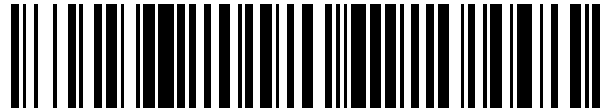


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 598**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2009 E 09790935 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2318050**

54 Título: **Conjugados poliméricos de factor VIII**

30 Prioridad:

01.08.2008 US 184567

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2014

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015 , US y
BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)

72 Inventor/es:

TURECEK, PETER y
SIEKMANN, JUERGEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 524 598 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 poliméricos de factor VIII

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una construcción proteica que comprende el factor VIII (FVIII) de coagulación que está unido a al menos un polímero soluble en agua, que incluye un poli(óxido de alquileo) tal como polietilenglicol. Además la presente invención se refiere a procedimientos para prolongar la semivida *in vivo* del FVIII en la sangre de un mamífero que tiene un trastorno hemorrágico asociado a defectos o deficiencias funcionales del FVIII.

Antecedentes de la invención

10 El factor VIII (FVIII) de coagulación circula en el plasma a una concentración muy baja y está unido no covalentemente al factor de von Willebrand (VWF). Durante la hemostasia, el FVIII se separa del VWF y actúa como un cofactor para la activación del factor X (FX) mediada por el factor IX activado (FIXa) mejorando 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 kDa con la estructura de dominios A1-A2-B-A3-C1-C2. Cuando se purifica del plasma (es decir, "derivado del 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 kDa mientras que, debido a la proteólisis en el dominio B, la cadena pesada está en el intervalo de 90-220 kDa.

20 El FVIII también se sintetiza como una proteína recombinante para uso terapéutico en trastornos hemorrágicos. Se han ideado diversos ensayos *in vitro* para determinar la posible eficacia del FVIII recombinante (FVIIIr) como una medicina terapéutica. Estos ensayos imitan los efectos *in vivo* del FVIII endógeno. El tratamiento con trombina *in vitro* del FVIII da como resultado un rápido aumento y una posterior disminución en su actividad procoagulante, medida por ensayos realizados *in vitro*. Esta activación e inactivación coincide con la proteólisis limitada específica tanto en las cadenas pesadas como en las ligeras, que altera la disponibilidad de diferentes epítomos de unión en el FVIII, por ejemplo, permitiendo al FVIII disociarse del VWF y unirse a una superficie de fosfolípidos o alterando la capacidad de unión a ciertos anticuerpos monoclonales.

25 La ausencia o disfunción del FVIII se asocian al trastorno hemorrágico más frecuente, la hemofilia A. El tratamiento de elección para gestionar la hemofilia A es una terapia de sustitución con concentrados de FVIIIr o derivados de plasma. Los pacientes con hemofilia A grave con niveles de FVIII por debajo del 1 %, están generalmente en terapia profiláctica con el objetivo de mantener el FVIII por encima del 1 % entre las dosis. Teniendo en cuenta las semividas promedio de los diversos productos de FVIII en la circulación, esto se puede lograr normalmente proporcionando FVIII de dos a tres veces a la semana.

30 Hay muchos concentrados en el mercado para el tratamiento de la hemofilia A. Uno de estos concentrados es el producto recombinante Advate®, producido en células CHO y fabricado por Baxter Healthcare Corporation. No se añaden proteínas plasmáticas ni albúmina humana o animal en el procedimiento de cultivo celular, purificación, o 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 siguiente generación con propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas mejoradas, manteniendo las restantes características del producto.

40 Los fármacos de polipéptidos terapéuticos se degradan rápidamente por enzimas proteolíticas y se neutralizan por anticuerpos. Esto reduce su semivida y su tiempo de circulación, limitando de este modo su eficacia terapéutica. Se ha mostrado que la adición de un polímero o carbohidrato soluble a un polipéptido impide la degradación y aumenta la semivida de los polipéptidos. Por ejemplo, la PEGilación de los fármacos de polipéptidos 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 repetitivas de polietilenglicol (PEG) a un fármaco de polipéptidos. La PEGilación de las moléculas puede dar lugar a una resistencia aumentada de los fármacos a la degradación enzimática, a una semivida *in vivo* aumentada, a una frecuencia de dosificación reducida, a una inmunogenicidad disminuida, a una estabilidad física y térmica aumentada, a una solubilidad aumentada, a una estabilidad en líquidos aumentada y a una agregación reducida.

45 De esta manera, la adición de un polímero soluble, tal como a través de la PEGilación, es una estrategia para mejorar las propiedades de un producto de FVIII. El estado de la técnica se documenta por diferentes patentes y solicitudes de patente:

50 La Patente de Estados Unidos N° 6.037.452 describe un conjugado de poli(óxido de alquileo)-FVIII o FIX, donde la proteína está unida covalentemente a un poli(óxido de alquileo) a través de los grupos carbonilo de dicho FVIII.

El documento WO2008025856 describe un FVIII con el dominio B suprimido unido a polietilenglicol a través de

fracciones de carbohidratos oxidados.

5 El documento EP1258497B1 describe un procedimiento para preparar conjugados de FVIII y un polímero biocompatible. Esta patente se complementó con una publicación de Röstin et al. (Bioconj Chem 2000; 11:387-96). Los conjugados comprenden un FVIII recombinante con el dominio B suprimido modificado con monometoxi polietilenglicol. El conjugado tenía la función FVIII reducida y la actividad coagulante disminuía rápidamente con el grado de modificación.

El documento WO04075923A3 describe un conjugado molecular de polímero-FVIII que comprende una pluralidad de conjugados en la que cada conjugado tiene de uno a tres polímeros solubles en agua unidos covalentemente a una molécula de FVIII. La molécula de FVIII tiene el dominio B suprimido.

10 La Patente de Estados Unidos N° 4.970.300 describe un FVIII modificado, en el que un conjugado infundible que comprende una proteína que tiene actividad FVIII se unió covalentemente a un ligando no antigénico.

La Patente de Estados Unidos N° 6.048.720 describe conjugados de un polipéptido y un polímero biocompatible.

El documento WO94/15625 describe un FVIII unido a polietilenglicol que tiene un peso molecular preferido no mayor de 5.000 Daltons.

15 Continúa existiendo una necesidad de un FVIII que tenga un polímero soluble unido para prolongar la semivida del FVIII *in vivo*, por ejemplo, un FVIII PEGilado, tal como un FVIII de longitud completa que tenga, conjugado al mismo, un PEG mayor de 10.000 Daltons, que conserve la actividad funcional al mismo tiempo que proporcione una semivida prolongada *in vivo*, en comparación con un FVIII no PEGilado.

Sumario de la invención

20 La presente invención se refiere a un procedimiento para conjugar PEG, ácido polisiálico (PSA) o dextrano a una fracción de carbohidratos oxidada del Factor VIII de acuerdo con la Reivindicación 1. La presente invención también se refiere a una molécula proteica de acuerdo con la Reivindicación 6.

25 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para conjugar un polímero soluble en agua con una fracción de carbohidratos oxidada del FVIII que comprende poner en contacto la fracción de carbohidratos oxidada con un polímero soluble en agua activado en condiciones que permitan la conjugación. El polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en PEG, ácido polisiálico (PSA) y dextrano. El polímero soluble en agua activado se selecciona el grupo que consiste en PEG-hidrazida, PSA-hidrazina y aldehído-dextrano activado. En otro aspecto de la presente invención, la fracción de carbohidratos se oxida por incubación en un tampón que comprende NaIO₄. En otro aspecto más de la presente invención, la fracción de carbohidrato oxidada de FVIII se localiza en el dominio B del FVIII.

30

En otra realización de la invención, se proporciona un FVIII modificado producido por el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados. De acuerdo con la presente invención, se proporciona una molécula proteica que comprende (a) una molécula de Factor VIII; y (b) al menos un polímero soluble en agua unido a dicha molécula de Factor VIII, en la que el polímero soluble en agua está unido al Factor VIII mediante una o más fracciones de carbohidratos localizadas en el dominio B del factor VIII. El polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en PEG, PSA y dextrano.

35

Figuras

40 La Figura 1 muestra la ampliación y el aumento de masa del FVIII después de la conjugación con PEG medidos por SDS-PAGE con inmunotransferencia posterior.

La Figura 2 muestra las propiedades farmacocinéticas del conjugado PEG-FVIIIr en comparación con el FVIII no conjugado en ratones hemofílicos. Cuadrados abiertos: PEGFVIIIr, dosis de 200 UI FVIII/kg. Rombos negros: FVIIIr nativo, dosis de 200 UI FVIII/kg.

45 La Figura 3 muestra el análisis detallado de los sitios de PEGilación por SDS-PAGE usando diversos anticuerpos anti FVIII.

La Figura 4 muestra la activación y la inactivación inducidas por trombina del FVIIIr nativo y PEGilado.

50 La Figura 5 muestra las bandas que demuestran los dominios del FVIIIr nativo y PEGilado.

La Figura 6 muestra el grado de PEGilación de diversos dominios del FVIIIr nativo y PEGilado.

La Figura 7 muestra la velocidad de inactivación por trombina del FVIIIr nativo y PEGilado.

55

Descripción detallada de la invención

La presente invención es una estructura proteica que comprende una molécula de FVIII que tiene al menos una porción del dominio B intacta, unida a un polímero soluble en agua que incluye PEG, ácido polisialílico (PSA) o dextrano. En una realización de la presente invención, el polímero soluble en agua es una molécula de polietilenglicol que tiene un peso molecular mayor de 10.000 Daltons. En otra realización, el polímero soluble en agua tiene un peso molecular mayor de 10.000 Da a aproximadamente 125.000 Da, de aproximadamente 15.000 Da a 20.000 Da, o de aproximadamente 18.000 Da a aproximadamente 25.000 Da. En una realización, la construcción conserva la actividad funcional completa de los productos de FVIII terapéuticos convencionales, y proporciona una semivida prolongada *in vivo*, en comparación con los productos de FVIII terapéuticos convencionales. En otra realización, la construcción conserva al menos el 50, el 51, el 52, el 53, el 54, el 55, el 56, el 57, el 58, el 59, el 60, el 61, el 62, el 63, el 64, el 65, el 66, el 67, el 68, el 69, el 70, el 71, el 72, el 73, el 74, el 75, el 76, el 77, el 78, el 79, el 80, el 81, el 82, el 83, el 84, el 85, el 86, el 87, el 88, el 89, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99, el 100, el 110, el 120, el 130, el 140, o el 150 por ciento (%) de la actividad biológica en relación con el Factor VIII nativo. En un aspecto relacionado, las actividades biológicas de la construcción y del Factor VIII nativo se determinan por las relaciones de la actividad cromogénica con respecto al valor del antígeno FVIII (FVIII:Cro:FVIII:Ag). En otra realización más de la presente invención, la semivida de la construcción se disminuye o se 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 en relación con la semivida *in vivo* del Factor VIII nativo.

