20 kDa en suero de ratón.

4. Descripción detallada de la invención

La presente invención describe FIX conjugado a uno o más polímeros de polietilenglicol para proporcionar un conjugado de FIX que está esencialmente libre de FIXa. Los conjugados de FIX descritos en esta memoria además tienen propiedades biológicas y farmacocinéticas mejoradas que incluyen, aunque no están limitadas a semivida circulante o tiempo de residencia en plasma aumentados en comparación con FIX no modificado. Además, los conjugados descritos en esta memoria son menos susceptibles a la respuesta a anticuerpos. La presente invención se refiere además a métodos para preparar dichos conjugados. El conjugado de FIX es un conjugado de FIX-PEG. La presente invención se refiere además a métodos para usar conjugados de FIX para el tratamiento de hemofilia B.

En el conjugado de FIX-PEG de la invención, uno o más grupos PEG se conjugan a FIX a través de un resto que contiene PEG que une en puente dos residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro en FIX nativo. Estos conjugados pueden producirse por medio de escisión reductora de un enlace disulfuro, seguido por una reacción en que el resto PEG se une a ambos grupos tio. El conjugado de FIX resultante contiene un resto PEG que une en puente dos azufres que habían formado un enlace disulfuro.

Las composiciones de la invención comprenden conjugados de FIX-PEG que están esencialmente libres de FIXa. Las composiciones de la invención tienen una puntuación reducida de trombo, en comparación con composiciones de FIX que contienen contaminantes traza de FIXa, reduciendo así el riesgo de sucesos trombóticos que incluyen, aunque no están limitados a, trombosis venosa y/o arterial.

- 5 También se describe en esta memoria un método para purificar FIX de FIXa tomando ventaja de las velocidades diferentes de formación de conjugados de FIX frente a conjugados de FIXa en reacciones de conjugación con restos poliméricos biocompatibles. Esto da por resultado la separación cinética de FIX y FIXa. En una realización el polímero biocompatible es PEG.

- 10 Los conjugados de FIX de la presente invención tienen un perfil farmacocinético mejorado en comparación con FIX no modificado.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un conjugado de FIX y un diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para el uso en el tratamiento de la hemofilia B. Como se usa en esta memoria, cuando se refiere a la administración de conjugados de FIX de la invención, el término un "paciente que los necesita", se refiere a un paciente que ha sido diagnosticado con hemofilia B y/o es deficiente en Factor IX.

- 15 4.1 Factor IX recombinante

- El Factor IX recombinante producido por cualquier método conocido en la técnica se contemplan para la derivación y conjugación de acuerdo con la presente invención. Los FIX preferidos pueden producirse usando métodos descritos en una o más de las siguientes patentes y publicaciones: Patentes de EE.UU. núms. 5.268.275, 5.171.569, 5.888.809, 6.531.298; Publicaciones de Solicitud Internacional núms. WO 2005/030039, WO 2006/101474, WO 2006/089613; Publicaciones de Solicitud de EE.UU. núms. 2003/0220247, 2005/0271644, 2006/0121574 y 2006/0194284.

- En algunas realizaciones, el FIX se ha liofilizado o secado por congelación. En realizaciones preferidas, el FIX no se ha liofilizado o secado por congelación. En algunas realizaciones, el FIX se ha expuesto a crioprotectores, por ejemplo, sacarosa o trehalosa. En realizaciones preferidas, el FIX no se ha expuesto a crioprotectores, por ejemplo, 25 sacarosa o trehalosa.

4.2 Conjugados de Factor IX

- Comparado con FIX no modificado, los conjugados de FIX de la invención pueden mostrar una mejora en uno o más parámetros del perfil farmacocinético, que incluye ABC, C_{max} , aclaramiento (AC), semivida, tiempo de residencia en plasma y biodisponibilidad en comparación con FIX no modificados. Los conjugados de FIX pueden tener actividad 30 clínica aumentada *in vivo* en comparación con FIX no modificado. Los conjugados de la invención pueden tener potencia y estabilidad mejorada.

- Los conjugados de FIX, descritos en esta memoria, pueden purificarse y aislarse de FIXa por medio de métodos cromatográficos conocidos en la técnica. Los métodos incluyen, aunque no están limitados a, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño. Los conjugados de FIX de la invención tienen una o 35 más de las actividades biológicas del FIX no modificado. Los conjugados de FIX pueden activarse *in vivo* por el Factor XIa o VIIa y el factor tisular, para dar el Factor IXa. La actividad biológica de los conjugados de FIX puede determinarse usando los ensayos descritos en esta memoria.

El FIX a modificar de acuerdo con la invención puede obtenerse y aislarse de fuentes naturales, tal como plasma humano. El FIX a modificar de acuerdo con la invención puede expresarse de forma recombinante.

- 40 En una realización, el componente FIX del conjugado tiene la secuencia identificada como FIX humano identificado en la Figura 1. De forma alternativa, la secuencia de FIX puede modificarse o derivarse para incluir uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos, que incluyen, aunque no están limitados a inserciones, supresiones o sustituciones.

- Un conjugado de FIX-PEG puede llevar a semivida circulante y tiempo de residencia en plasma aumentados, aclaramiento disminuido y actividad clínica aumentada *in vivo*. El FIX se modifica enlazando de forma covalente un 45 polímero de polietilenglicol a través de dos residuos de aminoácido de cisteína como se define en las reivindicaciones. Las unidades poliméricas de polietilenglicol pueden ser lineales o ramificadas.

- El conjugado de FIX-PEG puede repartirse de forma intravenosa o subcutánea por medio de inyección. El conjugado de FIX-PEG puede también formularse para la administración oral en un comprimido, cápsula, disolución o 50 suspensión.

El resto que contiene PEG une en puente dos grupos tiol de cisteína que forman un enlace disulfuro en el FIX nativo.

Hay varios tipos diferentes de polímeros de polietilenglicol que formarán conjugados con FIX. Hay polímeros PEG lineales que contienen una única cadena de polietilenglicol, y hay polímeros PEG ramificados o de brazos múltiples. El polietilenglicol ramificado contiene 2 o más cadenas PEG lineales separadas unidas a través de un grupo de

unificación. Por ejemplo, dos polímeros PEG pueden unirse mediante un residuo de lisina. Una cadena PEG lineal se une al grupo α -amino, mientras la otra cadena PEG se une al grupo ϵ -amino. El grupo carboxilo restante del núcleo de lisina se deja disponible para unión covalente a una proteína. Tanto los polímeros de polietilenglicol lineales como ramificados están disponibles comercialmente en un intervalo de pesos moleculares.

