

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 172**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/60** (2007.01)

**A61K 47/61** (2007.01)

**A61K 38/37** (2006.01)

**A61P 7/02** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2009 PCT/US2009/061023**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.04.2010 WO10045568**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2009 E 09752930 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2349342**

54 Título: **Factores sanguíneos modificados que comprenden un bajo grado de polímero soluble en agua**

30 Prioridad:

**17.10.2008 US 106424 P**

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

**30.11.2018**

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)**

**Zählerweg 4**

**6300 Zug, CH y**

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TURECEK, PETER;**

**SIEKMANN, JUERGEN y**

**ROTTENSTEINER, HANSPETER**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 692 172 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

Factores sanguíneos modificados que comprenden un bajo grado de polímero soluble en agua

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a materiales y métodos para la preparación de factores sanguíneos modificados que comprenden bajos niveles de moléculas de polímero soluble en agua pero que presentan actividad biológica similar a moléculas que tienen un número superior de restos de polímero soluble en agua.

10

**Antecedentes de la invención**

La coagulación sanguínea es un proceso complejo que incluye la interacción secuencial de una serie de componentes, en particular de fibrinógeno, factor II, factor V, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII y factor de von Willebrand. La pérdida de uno de estos componentes o la inhibición de su funcionalidad puede provocar o bien un aumento de la tendencia a la coagulación sanguínea o bien una incapacidad para coagularse, cualquiera de las cuales puede ser potencialmente mortal en algunos pacientes.

15

El factor VIII es un cofactor para el factor IXa que convierte el factor X en el factor Xa en la cascada de reacciones que conducen a la coagulación sanguínea. Una deficiencia en la cantidad de actividad del factor VIII en la sangre da como resultado el trastorno de coagulación hemofilia A, un trastorno hereditario que afecta principalmente a los varones. La hemofilia A se trata actualmente con preparaciones terapéuticas de factor VIII derivado de plasma humano o fabricado usando tecnología de ADN recombinante. Tales preparaciones se administran o bien en respuesta a un episodio de hemorragia o bien a intervalos frecuentes y regulares para prevenir la hemorragia incontrolada (profilaxis).

20

25

El factor de von Willebrand (VWF) circula en el plasma complejo con el factor VIII, que estabiliza la proteína factor VIII y la protege de la degradación proteolítica. Debido a su función en la agregación plaquetaria, el VWF también interfiere directamente en la coagulación sanguínea. La deficiencia de von Willebrand (VWD) (también conocida como síndrome de von Willebrand) resulta o bien de una deficiencia o bien de una sobreexpresión de VWF. La deficiencia de VWF da como resultado una enfermedad similar a la hemofilia debido a la rápida degradación de factor VIII que carece de cofactor de VWF.

30

35

En el tratamiento de hemofilia A y síndrome de von Willebrand, ha habido varios intentos de tratar pacientes con factor VII, VWF o complejo de factor VIII/VWF purificado. Sin embargo, se ha mostrado que el desarrollo de anticuerpos contra la proteína exógena administrada disminuye la eficacia del tratamiento y presenta un desafío al tratamiento de estos pacientes. Por ejemplo, anticuerpos anti-FVIII son especialmente prevalentes en pacientes con hemofilia grave y moderadamente grave, que desarrollan anticuerpos anti-FVIII a una frecuencia del 50 % (Gilles *et al.*, Blood 82:2452-61, 1993; Lacroix-Desmazes *et al.*, J Immunol. 177:1355-63, 2006). La administración de dosis inferiores de proteína terapéutica que tienen mayor eficacia *in vivo* ayudaría a reducir o limitar la aparición de anticuerpos contra el factor sanguíneo administrado.

40

Las propiedades farmacocinéticas e inmunológicas de proteínas terapéuticas pueden mejorarse mediante conjugación con un polímero soluble en agua tal como polietilenglicol (PEG). En particular, la unión de una proteína fisiológicamente activa a una molécula de polímero fisiológicamente aceptable puede prolongar sustancialmente su semivida *in vivo*. La pegilación de moléculas también puede conducir a un aumento de la resistencia de fármacos a la degradación enzimática, una reducción de la frecuencia de dosificación, una disminución de la inmunogenicidad, un aumento de la estabilidad física y térmica, un aumento de la solubilidad, un aumento de la estabilidad en líquidos y una reducción de la agregación.