El material de partida de la presente invención es el FVIII, que puede derivar de plasma humano, o producirse por técnicas de modificación por ingeniería genética recombinante, como se describe en las patentes de Estados Unidos Nos 4.757.006, 5.733.873, 5.198.349, 5.250.421, 5.919.766 y en el documento EP 306 968.

En el presente documento, la expresión "Factor VIII" o "FVIII" se refiere a cualquier molécula de FVIII que tiene al menos una porción del dominio B intacta, y que exhibe actividad biológica que está asociada al FVIII nativo. En una realización de la presente invención, la molécula de FVIII es el Factor VIII de longitud completa. La molécula de FVIII es una proteína que está codificada por secuencias de ADN capaces de hibridarse con el ADN que codifica el Factor VIII:C. Dicha proteína puede contener deleciones de aminoácidos en diversos sitios entre o en los dominios A1-A2-B-A3-C1-C2 (Patente de Estados Unidos N° 4.868.112). La molécula de FVIII puede también ser un análogo del FVIII nativo en el que uno o más restos de aminoácidos se han sustituido por mutagénesis dirigida.

Las moléculas de FVIII útiles para la presente invención incluyen la proteína de longitud completa, los precursores de la proteína, las subunidades o los fragmentos biológicamente activos o funcionales de la proteína y los derivados funcionales de los mismos, así como las variantes de los mismos como se describe en el presente documento a continuación. Se ha de entender que la referencia al FVIII incluye todas las formas posibles de dichas proteínas y en la que cada una de las formas del FVIII tiene al menos una porción de o toda la secuencia del dominio B nativo intacta.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "Factor VIII recombinante (FVIIIr)" puede incluir cualquier FVIIIr, heterólogo o de origen natural, obtenido mediante tecnología de ADN recombinante o un derivado del mismo biológicamente activo. En ciertas realizaciones, la expresión incluye proteínas como las descritas anteriormente y ácidos nucleicos, que codifican un FVIIIr de la presente invención. Dichos ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, genes, pre-ARNm, ARNm, variantes polimórficas, alelos, mutantes sintéticos y de origen natural. Las proteínas incluidas en el término FVIIIr incluyen, por ejemplo, aquellas proteínas y polipéptidos descritos anteriormente en el presente documento, proteínas codificadas por un ácido nucleico descrito anteriormente, homólogos entre especies y otros polipéptidos que: (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos mayor de 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 mayor, sobre 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 para la proteína nativa madura), con respecto a un polipéptido codificado por un ácido nucleico de referencia o una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento; y/o (2) se unen específicamente a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales, generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de referencia como se describe en el presente documento, un fragmento inmunogénico del mismo y/o una variante conservativamente modificada del mismo.

Los polinucleótidos que codifican un FVIIIr de la presente invención incluyen aquellos que (1) se hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de referencia como se describe en el presente documento, y las variantes conservativamente modificadas del mismo; (2) tienen una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de nucleótidos mayor de aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o mayor, sobre una región de al menos aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250,

aproximadamente 500, aproximadamente 1000 o más nucleótidos (hasta la secuencia de longitud completa de 1218 nucleótidos de la proteína madura), con respecto a una secuencia de ácido nucleico de referencia como se describe en el presente documento.

5 Como se usa en el presente documento, "FVIII endógeno" incluye un FVIII que se origina en el mamífero que se pretende que reciba tratamiento. La expresión también incluye un FVIII transcrito de un transgen o cualquier otro ADN extraño presente en dicho mamífero. Como se usa en el presente documento, "FVIII exógeno" incluye un FVIII que no se origina en dicho mamífero.

10 Los polipéptidos variantes (o análogos) incluyen variantes de inserción, en los que uno o más restos de aminoácidos se añaden a una secuencia de aminoácidos del FVIII de la presente invención. Las inserciones pueden localizarse en cualquiera o ambos extremos terminales de la proteína y/o pueden posicionarse en las regiones internas de la secuencia de aminoácidos del FVIII. Las variantes de inserción, con restos adicionales en cualquiera o ambos extremos terminales, incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen etiquetas de aminoácidos u otros marcadores de aminoácidos. En un aspecto, la molécula de FVIII puede contener opcionalmente una Met N-terminal, especialmente cuando la molécula se expresa de manera recombinante en una célula bacteriana tal como *E. coli*.

15 En las variantes de delección, se eliminan uno o más restos de aminoácidos en un polipéptido de FVIII como se describe en el presente documento. Las delecciones pueden efectuarse en uno o ambos extremos terminales del polipéptido de FVIII, y/o con eliminación de uno o más restos en la secuencia de aminoácidos del FVIII. Las variantes de delección, por lo tanto, incluyen todos los fragmentos de una secuencia del polipéptido de FVIII.

20 En las variantes de sustitución, se eliminan uno o más restos de aminoácidos de un polipéptido de FVIII y se reemplazan con restos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son conservativas en la naturaleza y las sustituciones conservativas de este tipo se conocen bien en la técnica. De manera alternativa, la presente invención incluye sustituciones que también son no conservativas. Las sustituciones conservativas ejemplares se describen en Lehninger, [Biochemistry, 2ª Edición; Worth Publishers, Inc., Nueva York (1975), págs. 71-77] y se exponen
25 inmediatamente a continuación.

SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS

CADENA LATERAL CARACTERÍSTICA	AMINOÁCIDO
Apolar (hidrófoba):	
A. Alifática	A L I V P
B. Aromática	F W
C. Que contiene azufre	M
D. Al límite	G
Polar sin carga:	
A. Hidroxilo	S T Y
B. Amidas	N Q
C. Sulfhidrilo	C
D. Al límite	G
Cargada positivamente (básica)	K R H
Cargada negativamente (ácida)	D E

De manera alternativa, las sustituciones conservativas ejemplares se exponen inmediatamente a continuación.

SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS II

RESTO ORIGINAL	SUSTITUCIÓN EJEMPLAR
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

Una secuencia de polipéptido o polinucleótido "de origen natural" es típicamente de un mamífero que incluye un primate, por ejemplo, un ser humano; un roedor, por ejemplo, una rata, un ratón, un hámster; una vaca, un cerdo, un caballo, una oveja o cualquier mamífero. Los ácidos nucleicos y las proteínas de la invención pueden ser moléculas recombinantes (por ejemplo heterólogas y que codifican la secuencia de tipo silvestre o una variante de la misma, o de origen no natural). Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de referencia incluyen, por ejemplo, UniProtKB/Swiss-Prot P00451 (FA8_HUMAN); Gitschier J et al., Characterization of the human Factor VIII gene, *Nature*, 312(5992): 326-30 (1984); Vehar GH et al., 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).

Como se usa en el presente documento "derivado biológicamente activo" o "variante biológicamente activa" incluye cualquier derivado o variante de una molécula que tiene sustancialmente la misma función y/o propiedades biológicas de dicha molécula, tales como propiedades de unión, y/o la misma base estructural, tal como un esqueleto peptídico o una unidad polimérica básica.

Como se usa en el presente documento, "FVIII derivado de plasma" o "plasmático" incluye todas las formas de la proteína encontradas en la sangre obtenida de un mamífero que tienen la propiedad de activar la ruta de la coagulación.

En diversos aspectos, la producción de FVIIIr incluye cualquier procedimiento conocido en la técnica para (i) la producción de ADN recombinante por modificación con ingeniería genética, (ii) introducir ADN recombinante en células procariontas o eucariotas, por ejemplo, por transfección, electroporación o microinyección, (iii) cultivar dichas células transformadas, (iv) expresar el FVIIIr, por ejemplo, constitutivamente o tras la inducción, y (v) aislar dicho FVIIIr, por ejemplo, del medio de cultivo o recogiendo las células transformadas, para (vi) obtener un FVIIIr purificado.

En otros aspectos, el FVIIIr se produce por la expresión en un sistema huésped procarionta o eucariota adecuado caracterizado por producir una molécula de FVIIIr farmacológicamente aceptable. Los ejemplos de células eucariotas son las células de mamíferos, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2.

En otros aspectos adicionales, se usa una amplia diversidad de vectores para la preparación de los FVIIIr y se seleccionan de vectores de expresión eucariotas y procariontas. Los ejemplos de vectores para la expresión procarionta incluyen plásmidos tales como pRSET, pET y pBAD, en los que los promotores usados en los vectores de expresión procariontas incluyen uno o más de lac, trc, trp, recA o araBAD. Los ejemplos de vectores para la expresión eucariota incluyen: (i) para la expresión en levaduras, vectores tales como pAO, pPIC, pYES o pMET, que usan 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, que usan 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 los vectores derivados de, en un aspecto, sistemas víricos tales como el virus de la vacuna, los virus adeno-asociados, los virus del herpes o los retrovirus, que usan promotores tales como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y β -actina.

Las moléculas de FVIII pueden conjugarse con un polímero soluble en agua por cualquiera de una diversidad de procedimientos químicos (Roberts JM et al., *Advan Drug Delivery Rev* 2002;54:459-76). Por ejemplo, el FVIII puede PEGilarse por la conjugación del PEG con los grupos amino libres de la proteína usando ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS). El polímero soluble en agua, por ejemplo PEG, puede unirse a los grupos SH libres usando química de maleimida o la unión de hidrazidas de PEG o aminas de PEG a las fracciones carbohidrato del FVIII después de la oxidación anterior.

El FVIII puede conjugarse con otros polímeros solubles en agua, donde los polímeros solubles en agua son, por ejemplo, óxido de polialquileno, polivinil pirrolidona, alcohol polivinílico, polioxiazolina, una poli acrilomorfolina, carbohidrato o un polisacárido tal como ácido polisiálico (PSA) o dextrano. La unión del polímero soluble en agua puede llevarse a cabo por unión directa a la proteína o mediante moléculas enlazadoras. Un ejemplo de un enlazador químico es MBPH (hidrazida del ácido 4-[4-N-Maleimidofenil]butírico) que contiene una hidrazida selectiva de carbohidratos y un grupo maleimida reactivo de sulfhidrilo (Chamow et al., *J Biol Chem* 1992;267:15916-22).