- 5 En un aspecto de la invención, un conjugado de FIX-PEG contiene uno o más polímeros de polietilenglicol lineales unidos a FIX, en que cada PEG tiene un peso molecular entre aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa. En otro aspecto de la invención, un conjugado de FIX-PEG contiene uno o más polímeros de polietilenglicol lineal unido a FIX, en donde cada PEG lineal tiene un peso molecular entre aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa. En ciertas realizaciones, cada PEG lineal tiene un peso molecular entre aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 20 kDa. En ciertas realizaciones, cada PEG lineal tiene un peso molecular que es aproximadamente 10 kDa. En ciertas realizaciones, cada PEG lineal tiene un peso molecular que es menor que aproximadamente 10 kDa. En realizaciones particulares, el conjugado de FIX-PEG contiene más de un polímero PEG lineal unido a FIX, por ejemplo, dos, tres o cuatro polímeros PEG lineales unidos a FIX. En algunas realizaciones, los conjugados de FIX-PEG contienen dos polímeros PEG lineales, donde cada PEG lineal tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa.

- Un conjugado de FIX-PEG de esta invención puede contener uno o más polímeros PEG ramificados unidos a FIX, en donde cada PEG ramificado tiene un peso molecular entre aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa. En otro aspecto de la invención, un conjugado de FIX-PEG contiene uno o más polímeros de polietilenglicol ramificado unido a FIX, en donde cada PEG ramificado tiene un peso molecular entre aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa. En ciertas realizaciones, cada PEG ramificado tiene un peso molecular entre aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 20 kDa. En ciertas realizaciones, cada PEG ramificado tiene un peso molecular que es aproximadamente 10 kDa. En ciertas realizaciones, cada PEG ramificado tiene un peso molecular que es menor que aproximadamente 10 kDa. En realizaciones particulares, el conjugado de FIX-PEG contiene más de un polímero PEG ramificado unido a FIX, por ejemplo dos, tres o cuatro polímeros PEG ramificados unidos a FIX. En algunas realizaciones, los conjugados de FIX-PEG contienen dos polímeros PEG ramificados, donde cada PEG ramificado tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa.

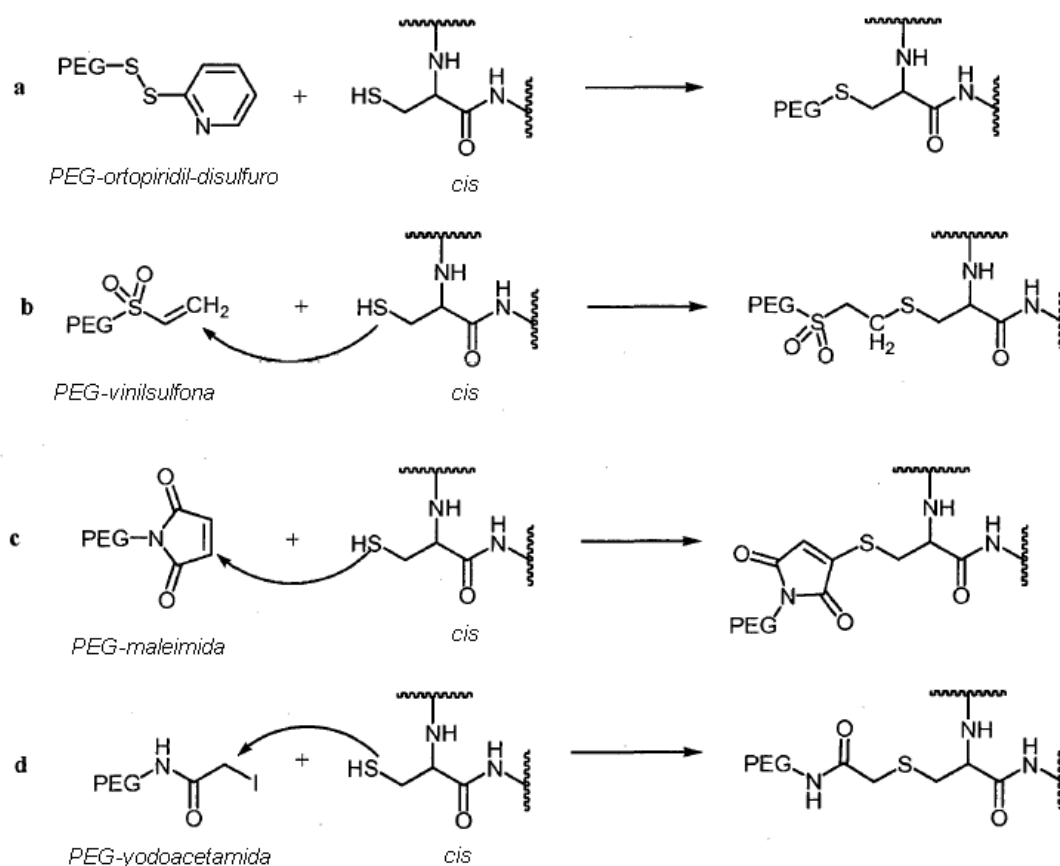
Los conjugados de FIX-PEG pueden purificarse por métodos cromatográficos conocidos en la técnica, que incluyen, aunque no están limitados a cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño.

4.3 Métodos para producir derivados de Factor IX

4.3.1 Técnicas para la PEGilación de residuos de cisteína

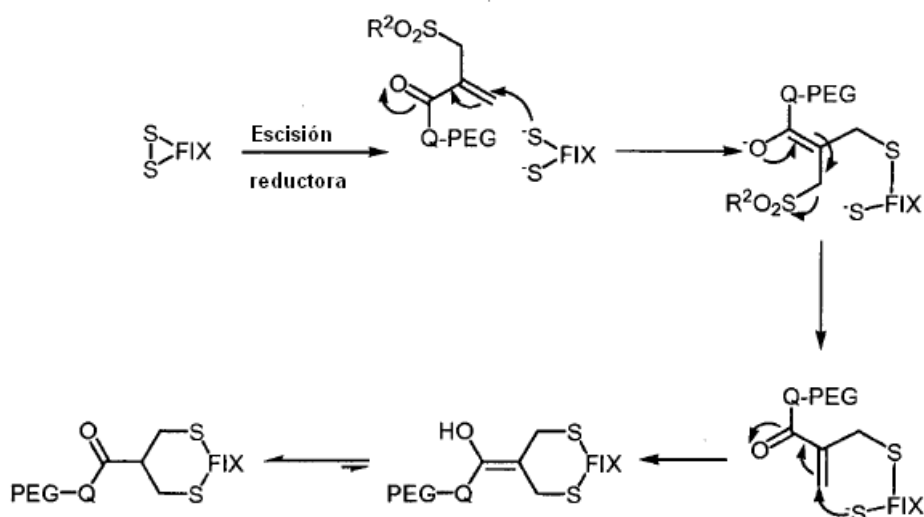
- Un número de métodos existen en la técnica para formar polietilenglicol conjugado, o residuos de cisteína PEGilados. La ventaja de estas técnicas es que son selectivas para cisteína, lo que significa que otras cadenas laterales permanecen sin afectar por estos métodos. En el esquema 1a, el disulfuro activado, PEG orto-piridil-disulfuro, reacciona con tioles para formar el disulfuro simétrico más estable. En el esquema 1b, un residuo de cisteína reacciona con PEG-maleamida, por medio de una adición de tiol al doble enlace activado en una reacción de adición de Michael. En el esquema 1c, un ataque conjugado mediante el tiol en el grupo vinilo terminal activado de PEG-vinilsulfona, da el residuo de cisteína PEGilado. En el esquema 1d el tiol de cisteína desplaza el yoduro por medio de un ataque nucleófilo para dar el residuo de cisteína conjugado con PEG.