45

La patente estadounidense 4.970.300 describe que la conjugación de una molécula de polímero (dextrano) a factor VIII (FVIII) da como resultado que la proteína FVIII pueda activarse por trombina, y que tenga una antigenicidad e inmunorreactividad sustancialmente disminuidas y un tiempo de retención *in vivo* sustancialmente aumentado en el torrente sanguíneo de un mamífero. La solicitud de patente internacional WO 94/15625 describe que la conjugación de FVIII a una molécula de polímero fisiológicamente aceptable mejora la función *in vivo* de FVIII (i) aumentando su resistencia a la hidrólisis *in vivo* y prolongando por tanto su actividad tras la administración, (ii) prolongando significativamente su vida circulante *in vivo* con respecto a la proteína no modificada y (iii) aumentando su tiempo de absorción en el torrente sanguíneo. La patente estadounidense 6.037.452 describe conjugados de FVIII y factor IX (FIX), en los que la proteína se une covalentemente a un poli(óxido de alquileno) a través de grupos carbonilo en la proteína. Además, la mejora de la función *in vivo* de FIX mediante conjugación a moléculas de polímero fisiológicamente aceptables, en particular poli(etilenglicol) ("PEG"), se ha descrito en la publicación de patente internacional WO 94/29370. Un FVIII pegilado que conserva la actividad específica se divulgó en la publicación de patente internacional WO/2007/126808.

55

60

65

La conjugación de polímero soluble en agua a un agente activo tal como una proteína puede realizarse preparando conjugados de polímero-proteína estables o conjugados de polímero-proteína en los que el polímero soluble en agua

se une a la proteína por medio de enlaces covalentes liberables (concepto de profármaco), es decir, un ligador hidrolizable, degradable o liberable. Por ejemplo, se ha desarrollado un resto de PEG liberable usando un sistema de conjugación de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) que contiene dos cadenas de PEG (Nektar Inc., Huntsville AL). Además, un grupo éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), que es útil para la modificación química de residuos de lisina de la proteína, puede unirse al sistema de anillos de fluoreno por medio del grupo metoxicarbonilo para generar el resto de PEG liberable. La publicación de patente internacional WO 2008/082669 (incorporada en el presente documento por referencia) describe una serie de variantes de FVIII recombinantes pegiladas basadas en el concepto de PEG liberable.

Un proceso químico que conduce a un grado relativamente alto de modificación y contenido en polímero soluble en agua en la proteína terapéutica no es económico debido a las altas cantidades de reactivos requeridos para su preparación. Además, altos grados de polímero soluble en agua, tal como PEG, conducen a un aumento del riesgo toxicológico o inmunológico debido a las altas cantidades del polímero y el ligador.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de composiciones terapéuticas que comprendan polímeros solubles en agua que mejoren la semivida y estabilidad de una proteína terapéutica sin los efectos inmunológicos o la toxicidad resultantes.

### Sumario de la invención

La presente memoria descriptiva se refiere a materiales y métodos para generar variantes de factores sanguíneos que comprenden bajas cantidades de un polímero soluble en agua. La invención proporciona una molécula de factor sanguíneo modificada químicamente que comprende un factor sanguíneo recombinante, es decir FVIII, y 1 ó 2 restos de polímero soluble en agua por molécula de factor sanguíneo, en la que el polímero soluble en agua es poli(ácido siálico) (PSA) y en la que los restos de PSA se unen a la molécula de FVIII a través de aminación reductora.

En una realización relacionada, el factor sanguíneo modificado comprende 2 restos de polímero soluble en agua por molécula de factor sanguíneo. En todavía otra realización, el factor sanguíneo modificado comprende 1 polímero soluble en agua por molécula de factor sanguíneo.