La conjugación puede realizarse por acoplamiento directo (o acoplamiento mediante sistemas enlazadores) del polímero soluble en agua al Factor VIII bajo la formación de enlaces estables. Además pueden usarse sistemas enlazadores degradables, liberables o hidrolizables en la presente invención (Tsubery et al. *J Biol Chem* 2004;279:38118-24 / Greenwald et al, *J Med Chem* 1999;42:3657-67 / Zhao et al., *Bioconj Chem* 2006;17:341-51 / WO2006/138572A2 / US7259224B2 / US7060259B2).

Como se analiza en el presente documento, una realización de la presente invención es la unión del polímero soluble activado a la fracción de carbohidratos oxidada del FVIII. La expresión "polímero soluble en agua activado" se usa en el presente documento para referirse a polímeros solubles en agua usados para unirse al FVIII que tiene un grupo funcional activo, que permite la conjugación química del polímero soluble en agua a un enlazador o directamente al FVIII (que contiene un grupo aldehído activo). La expresión "fracción de carbohidratos oxidada" como se usa en el presente documento se refiere a un FVIII que contiene grupos aldehído libres, que se generan por

un agente oxidativo tal como el NaIO_4 . En un aspecto de la presente invención, un aldehído-dextrano activado (que contiene un grupo aldehído activo) se une a los grupos aldehído del FVIII mediante un enlazador de dihidrazida.

De acuerdo con el patrón de glucosilación del FVIII (Lenting et al; Blood, 92:3983-96(1998)), la conjugación del FVIII mediante las fracciones de carbohidratos probablemente debería tener lugar en el dominio B del FVIII. Se desea seleccionar como diana el dominio B para dichas reacciones de conjugación ya que el dominio B no desempeña ningún papel en la actividad del FVIII. La glucoconjugación enzimática se describe en el documento US 2008/00700275.

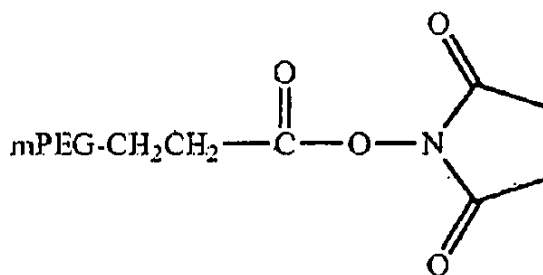
También se describe en el presente documento la modificación del FVIII mediante restos de lisina por el uso de derivados de polietilenglicol que contienen un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) activo tal como succinato de succinimidilo, glutarato de succinimidilo o propionato de succinimidilo. Estos derivados reaccionan con los restos de lisina del FVIII en condiciones suaves formando un enlace amida estable. La longitud de la cadena del derivado de PEG puede ser de 5.000 Da. Otros derivados de PEG con longitudes de cadena de 500 a 2.000 Da, de 2.000 a 5.000 Da, mayores de 5.000 hasta 10.000 Da o mayores de 10.000 Da hasta 20.000 Da, o mayores de 20.000 hasta 150.000 Da pueden usarse incluyendo estructuras lineales y ramificadas.

Los procedimientos alternativos para la PEGilación de los grupos amino son la conjugación química con carbonatos de PEG formando enlaces de uretano, o la reacción con aldehídos o cetonas por aminación reductora formando enlaces amida secundarios.

Una molécula de FVIII puede modificarse químicamente usando derivados de PEG que estén comercialmente disponibles. Estos derivados de PEG pueden tener estructuras lineales o ramificadas. Más adelante se indican ejemplos de derivados de PEG que contienen grupos NHS.

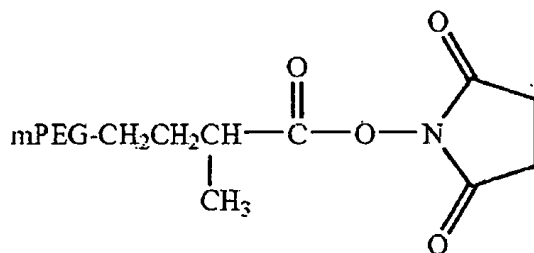
Los siguientes derivados de PEG son ejemplos de aquellos comercialmente disponibles en Nektar Therapeutics (Huntsville, Ala.; véase www.nektar.com/PEG catálogo de reactivos; Nektar Advanced PEGylation, lista de precios 2005-2006):

mPEG-Propionato de succinimidilo (mPEG-SPA).

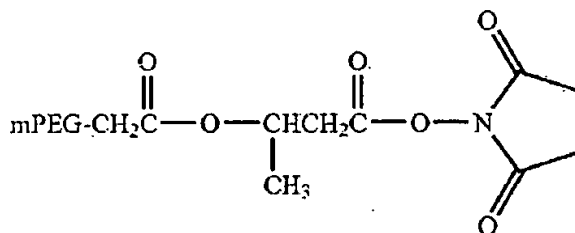


25

mPEG α -Metilbutanoato de succinimidilo (mPEG-SMB)

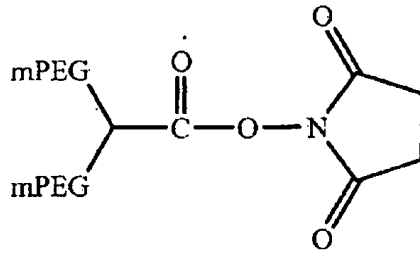


mPEG-CM-HBA-NHS (CM=carboximetilo; HBA=Ácido hidroxibutírico)



30 Estructura de un derivado de PEG Ramificado (Nektar Therapeutics):

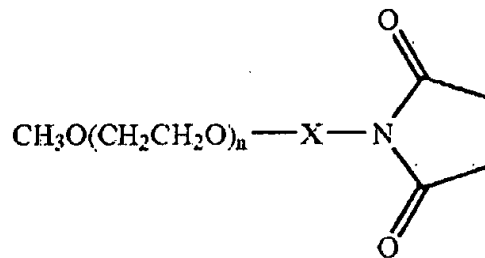
PEG de N-Hidroxisuccinimida Ramificado (mPEG2-NHS)



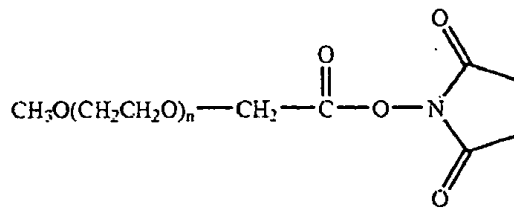
Este reactivo con estructura ramificada lo describen con más detalle Kozlowski et al. (BioDrugs 2001;5:419-29).

Otros ejemplos de derivados de PEG están comercialmente disponibles en NOF Corporation (Tokio, Japón, véase www.nof.co.jp/english: Catálogo 2005).

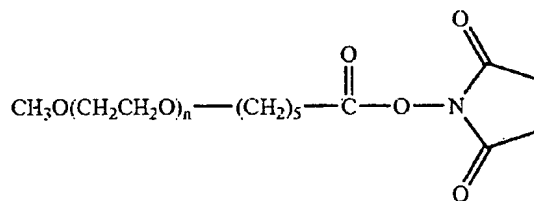
Estructura General de los derivados de PEG Lineales (NOF Corp.):



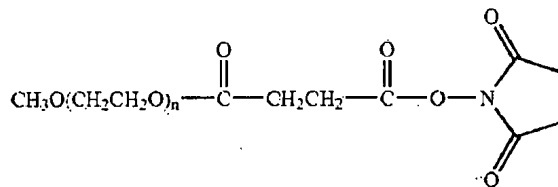
X=carboximetilo



10 X=carboxipentilo

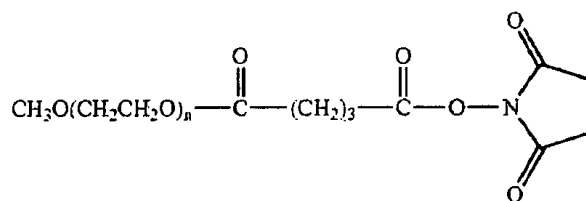


x=succinato



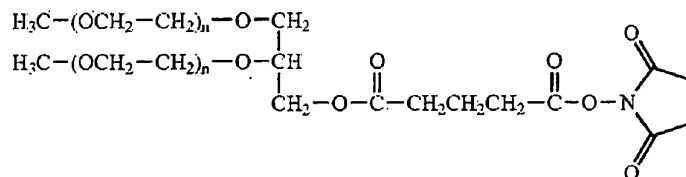
mPEG Succinato de succinimidilo

x=glutarato

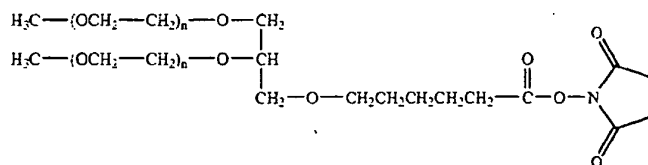


mPEG Glutarato de succinimidilo

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



5 2,3-Bis(metilpolioxi-etilen-oxi)-1-(succinimidil carboxipentiloxi)propano



Estos derivados de propano muestran un esqueleto de glicerol con un patrón de sustitución 1,2. También pueden usarse los derivados de PEG ramificados en base a estructuras de glicerol con sustitución 1,3 u otras estructuras ramificadas descritas en el documento US2003/0143596A1.

10 También pueden usarse derivados de PEG degradables (por ejemplo, enlazadores hidrolizables) como describen Tsubery et al. (J Biol Chem 2004;279:38118-24) y Shechter et al. (documento WO0408928A3).

Sorprendentemente, el FVIII PEGilado de la presente invención exhibe una actividad funcional completa, combinada con una semivida del FVIII *in vivo* prolongada. Además el FVIIIr PEGilado parece ser más resistente frente a la inactivación por trombina. Esto se mostró a través de una diversidad de procedimientos *in vitro* e *in vivo*, y se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

15 Como se usa en el presente documento, "fracciones de ácido siálico" incluye monómeros o polímeros de ácido siálico ("polisacáridos") que son solubles en una solución o suspensión acuosa y tienen poco impacto o ninguno negativo, tal como efectos secundarios, para los mamíferos tras la administración del conjugado PSA-FVIII en una cantidad farmacéuticamente eficaz. No hay limitación particular para la unidad de ácido siálico usada de acuerdo con la presente invención. Los polímeros se caracterizan, en un aspecto, por tener de 1 a 4 unidades. En ciertos aspectos, diferentes unidades de ácido siálico se combinan en una cadena.