Esquema 1



Dos grupos cisteína que forman juntos un enlace disulfuro pueden PEGilarse también selectivamente usando la técnica mostrada en el esquema 2. El enlace disulfuro nativo se reduce primero. Uno de los tioles resultantes de este enlace puede atacar de forma nucleófila un grupo electrófilo, tal como una 1,4-adición a una enona. Esto se continúa mediante la marcha de un grupo saliente tal como, por ejemplo, una sulfona. La posterior eliminación a una segunda enona, seguido por 1,4-adición mediante el tiol restante lleva al disulfuro en puente con un grupo PEG unido.

Esquema 2



La técnica mostrada en el esquema 2 puede también usarse para preparar un conjugado de FIX con dos o más restos PEG independientes conjugados a él. Por ejemplo, un primer enlace disulfuro nativo se reduce bajo condiciones controladas bien conocidas en la técnica. Un primer resto PEG se une entonces a él de acuerdo con el esquema 2. Posteriormente, un segundo enlace disulfuro se reduce, por ejemplo, bajo condiciones de reducción más completas bien conocidas en la técnica. Un segundo resto PEG se une entonces a él, de nuevo de acuerdo con el esquema 2. Este procedimiento multi-etapa puede repetirse cuando sea necesario.

4.3.2 Métodos para producir FIX altamente purificado

La conjugación de FIX a polímeros biocompatibles proporciona un método con el que producir conjugados de FIX altamente purificados. En particular, los métodos para formar conjugados de FIX en presencia de FIXa, mientras no se forman conjugados de FIXa son especialmente ventajosos. Los conjugados de FIX pueden separarse fácilmente de FIXa mediante métodos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio iónico o exclusión por tamaño.

En una realización, la velocidad de formación de FIX-PEG se da a velocidad más rápida que a de FIXa-PEG. La reacción para la conjugación selectiva de FIX se muestra en el esquema 3 posterior.

Esquema 3



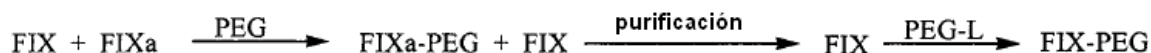
A una mezcla de reacción de FIX, en presencia de una cantidad traza de FIXa, se añade una cantidad estequiométrica de un reactivo PEG. En una realización, la relación de reactivo PEG/FIX en la mezcla de reacción es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,5. En otra realización, la relación de reactivo PEG/FIX es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0. En otra realización, la relación de reactivo PEG/FIX es de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,5. En otra realización, la relación de reactivo PEG/FIX es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5. En otra realización, la relación de reactivo PEG/FIX es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,7. En otra realización, la relación de reactivo PEG/FIX es de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1,0.

En una realización, el reactivo PEG puede añadirse a la mezcla de reacción en una carga. En otra realización, el reactivo PEG se añade lentamente a lo largo del tiempo. El reactivo PEG puede añadirse durante un periodo de hasta aproximadamente 1, 2, 6, 12, 18 o 24 horas. El progreso de la reacción puede monitorizarse por métodos que incluyen, aunque no están limitados a, espectroscopia de masas, cromatografía líquida de proteínas (FPLC) o electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato (SDS-PAGE). Es importante asegurarse que FIXa no se está convirtiendo a un conjugado de FIXa-PEG. En una realización, FIX se convierte casi cuantitativamente a FIX-PEG. En otra realización, FIX se convierte a FIX-PEG de aproximadamente 80% a 90% de conversión, 70% a 80% de conversión, 60% a 70% de conversión, 50% a 60% de conversión, 40% a 50% de conversión, 30% a 40% de conversión, 20% a 30% de conversión o 10% a 20% de conversión. El FIX no reaccionado puede reciclarse y sufrir reacciones de conjugación adicionales.

Un conjugado de FIX-PEG puede separarse fácilmente de la mezcla de reacción por medio de cromatografía de afinidad iónica o exclusión por tamaño. Después de la etapa de separación, es importante asegurarse de que el conjugado de FIX-PEG resultante está esencialmente libre de FIXa. Esto puede confirmarse por los métodos descritos en Gray et al. Thromb. Haemost. Abril de 1995; 73(4):675-9, o los métodos en la Sección 5.3 posterior.

En otra realización la velocidad de formación de conjugado de FIXa-PEG se da más rápido que para FIX-PEG. El FIX no reaccionado se separa entonces a partir del conjugado de FIXa-PEG mediante métodos cromatográficos descritos en esta memoria. Para producir FIX-PEG puro, el FIX purificado restante puede someterse a reacción de PEGilación adicional. El esquema 4, muestra como el FIX-PEG purificado puede sintetizarse bajo esta circunstancia.

Esquema 4



Bajo estas condiciones, un exceso estequiométrico del reactivo PEG respecto a FIXa puede añadirse a la mezcla de reacción. En una reacción, la relación de reactivo PEG/FIXa en la mezcla de reacción es de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000. En otra realización, la relación de reactivo PEG/FIX es de aproximadamente 10 a aproximadamente 100. En otra realización, la relación de reactivo PEG/FIX es de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10.

Es importante asegurarse de que todo el FIXa se consume en la formación de FIXa-PEG. Las propiedades del conjugado de FIXa-PEG, tal como peso molecular y polaridad, le permiten separarse fácilmente a partir de FIX no

conjugado usando técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el FIX no conjugado se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño o filtración en gel.