Se contempla que el resto de polímero soluble en agua se una a la molécula de factor sanguíneo a través de un ligador estable o a través de un ligador liberable o degradable. En una realización, el ligador liberable es un ligador hidrolizable.

El polímero soluble en agua poli(ácido siálico) (PSA).

En un aspecto de referencia, el polímero soluble en agua es polietilenglicol (PEG). Se contempla además que la molécula de PEG sea un resto de PEG lineal o un resto de PEG ramificado.

En otro aspecto de referencia, el PEG tiene un peso molecular de entre 3 kD y 200 kD. En una realización relacionada el peso molecular promedio del PEG oscilará entre aproximadamente 3 y 200 kilodalton ("kDa"), desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 120 kDa, desde aproximadamente 10 kDa hasta aproximadamente 100 kDa, desde aproximadamente 20 kDa hasta aproximadamente 50 kDa, desde aproximadamente 10 kDa hasta aproximadamente 25 kDa, desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 50 kDa o desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 10 kDa.

La invención contempla que el factor sanguíneo modificado sea factor VIII. En una realización adicional, la molécula de factor sanguíneo es humana.

En un aspecto de referencia, el factor sanguíneo modificado comprende al menos 4 y menos de 10 restos de PEG por molécula de factor VIII. En otro aspecto de referencia el factor sanguíneo modificado comprende entre 4 y 8 restos de PEG, inclusive, por molécula de factor VIII. En todavía otro aspecto de referencia el factor sanguíneo modificado comprende entre 1 y 4 restos de PEG, inclusive, por molécula de factor VIII. En todavía otro aspecto de referencia el factor sanguíneo modificado comprende entre 4 y 6 restos de PEG, inclusive, por molécula de factor VIII. En todavía otro aspecto de referencia el factor sanguíneo modificado comprende 1 ó 2 restos de PEG por molécula de factor VIII.

El factor sanguíneo modificado comprende 1 ó 2 restos de PSA por molécula de factor VIII. En otra realización el factor sanguíneo modificado comprende 1 ó 2 restos de PSA por molécula de factor VIII, en el que los polímeros están conectados por medio de un ligador estable, liberable o hidrolizable.

En otro aspecto de referencia, el factor sanguíneo modificado comprende entre 1 y 6 restos de polímero soluble en agua, inclusive, por molécula de FVIIa. En un aspecto de referencia relacionado, el factor sanguíneo modificado comprende 1 ó 2 restos de polímero soluble en agua por molécula de FVIIa. En un aspecto de referencia, el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en PEG o PSA. En un aspecto de referencia, los

polímeros están conectados por medio de un ligador estable, liberable o hidrolizable.

5 En otro aspecto adicional de referencia, el factor sanguíneo modificado comprende entre 1 y 6 restos de polímero soluble en agua, inclusive, por molécula de FVIIa. En otro aspecto de referencia adicional más, el factor sanguíneo modificado comprende 1 ó 2 restos de polímero soluble en agua por molécula de FIX. En determinados aspectos de referencia, el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en PEG o PSA. En un aspecto de referencia, los polímeros están conectados por medio de un ligador estable, liberable o hidrolizable.

10 En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el factor sanguíneo modificado tal como se describe en el presente documento.

15 En otro aspecto de referencia, la memoria descriptiva contempla un método de preparación de una molécula de factor sanguíneo modificada que tiene un bajo número de polímero soluble en agua conjugado a la molécula de factor sanguíneo que comprende, poner en contacto la molécula de factor sanguíneo con un exceso molar de polímero soluble en agua menor de o igual a polímero soluble en agua en exceso de 30 M con respecto a molécula de factor sanguíneo en condiciones que permiten la unión de al menos 1 y menos de 10 polímeros solubles en agua a la molécula de factor sanguíneo.

20 En una realización, el exceso molar de polímero soluble en agua es de entre un exceso de 2 M y un exceso de 30 M. En otra realización, el exceso molar de polímero soluble en agua es de entre un exceso de 10 M y uno de 25 M. En otra realización adicional, el exceso molar de polímero soluble en agua es un exceso de aproximadamente 2 M, aproximadamente 5 M, aproximadamente 10 M, aproximadamente 15 M, aproximadamente 20 M, aproximadamente 25 M o aproximadamente 30 M.