20 Las fracciones de ácido siálico pueden unirse al FVIII, por ejemplo, por el procedimiento descrito en la Patente de Estados Unidos N° 4.356.170. En diversas realizaciones de la presente invención, el compuesto polisacárido es un polisacárido de origen natural, un derivado de un polisacárido de origen natural, o un derivado de polisacárido de origen natural. Generalmente, todos los restos de sacárido en el compuesto son restos de ácido siálico.

También se conocen otras técnicas para unir PSA con polipéptidos. Por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos N° 2007/0282096 describe conjugar un derivado de amina o hidrazida, por ejemplo, de PSA, con proteínas. Además, la Publicación de Estados Unidos N° 2007/0191597 describe derivados de PSA que contienen un grupo aldehído para la reacción con sustratos (por ejemplo, proteínas) en el extremo terminal reductor.

30 En una realización de la invención, la porción de ácido polisialílico del compuesto polisacárido es altamente hidrófila, y en otra realización todo el compuesto es altamente hidrófilo. La hidrofilia la confieren principalmente los grupos carboxilo que cuelgan de las unidades de ácido siálico, así como los grupos hidroxilo. La unidad de sacárido puede contener otros grupos funcionales, tales como, grupos amina, hidroxilo o sulfato, o combinaciones de los mismos. Estos grupos pueden estar presentes en compuestos sacáridos de origen natural, o introducirse en compuestos polisacáridos derivados.

35 Los compuestos polisacáridos de uso particular para la presente invención son, en un aspecto, aquellos producidos por bacterias. Algunos de estos polisacáridos de origen natural se conocen como glucolípidos. En una realización, los compuestos polisacáridos carecen sustancialmente de unidades de galactosa terminales.

En una realización de la presente invención, se prolonga la semivida *in vivo* de la construcción proteica. En una realización relacionada, la semivida *in vivo* de la construcción proteica se prolonga al menos por un factor de dos, mientras que en otra realización la semivida *in vivo* se prolonga al menos por un factor de tres, en comparación con el FVIII que no está unido a un polímero soluble en agua.

- 5 En una realización la construcción proteica de la presente invención puede administrarse por inyección, tal como inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.

Para administrar composiciones que comprenden una construcción proteica de la presente invención a seres humanos o a animales de ensayo, en un aspecto, las composiciones comprenden uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables. Las expresiones "farmacéuticamente" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y a composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas, tal como productos de agregación y escisión, y además no producen reacciones alérgicas, u otras reacciones adversas, cuando se administran usando vías bien conocidas en la técnica, como se describe a continuación. "Transportadores farmacéuticamente aceptables" incluye cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos y similares, clínicamente útiles, incluyendo aquellos agentes desvelados anteriormente.

Como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" incluye una dosis adecuada para tratar a un mamífero que tiene un trastorno hemorrágico como se explica anteriormente.

Las composiciones pueden administrarse por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, por pulverizador mediante inhalación, por vía vaginal, rectal, o por inyección intracranial. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intracisternal o técnicas de infusión. También se contempla la administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y o implante quirúrgico en un sitio particular. Generalmente, las composiciones carecen esencialmente de pirógenos, así como de otras impurezas que pueden ser perjudiciales para el receptor.

25 Se pueden llevar a cabo administraciones únicas o múltiples de las composiciones, seleccionando los niveles de dosis y patrones el médico tratante. Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosis apropiada dependerá del tipo de enfermedad que vaya a tratarse, como se describe anteriormente, de la gravedad y de la evolución de la enfermedad, de si el fármaco se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta al fármaco, y del criterio del médico.

30 También se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una construcción proteica como se define anteriormente. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un transportador, un diluyente, una sal, un tampón o un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede usarse para tratar los trastornos hemorrágicos definidos anteriormente. La composición farmacéutica de la presente invención puede ser una solución o un producto liofilizado. Las soluciones de la composición farmacéutica pueden someterse a cualquier proceso de liofilización adecuado.

También se describen en el presente documento kits que comprenden una composición de la invención envasada de manera que facilite su uso para la administración a los sujetos. Dicho kit incluye un compuesto o una composición descritos en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende una construcción proteica), envasado en un envase, tal como un frasco o un recipiente sellado, con una etiqueta fijada al envase o incluida en el envasado que describa el uso del compuesto o de la composición al llevar a cabo el procedimiento. En una realización, el kit contiene un primer envase que tiene una composición que comprende una construcción proteica y un segundo envase que tiene una solución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición del primer envase. En un ejemplo, el compuesto o la composición se envasan en una forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir adicionalmente un dispositivo adecuado para administrar la composición de acuerdo con una vía de administración específica. Preferentemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de la composición proteica o peptídica terapéutica.

Ejemplos

Ejemplo de Referencia 1

PEGilación de Restos de Lisina en FVIIIr con mPEG Succinato de Succinimidilo

50 Una solución de un volumen de FVIIIr derivado del proceso de fabricación Advate (3.400 U/ml) se filtró en gel a través del uso de columnas Econo-Pac 10DG (Bio-Rad) usando tampón Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, a pH 7,4, que contenía sacarosa al 0,5 % y Polisorbato 80 al 0,1 %. A continuación se añadió mPEG Succinato de succinimidilo (Abuchowski et al. Cancer Biochim Biophys 1984;7:175-86) con una longitud de cadena de 5.000 Da (PEG-SS 5000) a esta solución con agitación suave (5 mg PEG-SS/mg proteína) y el valor del pH se ajustó a 7,4 por la adición gota a gota de NaOH 0,5 M. A continuación se llevó a cabo la PEGilación con agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente se aplicó la mezcla de reacción a una resina equilibrada de cromatografía de intercambio iónico (columna Fractogel EMD TMAE 650M/Pharmacia XK-1,0, altura del lecho: 15,0 cm) en tampón Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, a pH 7,4, que contenía sacarosa al 0,5 % y Polisorbato 80 al 0,1 %. A continuación se lavó la columna con 20 VC de tampón de equilibrado para eliminar el exceso de reactivo y se eluyó el FVIIIr PEGilado con tampón de elución (Hepes 20 mM, NaCl 1,0 M, sacarosa al 0,5 %, Polisorbato 80 al 0,1 %, a pH 7,4). El eluido se concentró por ultrafiltración/diafiltración con una membrana que consistía en celulosa regenerada y con un límite de peso molecular de 30 kDa que usa un sistema tampón que consiste en Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, sacarosa al 0,5 %, a pH 7,4.

Ejemplo de Referencia 2

10 Caracterización Bioquímica del FVIIIr PEGilado *in vitro*

El FVIIIr derivado del proceso de fabricación Advate se PEGiló, de acuerdo con el Ejemplo 1 y el producto de FVIII PEGilado se caracterizó bioquímicamente. La actividad funcional del PEG-FVIIIr se determinó por el uso del ensayo cromogénico del FVIII (Rosen S, Scand J Haematol 1984;33 (Supl 40):139-45). El procedimiento es en base a Ph. Eur. 5ª Edición (5.05) 2.7.4 Assay of Blood Coagulation Factor VIII.

15 Una muestra, que contenía factor VIII (FVIII:C), se mezcló con trombina, factor IX activado (FIXa), fosfolípidos y factor X (FX) en un tampón que contenía calcio. El FVIII se activó por la trombina y posteriormente formó un complejo con los fosfolípidos, el FIXa y los iones calcio. Este complejo activó el factor X en factor Xa, que sucesivamente escinde el sustrato cromogénico FXa-1 (AcOH*CH3OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA). La evolución en el tiempo de la para-nitroanilina (pNA) liberada se midió con un lector de microplaca a 405 nm. La pendiente de la reacción es proporcional a la concentración del factor VIII en la muestra. Se midió el valor del antígeno FVIII por el uso de un sistema ELISA disponible en el comercio (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canadá) con pocas modificaciones. A partir de estos valores se calcularon las relaciones FVIII cromógeno/FVIII antígeno. El contenido proteico en las preparaciones se determinó midiendo la densidad óptica a 280 nm. A partir de estos datos se calculó el contenido proteico (Hoyer LW en: Human Protein Data. Entregas 1-6; Ed. Heberli; Wiley V C H, Weinheim, Alemania, 1998) y se expresó en mg/ml.

TABLA 1

	FVIIIr nativo	PEG-FVIIIr PEG-SS 5K (5 mg por mg de proteína)
Actividad FVIII:Cro [U/ml]	3.430	64
FVIII:Ag [U/ml]	4.067	81
Relación FVIII:Cro/FVIII:Ag	0,84	0,79
Recuperación de actividad biológica (%)	100	94

Los datos de la Tabla 1 muestran que en la preparación del FVIIIr PEGilado, la actividad biológica (expresada por la relación de actividad cromogénica del FVIII a antígeno FVIII) se recupera más del 90 % en comparación con la actividad biológica del FVIIIr nativo (100 %).

Ejemplo de Referencia 3

Caracterización del FVIIIr PEGilado por SDS-PAGE y Técnicas de Inmunotransferencia

El FVIIIr nativo se caracterizó por SDS PAGE en condiciones reductoras por el uso de un gel en gradiente de poliacrilamida al 4-12 % obtenido de Invitrogen (Carlsbad, Calif., EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como marcadores de peso molecular (PM) se usaron los marcadores Precision Plus (10 kDa-250 kDa) obtenidos en Bio-Rad (Hércules, Calif., EEUU). A continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF obtenida en Bio-Rad (Hércules, Calif., EEUU) por electrotransferencia y posteriormente se incubaron con un anticuerpo policlonal de oveja antiFVIII:C humano obtenido en Cedarlane (Hornby, Ontario, Canadá). Las últimas etapas del procedimiento de inmunotinción fueron la incubación con una fosfatasa alcalina (ALP) conjugada con un anticuerpo anti-oveja obtenido en Accurate (Westbury, N.Y., EEUU) seguida de la visualización final por el uso de un kit de sustrato ALP (Bio-Rad, (Hércules, Calif., EEUU). Los resultados se resumen en la Figura 1. La transferencia demuestra la estructura de dominios del FVIIIr nativo y el PEGilado. Se muestra que el FVIIIr PEGilado tiene bandas más anchas y masas moleculares altas que la proteína recombinante nativa.