4.4 Métodos de ensayo de actividad biológica

Los conjugados de FIX de la invención tienen una o más de las actividades biológicas de FIX no modificado. Los métodos para determinar la actividad de un conjugado de FIX preparado según los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo usando métodos bien conocidos en la técnica, tal como un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada en una etapa como se describe en, por ejemplo, Biggs (1972, Human Blood Coagulation Haemostasis and Thrombosis (Ed. 1), Oxford, Blackwell, Scientific, pág. 614). Brevemente, para probar la actividad biológica de un conjugado de FIX desarrollado según los métodos de la presente invención, el ensayo puede realizarse con volúmenes iguales de reactivo de tromboplastina parcial activada, plasma deficiente en FIX aislado de un paciente con hemofilia B usando técnicas de flebotomía estéril bien conocidas en la técnica, y plasma acumulado normal como patrón, o la muestra. En este ensayo, una unidad de actividad se define como esa cantidad de actividad presente en un mililitro de plasma acumulado normal. Además, un ensayo para actividad biológica basado en la capacidad del FIX para reducir el tiempo de coagulación del plasma de pacientes deficientes en FIX a normal puede realizarse como se describe en, por ejemplo, Proctor y Rapaport (1961, Amer. J. Clin. Path. 36: 212). La actividad biológica de conjugados de FIX para asegurar que no hay contaminación de FIXa puede determinarse usando los ensayos descritos en la sección 5.3 también.

4.4.1. Composiciones Farmacéuticas

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen un conjugado de FIX como el ingrediente activo. El conjugado de FIX puede formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Debido a la semivida aumentada del conjugado de FIX, las composiciones farmacéuticas pueden contener una menor dosis de FIX que la administrada típicamente para tratar eficazmente la hemofilia B. Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para administración parenteral, que incluyen, aunque no están limitadas a, inyecciones intradérmicas, subcutáneas e intramusculares, e infusiones intravenosas o intraóseas. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones o emulsiones que incluyen un conjugado de FIX, tal como FIX químicamente modificado con polietilenglicol, y un diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, dependiendo de la ruta de administración.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan para repartir una dosis terapéutica de un conjugado de FIX. La dosificación del conjugado de FIX puede expresarse en unidades internacionales (UI). La dosis de los conjugados de FIX contenida en la formulación farmacéutica puede oscilar de 1 UI a 10.000 UI. En ciertas realizaciones, la dosis del conjugado de FIX puede oscilar de 100 UI a 5000 UI, o 200 UI a 2500 UI. En ciertas realizaciones, la dosis del conjugado de FIX puede ser aproximadamente 250 UI, aproximadamente 500 UI, aproximadamente 1000 UI o aproximadamente 2000 UI.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención presentan un perfil de inmunogenicidad ventajoso, por ejemplo, en comparación a una composición farmacéutica análoga de FIX no conjugado. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención son esencialmente menos inmunogénicas que la composición farmacéutica análoga de FIX no conjugado, o esencialmente no inmunogénico. En realizaciones relacionadas, dichas composiciones farmacéuticas con perfiles de inmunogenicidad ventajosos son capaces de administrarse a un paciente de forma subcutánea, por ejemplo, en un método para tratar la hemofilia B.

4.5 Tratamiento de hemofilia B

Los conjugados de FIX descritos en esta memoria pueden usarse en el tratamiento de hemofilia B. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan para repartir una dosis terapéutica de un conjugado de FIX. En ciertas realizaciones, la dosificación de un conjugado de FIX es suficiente para que la concentración de actividad FIX circulante en un sujeto sea 1 UI/dL a 150 UI/dL. En otra realización, la composición se administra a una dosis tal que la concentración de actividad FIX circulante en un sujeto es 10 UI/dL a 120 UI/dL. En otra realización, la composición se administra a una dosis tal que la concentración de actividad FIX circulante en un sujeto es 20 UI/dL a 100 UI/dL.

En algunas realizaciones, la actividad del conjugado de FIX es aproximadamente 100% de la de un FIX no conjugado análogo. En algunas realizaciones, la actividad del conjugado de FIX es mayor que aproximadamente 80%, 60% o 40% de la de un FIX no conjugado análogo. En realizaciones preferidas, la actividad del conjugado de FIX es mayor que aproximadamente 20% de la de un FIX no conjugado análogo. Aunque no se prefiere, la actividad puede ser menor que 20%, tal como 10%, 5% o incluso 1% y puede aún usarse de forma ventajosa en comparación con FIX no conjugado.

Para pacientes que reciben el conjugado de FIX, su actividad de FIX puede necesitar monitorizarse por un profesional médico. Los conjugados de FIX descritos en esta memoria también pueden administrarse a pacientes que sufren hemofilia B que se someten a o recuperan de un procedimiento quirúrgico.

Además, los conjugados de FIX descritos en esta memoria están libres de contaminación procedente de FIXa, que puede llevar a incidentes trombolíticos adversos. Por lo tanto, los conjugados de FIX y métodos para fabricar conjugados de FIX descritos en esta memoria dan conjugados de FIX puro que son menos probables de provocar trombosis adversa como se determina por la puntuación media de trombo. En una realización, la puntuación media de trombo de la composición de conjugado de FIX es menor que 1 después de tres o más medidas independientes. En otra realización, la puntuación media de trombo es menor que 0,5, después de tres o más medidas independientes. En otra realización, la puntuación media de trombo, después de tres o más medidas independientes, es menos que 0,3. En otra realización, la puntuación media de trombo, después de tres o más medidas independientes, es menos que 0,1. En aún otra realización, la puntuación media de trombo es 0, después de tres o más medidas independientes.

En algunas realizaciones, la dosis administrada del conjugado de FIX es aproximadamente igual que la necesaria para un FIX no conjugado análogo. En algunas realizaciones, la dosis administrada del conjugado de FIX es aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cuatro veces, o aproximadamente cinco veces la necesaria para un FIX no conjugado análogo.

También se describe en esta memoria un conjugado de FIX y un agente terapéutico adicional para usar en el tratamiento de hemofilia B. El agente terapéutico adicional puede ser uno o más de ácido tranexámico, ácido aminocaproico, Factor II (protrombina) y/o Factor X (Factor de Stuart Prower).

El conjugado de FIX y el agente terapéutico adicional puede administrarse secuencialmente o simultáneamente. Si se administra secuencialmente, el orden de administración es flexible. Por ejemplo, el conjugado de FIX puede administrarse antes de la administración del agente terapéutico adicional. De forma alternativa, la administración del agente terapéutico adicional puede preceder a la administración del conjugado de FIX.

Si se administran como composiciones separadas o en una composición, cada composición es preferiblemente farmacéuticamente adecuada para la administración. Además, el conjugado de FIX y el agente terapéutico, si se administran de forma separada, pueden administrarse mediante los mismos o diferentes modos de administración.

En ciertas realizaciones, los conjugados de FIX de la invención muestran esencialmente los mismos efectos farmacéuticos que un FIX no conjugado análogo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la administración de los conjugados de FIX de la invención lleva a coagulación inducida por fibrina normal, indicando coagulación.

4.5.1 Regímenes de dosificación

Los regímenes de dosificación incluyen administración de los conjugados de la invención dos veces diarias, una vez al día, todos los demás días, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas o una vez al mes a un paciente que sufre hemofilia B.