25 En otro aspecto adicional, la memoria descriptiva proporciona un método de tratamiento de un sujeto que padece un trastorno de la coagulación sanguínea que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un factor sanguíneo modificado tal como se describe en el presente documento.

30 En una realización, el trastorno de la coagulación sanguínea se selecciona del grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, síndrome de von Willebrand, deficiencia de factor X, deficiencia de factor VII, enfermedad de Alexander, síndrome de Rosenthal (hemofilia C) y deficiencia de factor XIII.

35 En una realización relacionada, el trastorno de la coagulación sanguínea es hemofilia A y el factor sanguíneo modificado comprende una molécula de factor VIII.

En una realización adicional, el polímero soluble en agua para su uso en los métodos es un polímero soluble en agua tal como se describió anteriormente.

40 En otro aspecto adicional de referencia, el factor sanguíneo para su uso en los métodos se selecciona del grupo que consiste en factor II, factor III, factor V, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor de von Willebrand y fibrinógeno. En una realización, la molécula de factor sanguíneo es factor VIII. En todavía otra realización el factor sanguíneo es FVIIa. En una realización adicional, el factor sanguíneo es FIX. En una realización adicional, la molécula de factor sanguíneo es humana.

#### 45 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra un gel de SDS-PAGE de factor VIII poco pegilado preparado usando un exceso molar bajo de PEG. Figura 1A: teñido con anticuerpo anti-FVIII, figura 1B: teñido con anticuerpo anti-PEG.

50 La figura 2 representa el perfil farmacocinético de FVIII poco pegilado tal como se detecta *in vivo* en un modelo de ratón deficiente en FVIII. Los datos están ajustados a la dosis a 200 U/kg.

La figura 3 ilustra la comparación del grado de pegilación del FVIII correlacionado con la AUC (figura 3A) de la proteína pegilada, con la semivida (HL, figura 3B) y con el tiempo de resistencia medio (MRT, figura 3C) tal como se detecta *in vivo* en un modelo de ratón deficiente en FVII.

La figura 4 representa el perfil farmacocinético de rFVIII poco polisialilado tal como se detecta *in vivo* en un modelo de ratón deficiente en FVIII. Los datos están ajustados a 200 U/kg.

#### 60 **Descripción detallada de la invención**

La presente memoria descriptiva se refiere a materiales y métodos para generar variantes de factores sanguíneos que comprenden bajas cantidades de un polímero soluble en agua en los que la cantidad del polímero soluble en agua, tal como PEG, es suficiente para prolongar la semivida de la molécula. Se contempla que el factor sanguíneo modificado que comprende una baja cantidad de polímero soluble en agua demuestre toxicidad reducida en comparación con moléculas de factores sanguíneos preparadas usando protocolos de preparación convencionales.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2ª ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walquer ed., 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS, 5ª ED., R. Rieger, *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991).

Se indica en el presente documento que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Tal como se usan en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados asignados a los mismos a menos que se especifique otra cosa.

El término “factor sanguíneo modificado” se refiere a un factor sanguíneo que tiene una o más modificaciones tales como conjugación a un polímero soluble en agua, conjugación a restos de hidrato de carbono adicionales o modificado de otra forma con respecto al factor de coagulación sanguínea de tipo natural o nativo. Un “factor sanguíneo” o “factor de coagulación sanguínea” tal como se usa en el presente documento se refiere a proteínas implicadas en la coagulación sanguínea en un sujeto, incluyendo las implicadas en la cascada de la coagulación. Los factores sanguíneos, incluyen, pero no se limitan a, factor II, factor III, factor V, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor de von Willebrand y fibrinógeno.