Ejemplo de Referencia 4

45 Propiedades farmacocinéticas del FVIIIr PEGilado en un Modelo de Ratón Genosuprimido (*Knock Out*) deficiente para FVIII

Se usaron ratones deficientes para FVIII, descritos en detalle por Bi et al. (Nat Genet 1995;10:119-21), como un modelo de hemofilia A humana grave. Grupos de 5 ratones recibieron una inyección embolada (10 ml/kg) a través de la vena de la cola de PEG-FVIIIr (PEG-SS, 5K) preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 o bien de FVIIIr nativo en

una dosis de 200 UI FVIII/kg peso corporal. Se preparó plasma en citrato por punción cardiaca después de la anestesia de los grupos respectivos, 5 minutos, 3, 6, 9 y 24 horas después de la inyección. Los niveles de actividad del FVIII se midieron en las muestras de plasma. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 2. La semivida promedio aumentó de 1,9 horas (para el FVIIIr nativo) a 4,9 horas (para el FVIIIr PEGilado), el área bajo la curva (ABC) aumentó de 13,0 a 25,2 horas*UI/ml. El cálculo de la semivida se realizó con MicroMath Scientist, modelo 1 de la biblioteca farmacocinética (MicroMath, Saint Louis, Mo., EEUU).

Ejemplo de Referencia 5

Análisis Detallado de la PEGilación del FVIIIr por SDS-PAGE y Técnicas de Inmunotransferencia

Se hizo una digestión del FVIIIr nativo y el PEGilado con trombina 1 nM durante 60 minutos a 60 °C, que dio como resultado una escisión específica de la molécula de FVIII con productos de degradación bien definidos. Estos fragmentos de cadena ligera y pesada se separaron por SDS-PAGE seguido de electrotransferencia, como se ha descrito en el Ejemplo 3. Para visualizar los fragmentos escindidos, se aplicaron un anticuerpo policlonal y anticuerpos monoclonales frente a los dominios A1 y A2 de la cadena pesada, al dominio B y al dominio A3 N-terminal de la cadena ligera.

Como se aprecia en la Figura 3, todos los dominios se PEGilaron, aunque a un grado diferente. El dominio B se PEGiló fuertemente. Tanto los dominios A1 como A2 de la cadena pesada se PEGilaron parcialmente. Podrían observarse diversos grados de PEGilación (mono-, di-, tri- ...) en el dominio A3 de la cadena ligera. De acuerdo con el Ejemplo 6, el FVIII PEGilado, parecía ser más resistente a la trombina.

Ejemplo de Referencia 6

Resistencia a la trombina del FVIIIr PEGilado

El tratamiento del FVIII *in vitro* con trombina da como resultado un rápido aumento y una posterior disminución en su actividad procoagulante. La velocidad de activación e inactivación, que depende de la concentración de trombina y de la integridad del FVIII, se monitorizó por un ensayo de cofactor FIXa, de la siguiente manera:

Se incubó el FVIII a 37 °C con trombina 0,5 o 1 nM. Se retiraron submuestras a intervalos de tiempo entre 0,5 a 40 minutos y se añadieron a la mezcla de FIXa, FX, vesículas de PL y CaCl₂ que también contenía un inhibidor de trombina específico para detener las reacciones mediadas por trombina adicionales y se incubaron durante 3 minutos. Se añadió una submuestra a un sustrato cromogénico, que se escinde selectivamente por el FXa y contenía EDTA para parar la activación del FXa adicional. Después de una incubación de 15 min, la reacción se terminó con ácido acético. Los valores de absorbancia (A405), que son proporcionales a la concentración de FXa, se midieron en un lector de ELISA y se convirtieron en concentraciones de FXa usando una curva de referencia de FXa purificado. Las concentraciones de FXa generadas se representaron frente al tiempo de incubación con trombina.

La velocidad de inactivación de pseudo-primer orden del FVIII se determinó ajustando la parte de disminución de las curvas con un ajuste exponencial único.

TABLA 2

Trombina	Velocidad de inactivación de primer orden k' (1/min)		
	FVIII nativo	PEG-FVIII	k' con respecto a PEG/nativo
0,5 nM	0,14	0,08	0,57
1 nM	0,24	0,14	0,58

Como se muestra en la Figura 4 y en la Tabla 2, el FVIIIr PEGilado mostró una velocidad de inactivación más lenta a ambas concentraciones de trombina aplicadas.

Ejemplo de Referencia 7

PEGilación de Restos de Lisina en FVIIIr con 2,3-Bis(metilpolioxietilen-oxi)-1-(1,5-dioxo-5-succinimidiloxi, pentiloxi)propano Ramificado

Se preparó una solución de FVIIIr en tampón Hepes 20 mM a pH 7,4 que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 0,5 % y Polisorbato 80 al 0,1 % a partir de material a granel derivado del proceso de fabricación Advate que contenía 489 IU FVIII/ml. Se añadió un reactivo de PEG glutarato de succinimidilo ramificado (PEG-SG) (2,3-Bis(metilpolioxietilen-oxi)-1-(1,5-dioxo-5-succinimidiloxi, pentiloxi) propano) obtenido en NOF Corporation (Tokio, Japón) con un peso molecular de 20 kDa a 153 ml de esta solución con agitación suave (5 mg reactivo/mg proteína) y el valor de pH se ajustó a 7,4 por la adición gota a gota de NaOH 0,5 M después de 10 minutos. A continuación se realizó la PEGilación del FVIIIr con agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente se aplicó la mezcla de reacción a una resina equilibrada de cromatografía de intercambio iónico (columna Fractogel EMD TMAE 650M/Pharmacia XK-50, altura del lecho: 14,5 cm) en tampón Hepes 20 mM, NaCl

150 mM, a pH 7,4, que contiene sacarosa al 0,5 % y Polisorbato 80 al 0,1 % que usa una velocidad de flujo lineal de 1 cm/min. La columna se lavó con 25 VC de tampón de equilibrado para eliminar el exceso de reactivo (velocidad de flujo lineal: 2 cm/min) y se eluyó el FVIIIr PEGilado con tampón de elución (Hepes 20 mM, NaCl 1,0 M, sacarosa al 0,5 %, Polisorbato 80 al 0,1 %, a pH 7,4) a una velocidad de flujo lineal de 0,5 cm/min. A continuación el eluido se concentró por ultrafiltración/diafiltración con una membrana que consiste en celulosa regenerada y con un límite de peso molecular 30 kDa que usa un sistema tampón que consiste en Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, sacarosa al 0,5 %, a pH 7,4.

Ejemplo de Referencia 8

Caracterización *in vitro* del FVIIIr PEGilado con PEG-SG Ramificado de 20 kDa

10 El FVIIIr derivado del procedimiento de fabricación Advate se PEGiló mediante restos de lisina usando un reactivo PEG-SG ramificado de acuerdo con el Ejemplo 7 y el producto FVIIIr PEGilado se caracterizó bioquímicamente como se describe en el Ejemplo 2.

TABLA 3

	FVIIIr nativo	PEG-FVIIIr PLG-SG 20K (5 mg por mg proteína)
Actividad FVIII:Cro [U/ml]	9,950	1,040
FVIII:Ag [U/ml]	20,807	1,763
Relación FVIII:Cro/FVIII:Ag	0,48	0,59
Recuperación de actividad biológica (%)	100	120

15 Los datos de la Tabla 3 muestran que en la preparación de FVIIIr PEGilado la actividad biológica (expresada por la relación de actividad cromogénica del FVIII a antígeno FVIII) se recuperó completamente en comparación con la actividad biológica del FVIIIr nativo (100 %).

20 El FVIIIr PEGilado se caracterizó por SDS-PAGE y técnicas de inmunotransferencia bajo condiciones reductoras usando un gel en gradiente de poliácridamida al 4-12 % como se describe en el Ejemplo 3. Los resultados se resumen en la Figura 5. La transferencia demuestra la estructura de dominios del FVIIIr nativo y el PEGilado. Se muestra que el FVIIIr PEGilado tiene bandas más anchas y masas moleculares altas que la proteína recombinante nativa.

25 Para un análisis más detallado de la PEGilación de la preparación de FVIIIr por SDS-PAGE y técnicas de inmunotransferencia, se hizo una digestión del FVIIIr nativo y el PEGilado con trombina 1 nM durante 60 minutos a 60 °C, que dio como resultado una escisión específica de la molécula de FVIII con productos de degradación bien definidos, como se describe en el Ejemplo 5. Los fragmentos se separaron por SDS-PAGE seguido de electrotransferencia y se visualizaron por diferentes anticuerpos anti-FVIII. Como se aprecia en la Figura 6, todos los dominios se PEGilaron, aunque a un grado diferente. El dominio B se PEGiló fuertemente. Podían observarse diversos grados de PEGilación (mono-, di-, tri-PEGilación) en el dominio A3 de la cadena ligera. Los resultados indican que el FVIIIr PEGilado parecía ser más resistente a la trombina.

30 La velocidad de activación e inactivación por trombina se monitorizó por un ensayo de cofactor FIXa como se describe en el Ejemplo 6. La velocidad de inactivación de pseudo-primer orden del FVIII se determinó ajustando la parte de disminución de las curvas con un ajuste exponencial único.

TABLA 4

Velocidad de inactivación de primer orden k' (1/min)			
Trombina	FVIII nativo	PEG-FVIII	k' con respecto a PEG/nativo
0,5 nM	0,13	0,09	0,67
1 nM	0,21	0,15	0,71

35 Como se muestra en la Figura 7 y en la Tabla 4, el FVIIIr PEGilado mostró una velocidad de inactivación más lenta a ambas concentraciones de trombina aplicadas.

Ejemplo 9

PEGilación del FVIIIr a través de una fracción de carbohidratos

40 Para la preparación de un conjugado PEG-FVIIIr mediante restos de carbohidratos, se prepara una solución de FVIIIr (concentración final: 1,2 mg/ml) en tampón fosfato 25 mM, a pH 6,7. Se añade NaIO₄ (concentración final 0,3 mM) para la oxidación de los restos de carbohidratos (Roberts et al.; Advanced Drug Del Rev.; 54:459-76 (2002); Meir and Wilchek; Meth Enzymol;138: 429-42(1987)). La reacción se desactivó por la adición de glicerol en una concentración final del 10 %, y los reactivos en exceso se separaron por centrifugación repetida usando dispositivos Amicon Micron-10 (Amicon, Billerica, MA). Se añadió PEG-hidrazida (PM 3300 Da / Nektar, Huntsville, Alabama)

para dar una concentración final de reactivo 1,5 mM. La PEGilación se realizó después durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el conjugado obtenido y el reactivo en exceso se separaron por centrifugación repetida en dispositivos Amicon Micro-10 usando tampón fosfato 25 mM, a pH 6,7.