Un profesional médico puede monitorizar la actividad FIX en un sujeto que recibe el conjugado de FIX, y variar el régimen de dosificación por consiguiente. En una realización, la actividad FIX en un sujeto se determina inmediatamente después de la administración de un conjugado de FIX. En otra realización, la actividad FIX en un sujeto se determina 0,5 h, 1 h, 6 h, 12 h o 24 h después de la administración de un conjugado de FIX. En otra realización, la actividad FIX en un sujeto se determina 2 días, 4 días, 1 semana, 2 semanas o 3 semanas después de la administración de un conjugado de FIX.

5. Ejemplos

5.1 Síntesis de conjugados de FIX

Los conjugados de FIX de la invención pueden sintetizarse fácilmente usando métodos sintéticos conocidos en la técnica. Los siguientes ejemplos sintéticos demuestran las síntesis de conjugados de FIX-PEG.

5.1.1 Ejemplo 1: PEGilación del FIX por medio de unión en puente de enlace disulfuro

Al Factor IX se añade 2-mercaptoetanol en disolución de urea acuosa. El pH de la disolución resultante se ajusta a pH 8,5 usando una disolución acuosa al 10% de metilamina. La disolución de reacción se burbujea luego con nitrógeno durante aproximadamente 30 min. Aún purgando con nitrógeno el tubo se calienta a 37°C. La mezcla de reacción se enfría luego en un baño de hielo-agua salina y 10 mL de una disolución enfriada purgada con argón de HCl 1N:etanol absoluto se añaden a la disolución de reacción. Una precipitación se da y el precipitado se aísla por centrifugación y después se lava tres veces con partes adicionales de la mezcla de HCl:etanol absoluto y dos veces con dietiléter enfriado purgado con nitrógeno. Después de cada lavado el precipitado se aísla por centrifugación. El precipitado lavado se disuelve entonces en agua desionizada purgada con nitrógeno y se seca por congelación para dar un sólido seco. La reducción parcial de FIX puede confirmarse y cuantificarse usando el Ensayo de Ellman, que da el número de tioles libres por molécula de proteína.

En un eppendorf, el FIX parcialmente reducido se disuelve en disolución de amoníaco a pH 8 purgada con argón. En un eppendorf separado, el reactivo de conjugación del polímero, α -metoxi- ω -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)-

metil]acetil]benzamida derivado de poli(etilen)glicol se disuelve también en disolución de amoníaco y la disolución resultante se añade a la disolución de Factor IX. El eppendorf de PEG se lava con disolución de amoníaco fresca y esta se añade también al eppendorf de reacción principal. El eppendorf de reacción se cierra entonces bajo argón y se calienta a 37°C durante aproximadamente 24 h y después se deja enfriar a temperatura ambiente. La disolución de reacción enfriada se analiza entonces por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

5.1.2 Ejemplo 2: Formación selectiva y purificación de FIX-PEG en presencia de contaminante FIXa

A una mezcla de reacción que contiene FIX que está contaminada con FIXa se añade 2-mercaptoetanol en disolución de urea acuosa. El pH de la disolución resultante se ajusta a pH 8,5 usando una disolución acuosa al 10% de metilamina. La disolución de reacción se burbujea entonces con nitrógeno durante aproximadamente 30 min. Todavía purgando con nitrógeno el tubo se calienta a 37°C. La mezcla de reacción se enfría entonces en un baño de hielo-agua salina y 10 mL de una disolución enfriada purgada con argón de HCl 1N:etanol absoluto se añade a la disolución de reacción. Una precipitación se da y el precipitado se aísla por centrifugación y después se lava tres veces con porciones adicionales de la mezcla de HCl:etanol absoluto y dos veces con dietiléter enfriado purgado con nitrógeno. Después de cada lavado el precipitado se aísla por centrifugación. El precipitado lavado se disuelve entonces en agua desionizada purgada con nitrógeno y se seca por congelación para dar un sólido seco. La reducción parcial de FIX puede confirmarse y cuantificarse usando el Ensayo de Ellman, que da el número de tioles libres por molécula de proteína.

En un eppendorf, el FIX parcialmente reducido se disuelve en disolución de amoníaco a pH 8 purgado con argón. En un eppendorf separado, menos de un equivalente del reactivo de conjugación del polímero, α -metoxi- ω -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)-metil]acetil]benzamida derivado del poli(etilen)glicol se disuelve también en disolución de amoníaco fresca y esta se añade también al eppendorf de reacción principal. El eppendorf de reacción se cierra entonces en argón y se calienta a 37°C durante aproximadamente 24 h y después se deja enfriar a temperatura ambiente. La disolución de reacción enfriada se analiza entonces por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El FIX-PEG se purifica entonces a partir de la mezcla de reacción por medio de cromatografía de exclusión por tamaño.

El producto aislado puede analizarse adicionalmente mediante los métodos proporcionados por Gray et al. *Thromb. Haemost.* Abril de 1995; 73(4):675-9 o la sección 5.3 posterior para determinar el nivel de contaminante FIXa.

5.2 Producción de Factor IX recombinante

5.2.1 Ejemplo 3: Transfección primaria de células CHO con gen de Factor IX

Un gen de Factor IX de tipo salvaje se transfecta en células CHO por dilución límite en platos de 96 pocillos. El gen de Factor IX está bajo el control del promotor CHEF-1. Las células se dejan crecer en suero al 5% durante 14 días. El medio de cultivo celular se cosecha y la cantidad total de antígeno de Factor IX en μ g por mL se cuantifica por un método ELISA de Factor IX. Se evalúan más de 150 clones y se determina la cantidad total de Factor IX producido por clon.

Las células CHO transfectadas con el gen de Factor IX producen antígeno de Factor IX que se detecta por ELISA de Factor IX.

5.2.2 Ejemplo 4: Supertransfección de células CHO que producen Factor IX con genes VKGC y VKOR

Para aumentar el porcentaje de Factor IX activo producido en células CHO transfectadas con Factor IX, los transfectantes primarios se acumulan, se expanden en el cultivo tisular y se supertransfectan con vectores que contienen ADNc para enzimas que generalmente se cree que son importantes para la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K eficiente del Factor IX. Los clones que producen Factor IX se acumulan en un matraz de agitación y se supertransfectan con ADNc tanto por gamma-carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC) como epóxido reductasa dependiente de vitamina K (VKOR). Las células supertransfectadas individualmente se desarrollan por dilución límite en platos de 96 pocillos en suero al 5% durante 14 días. La cantidad total de antígeno de Factor IX producido por mL se mide por ELISA de Factor IX. La cantidad de Factor IX activo se mide por un ensayo de coagulación APTT usando plasma deficiente en Factor IX como sustrato y Factor IX derivado de plasma como patrón.