El término “proteína” se refiere a cualquier proteína, complejo proteico o polipéptido, incluyendo proteínas, complejos proteicos y polipéptidos recombinantes compuestos por residuos de aminoácido unidos por medio de enlaces peptídicos. Las proteínas se obtienen mediante aislamiento a partir de fuentes *in vivo* (es decir, que se producen de manera natural), mediante métodos de síntesis o mediante tecnología de ADN recombinante. Se sintetizan polipéptidos sintéticos, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado. Una proteína recombinante usada según la presente invención se produce mediante cualquier método conocido en la técnica tal como se describe a continuación en el presente documento. En una realización, la proteína es una proteína fisiológicamente activa, incluyendo una proteína terapéutica o un derivado biológicamente activo de la misma. El término “derivado biológicamente activo” se refiere a un derivado de una proteína que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas de dicha proteína. El término “proteína” se refiere normalmente a polipéptidos grandes. El término “péptido” se refiere normalmente a polipéptidos cortos. Independientemente de la distinción, tal como se usan en el presente documento, polipéptido, proteína y péptido se usan de manera intercambiable.

Un “fragmento” de un polipéptido se refiere a cualquier porción del polipéptido más pequeña que el polipéptido o producto de expresión de proteína de longitud completa. Los fragmentos son, en un aspecto, análogos de delección del polipéptido de longitud completa en el que uno o más residuos de aminoácido se han eliminado del extremo amino terminal y/o el extremo carboxilo terminal del polipéptido de longitud completa. Por consiguiente, los “fragmentos” son un subconjunto de los análogos de delección descritos a continuación.

Un “análogo” o “derivado” es un compuesto, por ejemplo, un péptido, que se refiere a un polipéptido de estructura sustancialmente similar y que tiene la misma actividad biológica, aunque en determinados casos en un grado diferente, a una molécula que se produce de manera natural. Los análogos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos en comparación con el polipéptido que se produce de manera natural a partir del cual se deriva el análogo, basándose en una o más mutaciones que implican (i) delección de uno o más residuos de aminoácido en uno o más extremos terminales del polipéptido y/o una o más regiones internas de la secuencia de polipéptido que se produce de manera natural, (ii) inserción o adición de uno o más aminoácidos en uno o más extremos terminales (normalmente un análogo de “adición”) del polipéptido y/o una o más regiones internas (normalmente un análogo de “inserción”) de la secuencia de polipéptido que se produce de manera natural o (iii) sustitución de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos en la secuencia de polipéptido que se produce de manera natural.

En un aspecto, un análogo presenta aproximadamente el 70 % de similitud de secuencia pero menos del 100 % de similitud de secuencia con un compuesto dado, por ejemplo, un péptido. Tales análogos o derivados, en un aspecto, están comprendidos por residuos de aminoácido que no se producen de manera natural, incluyendo a modo de ejemplo y no de limitación, homoarginina, ornitina, penicilamina y norvalina, así como residuos de aminoácido que se producen de manera natural. Tales análogos o derivados, en otro aspecto, están compuestos por uno o una pluralidad de residuos de D-aminoácido, o contienen conexiones no peptídicas entre dos o más residuos de aminoácido. El término “derivado de” tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de péptido o polipéptido que es una modificación (incluyendo sustitución o delección de aminoácidos) de una secuencia de péptido o polipéptido de tipo natural o que se produce de manera natural y tiene una o más sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos, de manera que la secuencia del derivado comparte aproximadamente el

70 % pero menos del 100 % de similitud de secuencia con la secuencia de tipo natural o que se produce de manera natural. En una realización, el derivado puede ser un fragmento de un polipéptido, en el que fragmento es sustancialmente homólogo (es decir, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % homólogo) a lo largo de una longitud de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos del polipéptido de tipo natural.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen secuencias de referencia y de prueba en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan parámetros del programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencias para la(s) secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa designados.

Pueden realizarse alineaciones óptimas de secuencias para comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual. Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP, que usa una simplificación del método de alineación progresiva de Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35:351-360 (1987) y es similar al método descrito por Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989). Otro algoritmo útil para generar múltiples alineaciones de secuencias es Clustal W (Thompson, *et al.*, *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680 (1994)). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST (Altschul, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989); Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). El software para realizar los análisis de BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information.