Ejemplo 10

5 Polisialilación del FVIIIr con PSA-hidrazina

Para la preparación de un conjugado PSA-FVIIIr mediante restos de carbohidratos, se prepara una solución de FVIIIr (concentración final: 1 mg/ml) en tampón acetato sódico 20 mM, a pH 6,0. Se añade NaIO_4 (concentración final 0,25 mM) para la oxidación de los restos de carbohidratos. La oxidación se lleva a cabo durante 60 minutos a 4 °C en la oscuridad. Se añade bisulfito sódico (concentración final 25 mM) para detener la reacción. El peryodato sódico en exceso se separa por filtración en gel en columnas DG-10 (Bio-Rad). Posteriormente, se añade PSA-hidrazina con una longitud de cadena de 20 kDa (preparado de acuerdo con el documento WO2006/016168) (concentración final 10 mM). El procedimiento de polisialilación se lleva a cabo durante 2 h a temperatura ambiente. El FVIIIr polisialilado se purifica por HIC en Butil-Sefarosa (GE-Healthcare). Se añade una solución de NaCl 5 M a la mezcla para dar una concentración final de NaCl 3 M. Esta mezcla se aplica a la columna cargada con Butil-Sefarosa (GE-Healthcare) y la elución del conjugado de FVIIIr-PSA se lleva a cabo con tampón Hepes 50 mM, a pH 7,4, que contiene CaCl_2 6,7 mM. Después de la elución del conjugado, el pH se ajusta a pH 6,9.

Ejemplo 11

Purificación y derivatización del Ácido Polisiálico

El Ácido Polisiálico se purificó por cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sefarosa FF como se describe en el documento WO06016161A1. Se disolvieron cinco gramos de PSA en 50 ml de tampón Trietanolamina 10 mM, a pH 7,4 que contiene NaCl 25 mM (= tampón de inicio). Esta solución se aplicó en una columna Pharmacia XK50 cargada con Q-Sefarosa FF (GE Healthcare, Munich, Alemania), que se equilibró con tampón de inicio. La columna se lavó después con 8 volúmenes de columna (VC) de tampón de inicio y el PSA unido se eluyó gradualmente con 3 VC de NaCl 200 mM, NaCl 350 mM y NaCl 500 mM en tampón de inicio. La fracción eluida con NaCl 350 mM mostró un peso molecular de 20 kDa como se indica por la electroforesis en gel de SDS. Esta fracción se concentró por ultrafiltración usando una membrana de 5 kDa hecha de celulosa regenerada (Millipore, Billerica, MA) y posteriormente se diafiltró frente a tampón fosfato 50 mM, a pH 7,2. El PSA se oxidó con NaIO_4 y se introdujo un grupo amino terminal principal por aminación reductiva como se describe en el documento WO05016973A1. Para la aminación reductora, se añadieron 11 ml de una solución de NH_4Cl 2 M a 20 ml de una solución que contiene 58 mg de PSA oxidado / ml en tampón fosfato 50 mM, a pH 7,2. Después, se añadió una solución de NaCNBH_3 5 M en NaOH 1 M para dar una concentración final de 75 mM. La reacción se realizó durante 5 días a temperatura ambiente a pH 8,0.

Después, la mezcla se dializó frente a una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (50 mg/l) que contiene NaCl 10 mM y posteriormente frente a tampón fosfato 50 mM, a pH 8,0, que contiene EDTA 5 mM. Después, se introdujo un grupo sulfhidrido por reacción del grupo amino terminal principal con 2-iminotiolano (reactivo de Traut / Pierce, Rockford, IL). La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato 50 mM, a pH 8,0, que contiene EDTA 5 mM con un exceso molar de 20 veces de reactivo durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente la solución de PSA que contiene un grupo -SH terminal libre se sometió a ultrafiltración/diafiltración usando una membrana con un límite de 5 kDa y fabricada de celulosa regenerada (Millipore, Billerica, MA).

40 Ejemplo 12

Polisialilación del FVIIIr usando un reticulante heterobifuncional

Para acoplar el PSA-SH al FVIIIr, se usó el reticulante heterobifuncional MBPH (ácido 4- β -Maleimidofenil]butírico hidrazida-HCl/Pierce, Rockford, IL) que contiene una hidrazida selectiva de carbohidratos y un grupo sulfhidrido-maleimida reactiva (Chamow et al., J Biol Chem; 267:15916-22(1992)). Se preparó PSA-SH que contiene un grupo sulfhidrido activo de acuerdo con el Ejemplo 11.

Se transfirieron dos ml de FVIIIr (638 mg, concentración 3,856 mg/ml proteína) al tampón de oxidación (acetato sódico 50 mM, a pH 6) usando columnas desalinizadoras (Bio-Rad Econopac 10 DG) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína se oxidó después con NaIO_4 0,25 mM (Merck) (1 h a 4 °C en la oscuridad). La reacción de oxidación se desactivó con glicerol a una concentración final del 10 %. Se eliminaron el glicerol y el NaIO_4 y la proteína se transfirió al tampón de reacción (fosfato sódico 50 mM a pH 6,5) usando columnas desalinizadoras (Bio-Rad Econopac 10 DG) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una mezcla que contiene 1 mg MBPH/mg proteína y PSA-SH (exceso molar de 200 veces a la proteína) se incubó después durante 2 h a TA a pH 6,5. El exceso de enlazador se eliminó usando columnas desalinizadoras (Bio-Rad Econopac 10 DG) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el conjugado enlazador-PSA se transfirió a un tampón de reacción.

55 El conjugado MPBH-PSA se añadió al FVIIIr oxidado (0,105 mg/ml proteína) y la mezcla de reacción se incubó durante 2 h en RT bajo agitación suave. El conjugado de FVIIIr-PSA se purificó por HIC usando una columna de

5 Butil Sefarosa previamente rellena (GE Healthcare, Butyl HiTrapp FF 5 ml). Para permitir las interacciones hidrófobas del conjugado con la Butil Sefarosa la muestra se enfrió a 2-8 °C y la fuerza iónica de la mezcla de reacción se aumentó a una conductividad de aproximadamente 185 mS/cm por la adición de una solución tampón que contiene NaCl 5 M (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, CaCl₂ 6,7 mM, Tween al 0,01 %, a pH 6,9). La mezcla de reacción se cargó en la columna que estaba equilibrada con tampón de equilibrado a pH 6,9 (que contiene Hepes 50 mM, NaCl 3 M, CaCl₂ 6,7 mM, Tween 80 al 0,01 %) con una velocidad de flujo de 1,2 cm/min. La muestra sin unir se lavó con 10 volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrado. El conjugado se eluyó con un tampón de baja fuerza iónica, a pH 7,4 (hepes 50 mM, CaCl₂ 6,7 mM) con una velocidad de flujo de 1,2 cm/min. Durante el procedimiento de la cromatografía, las muestras y los tampones se enfriaron usando un baño de hielo. Finalmente, el pH del eluido se ajustó a 6,9.

Ejemplo de Referencia 13

Conjugación del FVIIIr con Dextrano

15 Para la conjugación del FVIIIr con dextrano, se transfirieron 2 ml de FVIIIr (638 mg, 3,4 mg/ml proteína) a un tampón de oxidación (acetato sódico 50 mM, a pH 6) usando columnas desalinizadoras (Bio-Rad Econopac 10 DG) de acuerdo con las instrucciones del producto. Después, la proteína se oxidó con NaIO₄ 0,25 mM (1 h a 4 °C en la oscuridad). La proteína oxidada se concentró primero usando columnas de centrifugación de ultrafiltración Vivaspin (Sartorius Stedim Biotec GmbH) con un LPM de 30 kDa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La muestra se dializó después frente a tampón de reacción (fosfato sódico 50 mM a pH7) toda la noche a 4 °C.

20 Después de la diálisis, se añadieron 26,58 mg de dihidrazida de ácido adípico (ADH) (Sigma) (exceso molar de 500 veces) y la mezcla de reacción se incubó 2 h a TA a pH 7 con agitación suave. Se eliminó la ADH usando columnas desalinizadoras (Bio-Rad Econopac 10 DG) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadieron diez mg de alhído-dextrano activado (Pierce) (exceso molar de 17 veces a proteína) y la mezcla se incubó durante 2 h a TA, a pH 7.

25 El conjugado se purificó por cromatografía IEX en Q-Sefarosa HP (GE-Healthcare). La muestra se cargó en una columna (6,4 mm x 3 cm, V = 1 ml) que se equilibró con tampón A (fosfato sódico 50 mM a pH 6,8) con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. La muestra sin unir se lavó con 5 VC de tampón A. Finalmente, el conjugado se eluyó con un gradiente salino lineal (0-100 % tampón B [fosfato sódico 50 mM a pH 6,8 + NaCl 1 M] en 10 VC) con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para conjugar PEG, ácido polisiálico (PSA) o dextrano con una fracción de carbohidratos oxidada del Factor VIII que comprende poner en contacto la fracción de carbohidratos oxidada con PEG activado, PSA y dextrano en condiciones que permitan la conjugación; en el que dicho FVIII que ha sido conjugado con PEG, PSA o dextrano conserva al menos el 50 % de la actividad biológica del FVIII nativo.
5
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el PEG activado, el PSA y el dextrano son seleccionados del grupo que consiste en PEG-hidrazida, PSA-hidrazina o aldehído dextrano activado.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la fracción de carbohidratos es oxidada por incubación en un tampón que comprende NaIO_4 .
- 10 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la fracción de carbohidratos oxidada del FVIII es localizada en el dominio B del Factor VIII.
5. Un Factor VIII modificado producido por el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Una molécula proteica que comprende:
15 (a) una molécula de Factor VIII; y
 (b) al menos uno de PSA, PEG o dextrano unido a dicha molécula de Factor VIII, en la que dicho PSA, PEG o dextrano está unido al Factor VIII mediante una o más fracciones de carbohidratos localizadas en el dominio B del Factor VIII, en la que dicha molécula conserva al menos el 50 % de la actividad biológica del FVIII nativo.
- 20 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho FVIII que ha sido conjugado con el polímero soluble en agua conserva al menos el 80 % de la actividad biológica del FVIII nativo.
8. La molécula de acuerdo con la reivindicación 6 en la que dicha molécula conserva al menos el 80 % de la actividad biológica del FVIII nativo.