5.3 Bioensayos de conjugados de FIX

5.3.1. Ejemplo 5: Ensayo para FIX-PEG y FIXa

La composición de FIX-PEG purificada se ensaya para la determinación de actividad FIX-PEG además de cualquier actividad de FIXa o FIXa-PEG contaminante. Los ensayos se realizan según los protocolos descritos en Smith, K. J. et al., *Blood*, 72, 1269-1277 (1988), para FIX y Varadi, K. et al., *Thromb. Haemos.*, 35, 576-585 (1976), para contaminación de FIXa.

5.3.2. Ejemplo 6: Ensayo de trombogenicidad *in vivo* de la composición de FIX-PEG

Este ejemplo se usa para determinar si un conjugado de FIX, purificado de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2, provoca coagulación indeseada debido a la contaminación de FIXa como se mide por el Ensayo de Estasis de Conejo Wessler *in vivo* para trombogenicidad.

- 5 Los preparados de FIX se inyectan *in vivo* en secciones aisladas, ligadas, de venas yugulares de conejo según el procedimiento de Wessler et al., J. Appl. Physiol. 14:943-946 (1959) para evaluar la formación de trombos de estasis.

La puntuación se consigue siguiendo el sistema de Wessler, et al. según el tamaño del coágulo en donde un coágulo ⁺⁴ representa el tamaño más grande de coágulo que pueden generarse normalmente con materiales trombogénicos en el tamaño y tipo del recipiente seleccionado y ⁺¹ es el más pequeño de dichos coágulos que puede detectarse visiblemente. El experimento se repite tres veces, y se determina la media aritmética.

5.3.3. Ejemplo 7: Detección de trazas de FIXa y FIXa-PEG en composiciones de FIX-PEG purificadas

FIXa de referencia (25 µL) diluido con TBS/albúmina humana al 1% o 25 µL de diluciones de concentrado de FIX de ensayo en TBS/albúmina humana al 1% se colocan en platos de microlitro de 96 pocillos a 37°C. Un reactivo de ensayo que contiene volúmenes iguales de FX humano, fosfolípido de cerebro bovino, y disulfatohirudina recombinante se calienta durante 5 minutos a 37°C. Volúmenes iguales de FVIII recombinante caliente y CaCl₂ se añaden entonces al reactivo de ensayo. Inmediatamente después de mezclar 125 µL de este reactivo se añaden a los pocillos que contienen muestras de FIX o FIXa. Después de 20 min de la generación de FXa a 37°C, 50 µL se transfieren en 100 µL de S-2765 (Quadrachem Epsom UK). Después de 2 minutos de incubación la reacción se paró por la adición de 50 µL de ácido acético al 50% y se graba una longitud de onda de absorbancia. El nivel de absorbancia para el sustrato de ensayo se lleva a cabo entonces a esta longitud de onda para determinar la cantidad de FIXa en la mezcla de ensayo.

5.3.4. Ejemplo 8: Comparación de la semivida de circulación de FIX-PEG de 10 kDa y FIX-PEG de 20 kDa con FIX no conjugado

- 25 Se prepararon FIX-PEG de 10 kDa y FIX-PEG de 20 kDa (donde el resto PEG en cada uno es lineal) usando los procedimientos descritos en los Ejemplos 1 y 2.

Se administraron FIX no conjugado, FIX-PEG de 10 kDa y FIX-PEG de 20 kDa a ratones deficientes en FIX, y la concentración en plasma en cada uno se midió tanto por ELISA como cromogénicamente desde 15 minutos hasta 48 horas después de la administración. Las concentraciones promedio en plasma se muestran en las Figuras 2, 3 y 4, respectivamente. Cuando se mide durante el periodo de tiempo de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 4 horas después de la administración, las semividas de FIX-PEG de 10 kDa y de 20 kDa fueron aproximadamente 2-2,5 veces más largas que la semivida de FIX no conjugado. Cuando se mide durante el periodo de tiempo de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 48 horas después de la administración, la semivida de PEG-FIX de 20 kDa fue aproximadamente 11 veces mayor que la del FIX no conjugado, y la semivida de PEG-FIX de 10 kDa fue aproximadamente 8 veces mayor que la del FIX no conjugado.

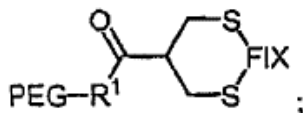
5.3.5. Ejemplo 9: Actividad de FIX-PEG de 10 kDa y FIX-PEG de 20 kDa en ratones deficientes en FIX

La actividad de FIX-PEG de 10 kDa y FIX-PEG de 20 kDa se examinó realizando un estudio de sangrado con ratones deficientes en FIX. Los ratones se administraron con el equivalente de 45 µg/mL de dosis de FIX no conjugado. Las colas de ratones se cortaron, y se administró FIX-PEG de 10 kDa y FIX-PEG de 20 kDa a 12 y 16 ratones, respectivamente. La muerte se evitó para 11 de los 12 ratones en el grupo de FIX-PEG de 10 kDa, y la muerte se evitó para 12 de los 16 ratones en el grupo de FIX-PEG de 20 kDa. El cese de sangrado se observó por inspección visual que es debida a la formación de un coágulo de fibrina, en oposición a un cese solo por plaquetas. Estos resultados indican que tanto FIX-PEG de 10 kDa como FIX-PEG de 20 kDa son activos.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de Factor IX-polietilenglicol (FIX-PEG), en donde uno o más grupos de polietilenglicol se unen al Factor IX a través de un resto que contiene PEG que une en puente dos residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro en el Factor IX nativo.

5 2. El conjugado de FIX-PEG según la reivindicación 1, según la fórmula:



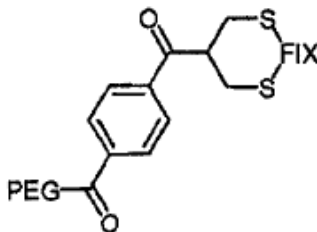
en donde R¹ representa un grupo de unión que puede ser un enlace directo, un grupo alquileo (preferiblemente un grupo alquileo C₁₋₁₀) o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido;

en donde los grupos arilo incluyen grupos fenilo y naftilo;

10 en donde grupos heteroarilo adecuados incluyen piridina, pirrol, furano, pirano, imidazol, pirazol, oxazol, piridazina, pirimidina y purina;

en donde la unión al polímero puede ser por medio de un enlace hidrolíticamente lábil o mediante un enlace no lábil.

3. El conjugado de FIX-PEG de la reivindicación 2, según la fórmula:



15 4. El conjugado de FIX-PEG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el uno o más resto que contiene PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa.