Las sustituciones son conservativas o no conservativas basándose en la relación fisicoquímica o funcional del aminoácido que está reemplazándose y el aminoácido que lo reemplaza. Las sustituciones de este tipo se conocen bien en la técnica. Alternativamente, la memoria descriptiva abarca sustituciones que son también no conservativas. Se describen sustituciones conservativas a modo de ejemplo en Lehninger, [Biochemistry, 2ª edición; Worth Publishers, Inc., Nueva York (1975), págs. 71-77] y se exponen a continuación.

SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS

<b>CADENA LATERAL CARACTERÍSTICA</b>	<b>AMINOÁCIDO</b>
No polar (hidrófoba):	
A. Alifática	A L I V P
B. Aromática	F W
C. Que contiene azufre	M
D. Límite	G
Polar no cargada:	
A. Hidroxilo	S T Y
B. Amidas	N Q
C. Sulfhidrilo	C
D. Límite	G
Cargada positivamente (básica)	K R H
Cargada negativamente (ácida)	D E

Alternativamente, se exponen inmediatamente a continuación sustituciones conservativas a modo de ejemplo.

SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS II

<b>RESIDUO ORIGINAL</b>	<b>SUSTITUCIÓN A MODO DE EJEMPLO</b>
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

5 El término “variante” se refiere a una proteína o análogo de la misma que se modifica para comprender restos químicos adicionales que no son normalmente una parte de la molécula. Tales restos mejoran, en diversos aspectos, incluyendo pero sin limitarse a, la solubilidad, absorción y semivida biológica de la molécula. Los restos pueden disminuir alternativamente la toxicidad de la molécula y eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseado de la molécula, etc. Se divulgan restos que pueden mediar en tales efectos en Remington’s Pharmaceutical Sciences (1980). Se conocen bien en la técnica procedimientos para acoplar tales restos a una molécula. En determinados aspectos, sin limitación, las variantes son polipéptidos que se modifican mediante glicosilación, pegilación o polisialilación.

10 El término “que se produce de manera natural”, tal como se aplica a una proteína o polipéptido, se refiere a una proteína que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polinucleótido o polipéptido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que se aísla a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado deliberadamente por el hombre en el laboratorio se produce de manera natural. Los términos “que se produce de manera natural” y “de tipo natural” se usan de manera intercambiable todo el tiempo.

15 El término “derivado de plasma”, tal como se aplica a una proteína o polipéptido, se refiere a un polipéptido que se produce de manera natural o fragmento del mismo que se encuentra en suero o plasma sanguíneo de un sujeto.

20 El término “polímero soluble en agua” se refiere a moléculas de polímero que son sustancialmente solubles en disolución acuosa o están presentes en forma de una suspensión y no tienen sustancialmente un impacto negativo en mamíferos tras la administración de una proteína conjugada a dicho polímero en una cantidad farmacéuticamente eficaz y pueden considerarse como biocompatibles. En una realización, las moléculas fisiológicamente aceptables comprenden desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 300 unidades de repetición. Los polímeros solubles en agua a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) (“PPG”), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxetilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxi alquilmetacrilamida), poli(metacrilato de hidroxi alquilo), poli(sacáridos), poli( $\alpha$ -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfosfaceno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina), polímeros de poli(óxido de alquileo), poli(ácido maleico), poli(DL-alanina), polisacáridos, tales como carboximetilcelulosa, dextrano, almidón o derivados de almidón, ácido hialurónico y quitina, poli(met)acrilatos, y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

35 La molécula de polímero soluble en agua no se limita a una estructura particular y, en determinados aspectos, es ramificada o de múltiples brazos, dendrítica, o con uniones degradables, liberables o hidrolizables. Además, la estructura interna de la molécula de polímero, en todavía otros aspectos, se organiza en cualquiera de varios patrones diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en, sin limitación, homopolímero, copolímero alterno, copolímero al azar, copolímero de bloque, tripolímero alterno, tripolímero al azar y tripolímero de bloque.