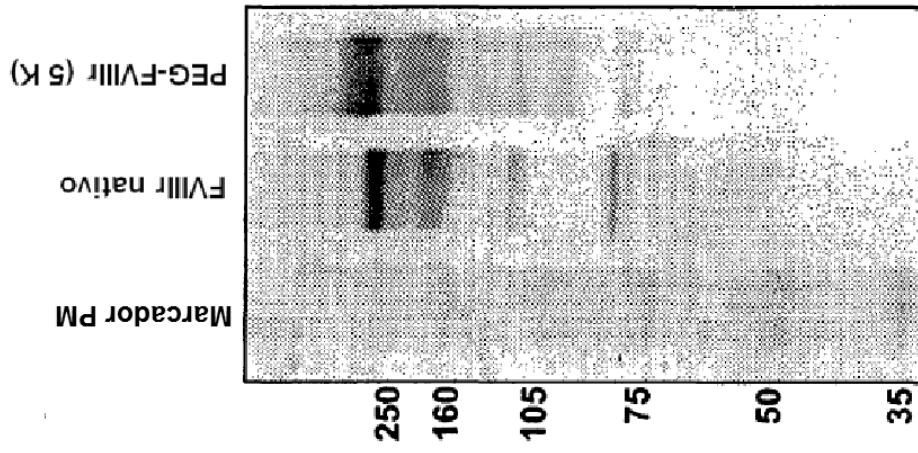


Figura 1

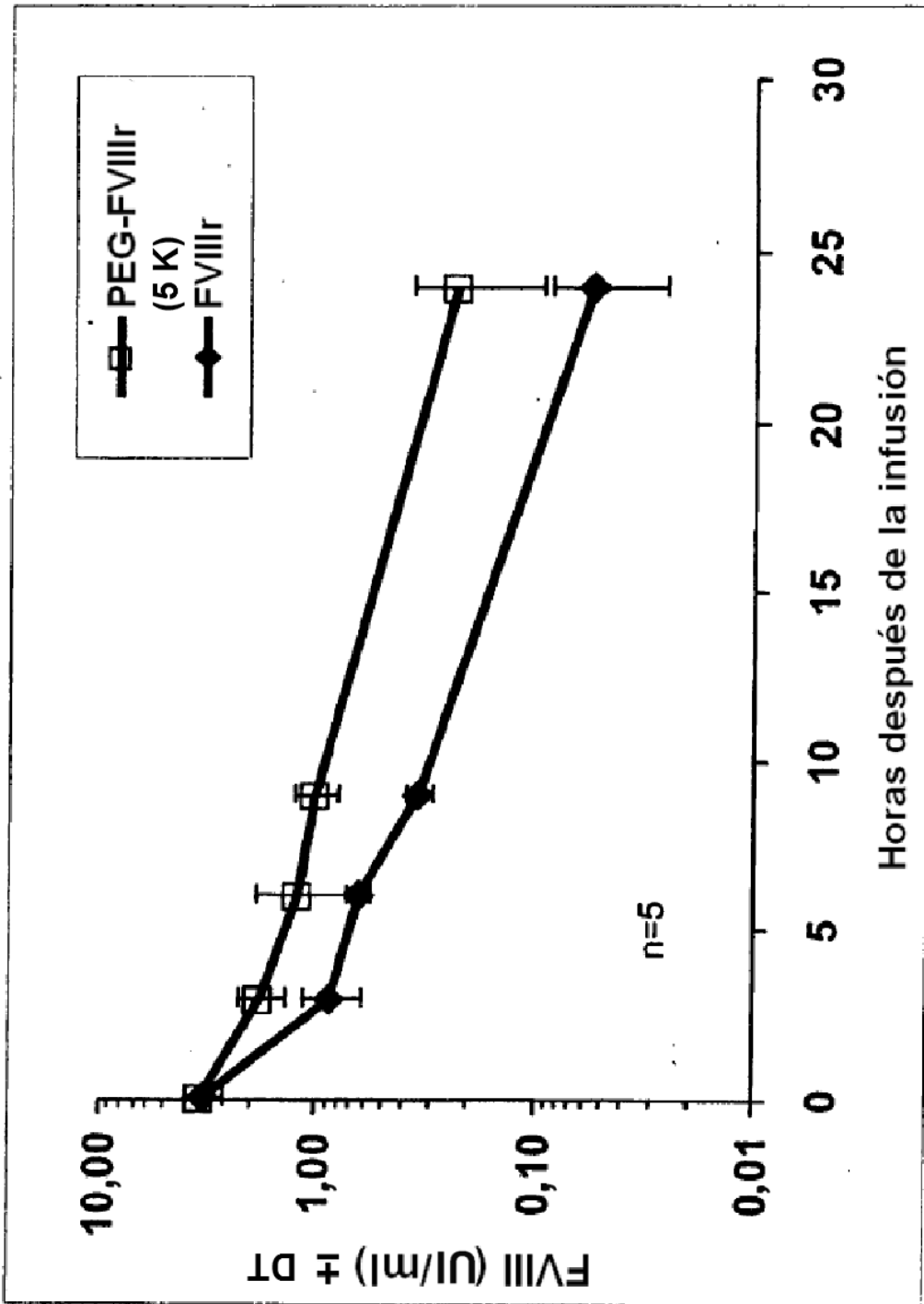


Figura 2

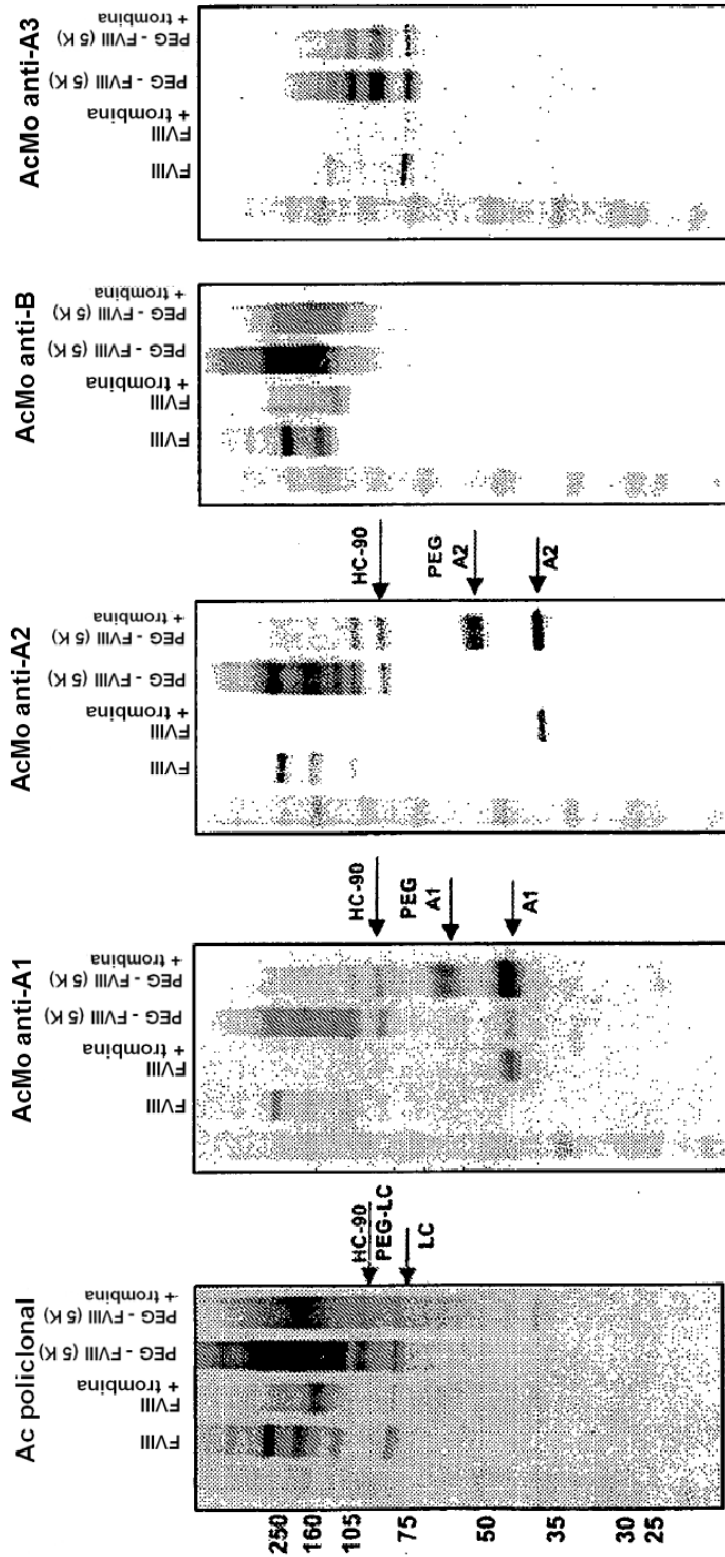


Figura 3

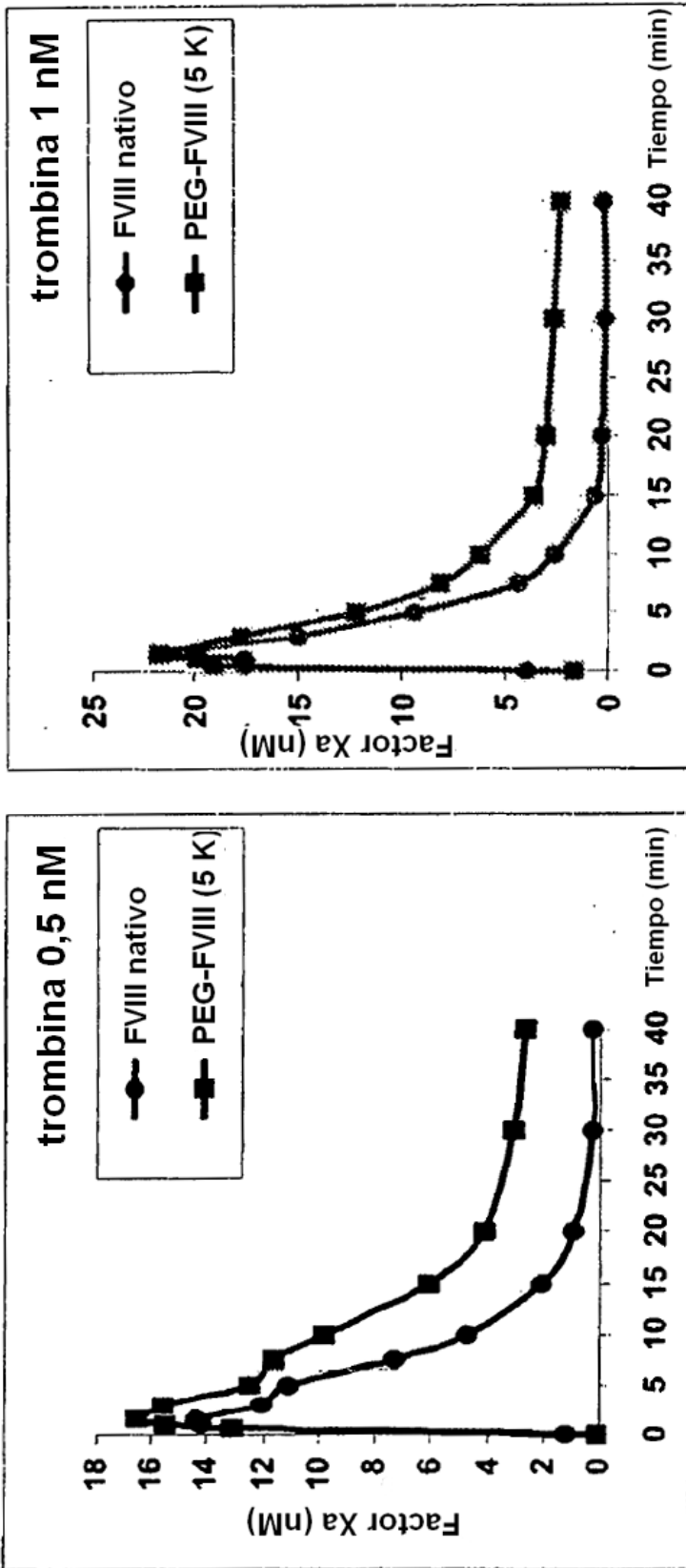