5. El conjugado de FIX-PEG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene un resto que contiene PEG.

6. El conjugado de FIX-PEG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene dos restos que contienen PEG.

20 7. Una composición que comprende el conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición también comprende un diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. La composición según la reivindicación 7, en donde la composición se ha formulado para administración parenteral.

25 9. La composición según la reivindicación 8, que es adecuada para inyecciones intradérmicas, subcutáneas e intramusculares, e infusiones intravenosas o intraóseas.

10. Una composición que comprende el conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que toma la forma de disolución, suspensión o emulsión.

11. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el conjugado de FIX-PEG tiene una semivida más larga en comparación con FIX no modificado.

30 12. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el conjugado de FIX-PEG tiene un mayor ABC en comparación con FIX no modificado.

13. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el conjugado de FIX-PEG tiene una biodisponibilidad mayor en comparación con FIX no modificado.

35 14. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de FIX-PEG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de hemofilia B.

15. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de FIX-PEG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la composición está esencialmente libre de Factor IXa, para usar en la reducción del riesgo de hemartrosis, hemorragia, sangrado gastrointestinal y menorragia en mamíferos con hemofilia B.
- 5 16. La composición según la reivindicación 15, en donde la puntuación media de trombo de la composición es menor que 1 después de tres experimentos independientes.
17. La composición según la reivindicación 15, en donde la puntuación media de trombo de la composición es menor que 0,5 después de tres experimentos independientes.
- 10 18. La composición según la reivindicación 15, en donde la puntuación media de trombo de la composición es 0 después de tres experimentos independientes.
19. La composición según la reivindicación 14, en donde la composición se administra de forma subcutánea.
20. La composición según la reivindicación 14, en donde la composición se administra de forma intravenosa.
- 15 21. La composición según la reivindicación 14, en donde la composición lleva a una incidencia reducida de trombosis en comparación con composiciones de Factor IX recombinante que comprenden una cantidad medible de Factor IXa.
22. La composición según la reivindicación 14, en donde la composición se administra una vez al día.
23. La composición según la reivindicación 14, en donde la composición se administra una vez cada dos días.
24. La composición según la reivindicación 14, en donde la composición se administra a una dosis de 1 UI a 10.000 UI.
- 20 25. La composición según la reivindicación 14, en donde la composición se administra a una dosis de 200 UI a 2500 UI.
26. La composición según la reivindicación 14, en donde la composición se administra a una dosis de aproximadamente 250 UI, aproximadamente 500 UI, aproximadamente 1000 UI o aproximadamente 2000 UI.
- 25 27. La composición según la reivindicación 14, en donde la composición se administra a una dosis tal que la concentración de actividad de Factor IX circulante es 1 UI/dL a 150 UI/dL.
28. La composición según la reivindicación 14, en donde la composición se administra a una dosis tal que la concentración de actividad de Factor IX circulante es 10 UI/dL a 120 UI/dL.
29. La composición según la reivindicación 14, en donde la composición se administra a una dosis tal que la concentración de actividad de Factor IX circulante es 20 UI/dL a 100 UI/dL.