40 El término “pegilado” se refiere a una proteína, complejo proteico o polipéptido unido a uno o más restos de PEG. El término “pegilación” tal como se usa en el presente documento se refiere al proceso de unir uno o más PEG a una proteína. El peso molecular del PEG puede estar en el intervalo de desde 2 hasta 200 kDa, desde 5 hasta 120 kDa, desde 10 hasta 100 kDa, desde 20 hasta 50 kDa, desde 10 hasta 25 kDa, desde 5 kDa hasta 10 kDa o desde 2 kDa hasta 5 kDa.

45 El término “polisialilado” se refiere a una proteína, complejo proteico o polipéptido unido a uno o más restos de poli(ácido siálico) (PSA). El término “polisialilación” tal como se usa en el presente documento se refiere al proceso de unir uno o más restos de PSA a una proteína. En una realización, el peso molecular de dicho PSA está en el intervalo de desde 2 hasta 80 kDa, desde 5 hasta 60 kDa, desde 10 hasta 40 kDa o desde 15 hasta 25 kDa.

50 El término “ligador” se refiere a un fragmento molecular que une el polímero soluble en agua a una molécula biológicamente activa. El fragmento tiene normalmente dos grupos funcionales que pueden acoplarse a o activarse para reaccionar con otro ligador o directamente con el nucleófilo biológicamente activo. Como ejemplo, se usa comúnmente ácido  $\omega$ -aminoalcanoico tal como lisina. En la presente invención, los ligadores incluyen ligadores estables, liberables, degradables e hidrolizables.

55 El término “composición farmacéutica” se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en un animal sujeto, incluyendo humanos y mamíferos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un conjugado de polímero-polipéptido y también comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica abarca una composición que comprende el/los principio(s) activo(s), y el/los componente(s) inerte(s) que constituyen el portador farmacéuticamente aceptable, así

60

como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de dos cualesquiera dos o más de los componentes. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualquier composición preparada mezclando un compuesto o conjugado de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 El término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, tampones y excipientes clínicamente útiles, tales como una disolución salina tamponada con fosfato, disolución acuosa al 5 % de dextrosa y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes y/o adyuvantes. Se describen formulaciones y portadores farmacéuticos adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Los portadores farmacéuticos útiles para la composición dependen del modo previsto de administración del principio activo. Los modos típicos de administración incluyen, pero no se limitan a, enteral (por ejemplo, oral) o parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal; o administración tópica, transdérmica o transmucosa). Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una que puede formularse para dar un compuesto o conjugado para uso farmacéutico incluyendo, por ejemplo, sales de metal (sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o aminas orgánicas.

20 El término "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" quiere decir un material que no es biológicamente o de otra forma indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin provocar efectos biológicos no deseados o interaccionar de una manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido, o cuando se administra usando vías bien conocidas en la técnica, tal como se describe a continuación.

25 El término "trastorno de la coagulación sanguínea" o "trastorno hemorrágico" se refiere a cualquiera de varias deficiencias heredadas o desarrolladas en factores de coagulación sanguínea que conducen a la incapacidad de la sangre para formar eficazmente coágulos, y la posterior hemorragia aberrante en un sujeto. Los trastornos de la coagulación sanguínea incluyen pero no se limitan a, hemofilia A, hemofilia B, síndrome de von Willebrand, deficiencia de factor X, deficiencia de factor VII, enfermedad de Alexander, síndrome de Rosenthal (hemofilia C) y deficiencia de factor XIII. Tratamiento de un trastorno de la coagulación sanguínea se refiere a tratamiento profiláctico o tratamiento terapéutico.