Figura 4

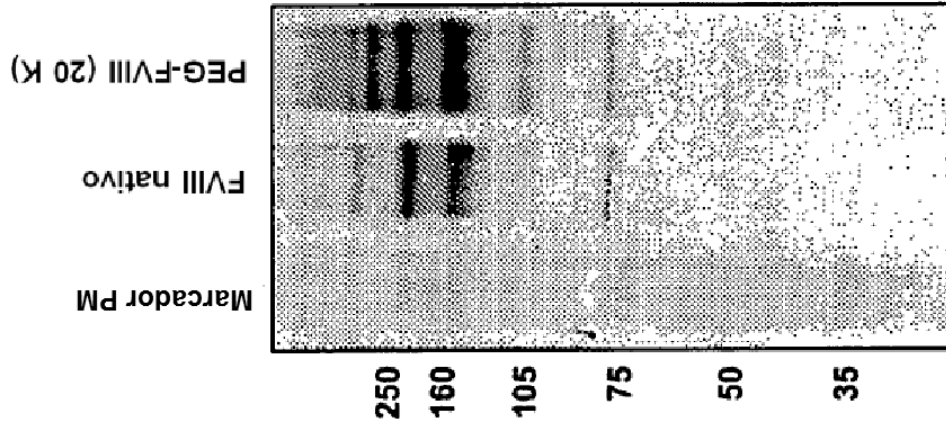


Figura 5

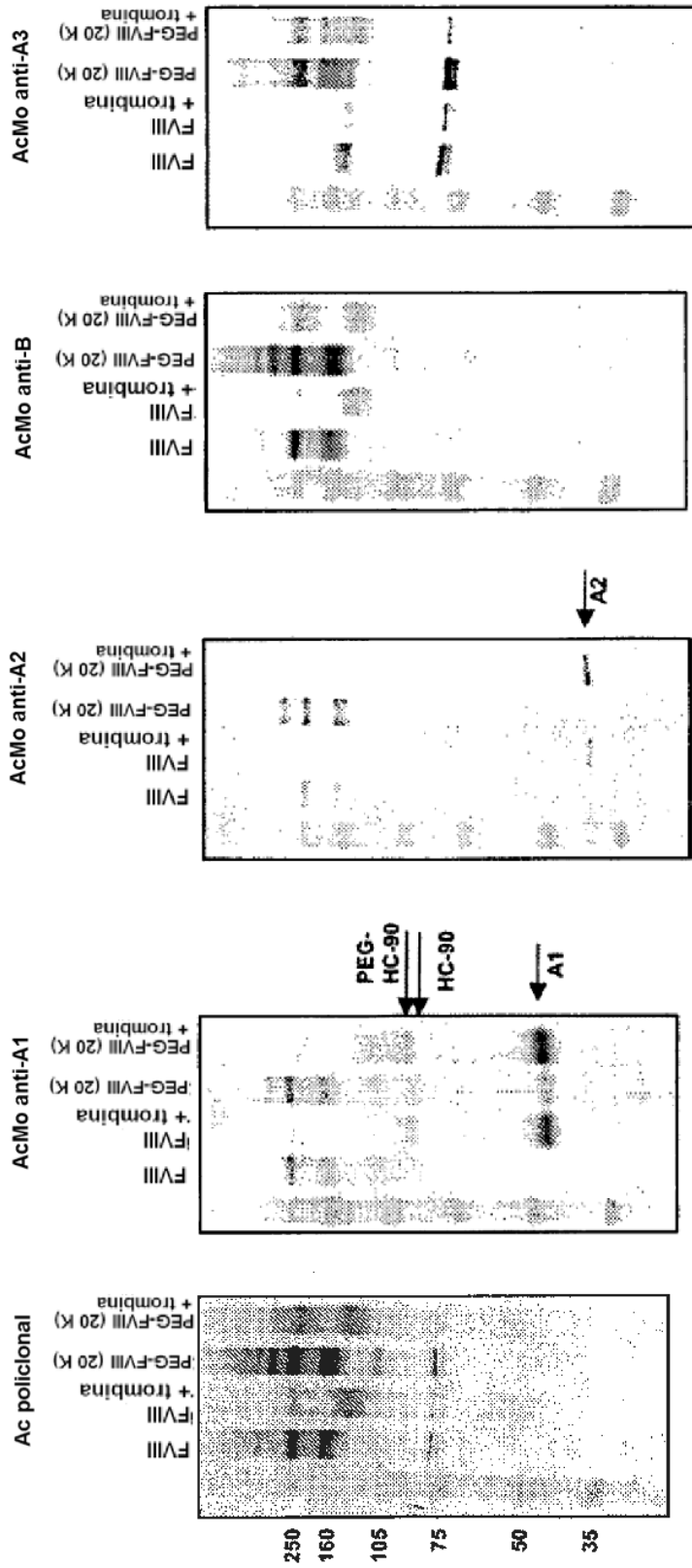


Figura 6

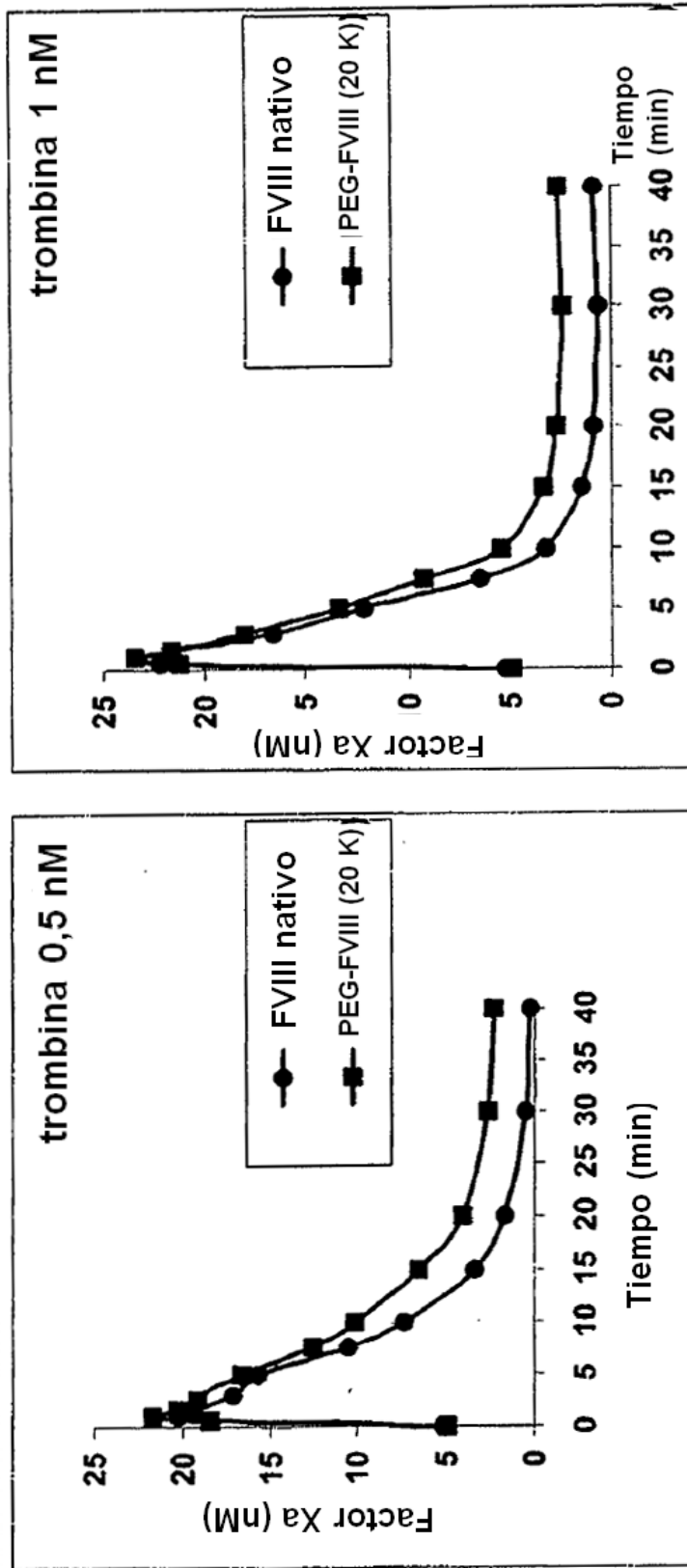


Figura 7