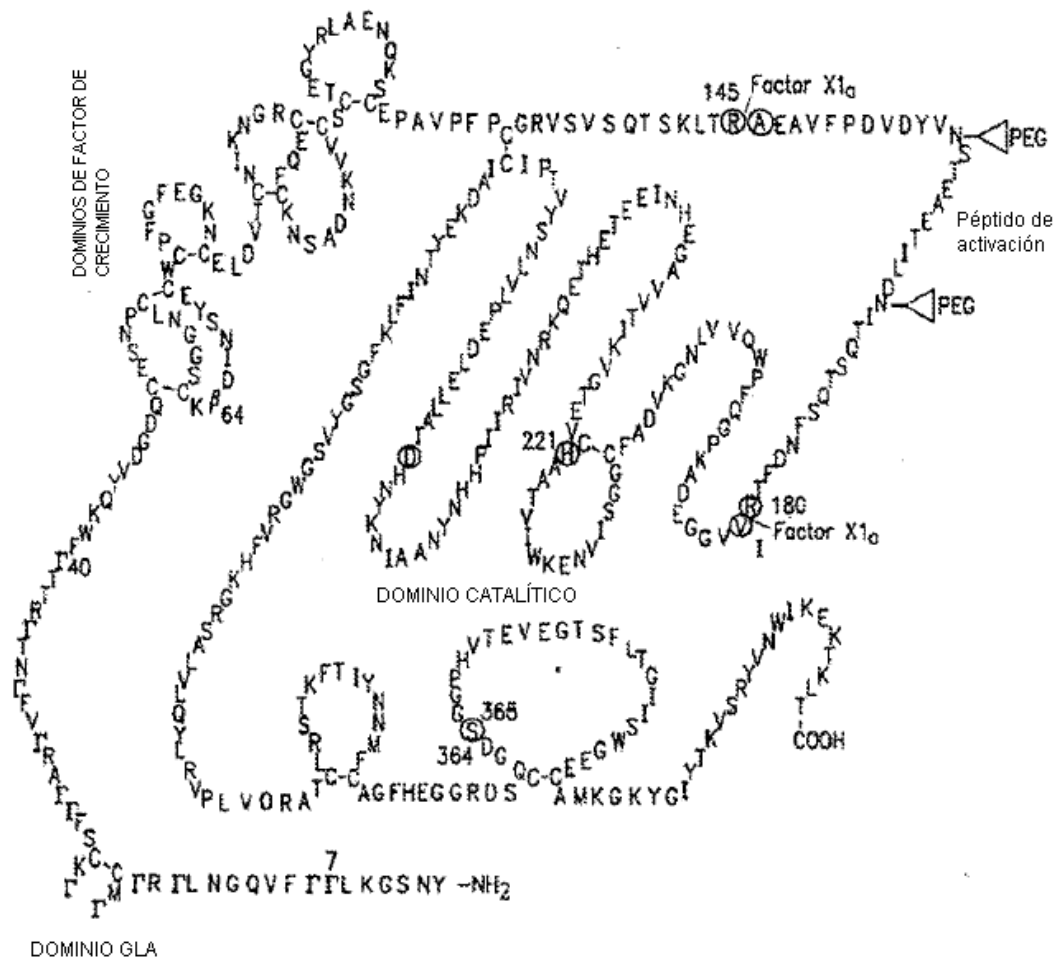


FIG. 1

Semivida de FIX no conjugado en suero de ratón

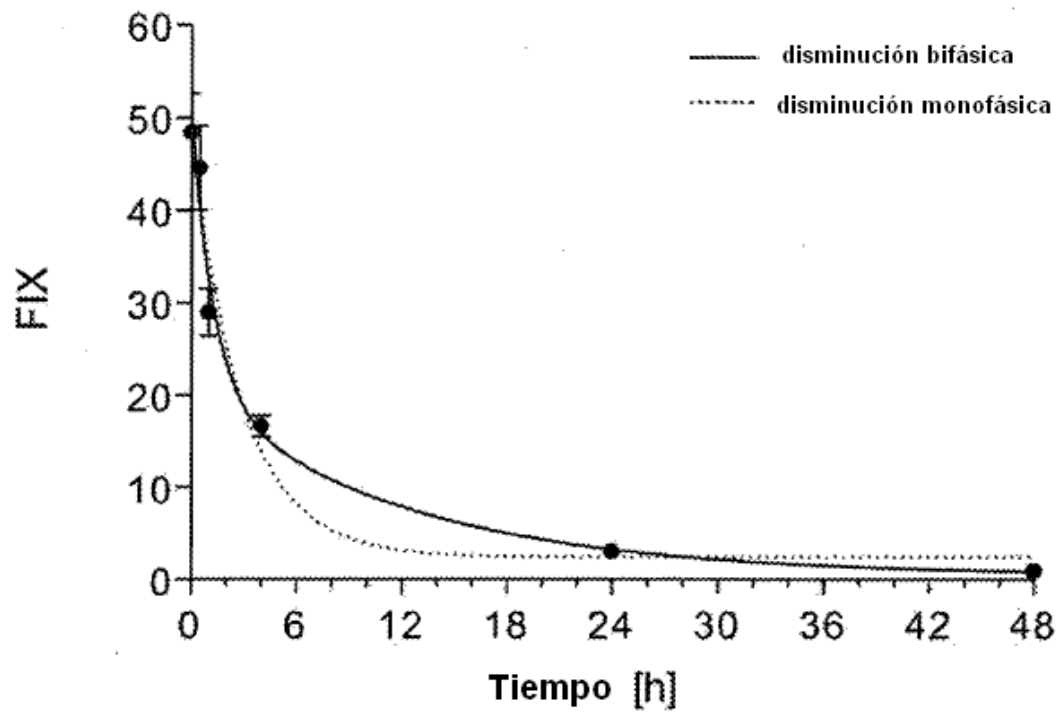


FIG. 2

Semivida de FIX-PEG de 10 kDa en suero de ratón

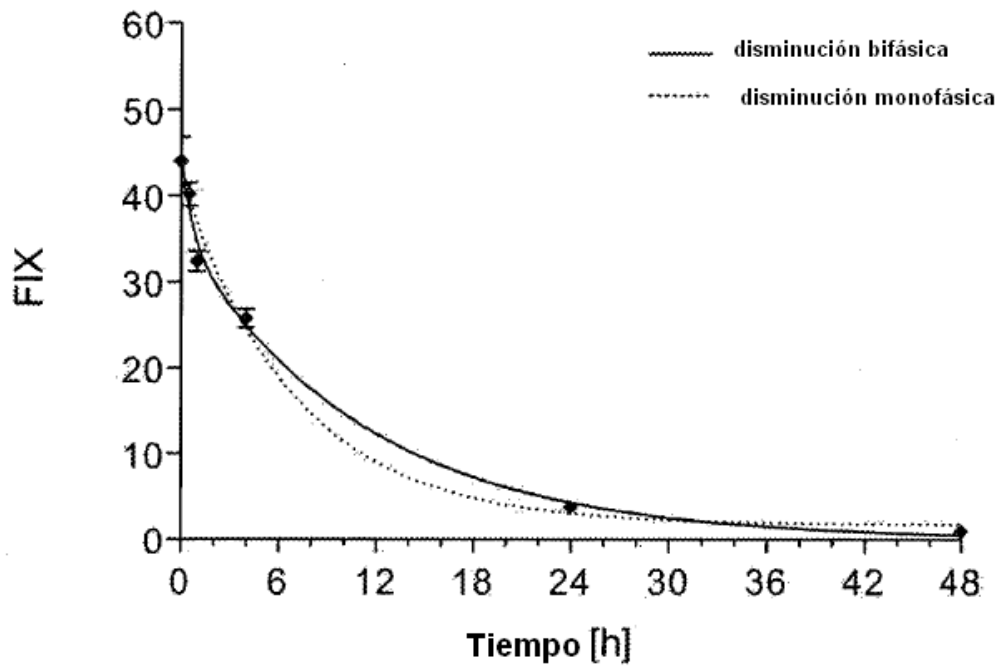


FIG. 3

Semivida de FIX-PEG de 20 kDa en suero de ratón

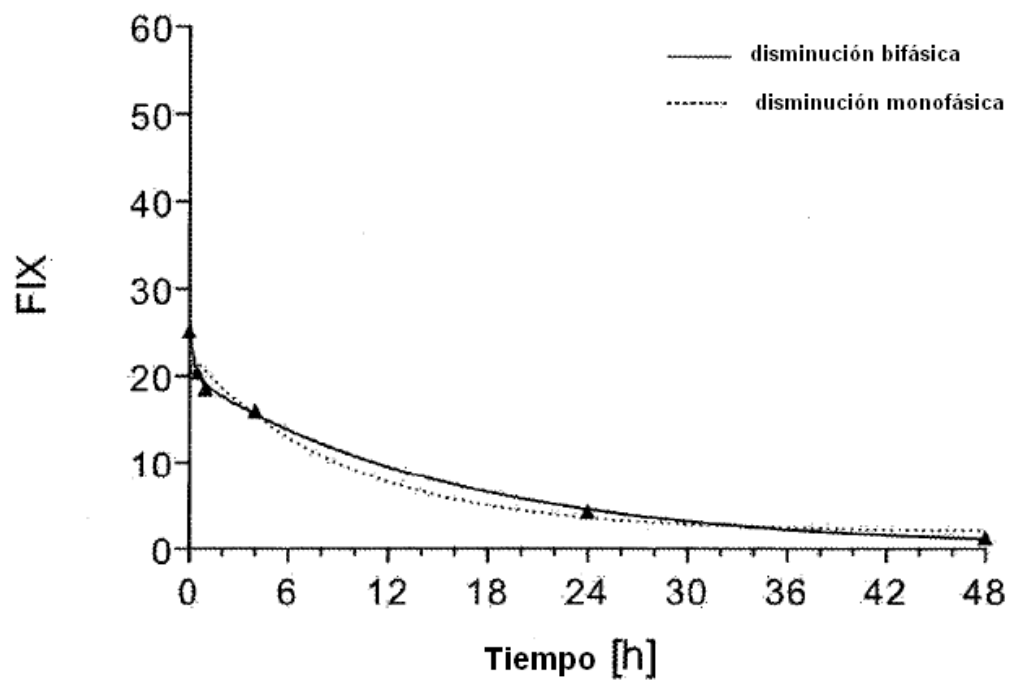


FIG. 4