35 "Tratamiento" se refiere a tratamiento profiláctico o tratamiento terapéutico. Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad o presenta sólo signos tempranos para el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar una patología. Los compuestos o conjugados de la invención pueden administrarse como tratamiento profiláctico para reducir la probabilidad de desarrollar una patología o para minimizar la gravedad de la patología, si se desarrolla. Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta signos o síntomas de una patología para el propósito de disminuir o eliminar esos signos o síntomas. Los signos o síntomas pueden ser bioquímicos, celulares, histológicos, funcionales, subjetivos u objetivos. Las composiciones de la invención pueden administrarse como tratamiento terapéutico o para diagnóstico.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" abarca mamíferos y sujetos distintos de mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, cualquier miembro de la clase de los mamíferos: humanos, primates no humanos tales como chimpancés, y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como ganado, caballos, ovejas, cabras, cerdos; animales domésticos tales como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratas, ratones y cobayas, y similares. Los ejemplos de sujetos distintos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, aves, peces, y similares. El término no indica un género o edad particular.

50 El término "cantidad eficaz" significa una dosificación suficiente para producir un resultado deseado sobre un estado de salud, patología y enfermedad de un sujeto o para un propósito de diagnóstico. El resultado deseado puede comprender una mejora subjetiva u objetiva en el receptor de la dosificación. "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un agente eficaz para producir el efecto beneficioso previsto sobre la salud. Una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede determinarla un experto habitual en la técnica usando experimentación de rutina.

#### Proteínas y complejos proteicos

60 Las proteínas contempladas para su uso en composiciones farmacéuticas incluyen factores de coagulación sanguínea fisiológicamente activos útiles para su administración a un sujeto. El factor de coagulación sanguínea es una proteína o cualquier fragmento, análogo o variante de tales que conserve todavía parte, sustancialmente toda o toda la actividad biológica o terapéutica de la proteína. En algunas realizaciones, el factor de coagulación sanguínea es uno que, si no se expresa ni se produce o si tiene una expresión o producción sustancialmente reducida, daría lugar a una enfermedad. En un aspecto, el factor de coagulación sanguínea se deriva o se obtiene de un mamífero.

65 El factor de coagulación sanguínea conjugado a un polímero soluble en agua puede ser un factor de coagulación

sanguínea o fragmento del mismo que presenta una actividad biológica de la proteína, y tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos para la parte correspondiente de la proteína humana o de mamífero. El factor de coagulación sanguínea del conjugado puede ser una proteína nativa para la especie del humano o mamífero. El factor de coagulación sanguínea o fragmento del mismo puede ser sustancialmente homólogo (es decir, al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, más preferiblemente el 98 %, o lo más preferiblemente el 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos a lo largo de una longitud de al menos 10, 25, 50, 100, 150 ó 200 aminoácidos, o toda la longitud del agente activo) a una secuencia nativa de la proteína humana o de mamífero correspondiente.

#### 10 Métodos de preparación de una proteína

Se conocen bien en la técnica métodos para preparar proteínas recombinantes. Se describen métodos de producción de células, incluyendo células de mamífero, que expresan ADN o ARN que codifica para una proteína recombinante en las patentes estadounidenses números 6.048.729, 5.994.129 y 6.063.630.

15 Un constructo de ácido nucleico usado para expresar un polipéptido o fragmento, variante o análogo del mismo es, en un aspecto, uno que se expresa de manera extracromosómica (episomal) en la célula de mamífero transfectada o uno que se integra, o bien aleatoriamente o bien en un sitio diana preseleccionado a través de recombinación homóloga, en el genoma de la célula del receptor. Un constructo que se expresa de manera extracromosómica comprende, además de secuencias que codifican para polipéptido, secuencias suficientes para la expresión de la proteína en las células y, opcionalmente, para la replicación del constructo. Opcionalmente incluye un promotor, una secuencia de ADN que codifica para polipéptido y/o un sitio de poliadenilación. El ADN que codifica para la proteína está situado en el constructo de una manera tal que su expresión está bajo el control del promotor. Opcionalmente, el constructo contiene componentes adicionales tales como uno o más de los siguientes: un sitio de corte y empalme, una secuencia potenciadora, un gen marcador seleccionable bajo el control de un promotor apropiado y un gen marcador amplificable bajo el control de un promotor apropiado.

20 En aquellas realizaciones en las que el constructo de ADN se integra en el genoma de la célula, en un aspecto, necesita incluir sólo las secuencias de ácido nucleico que codifican para polipéptido. Opcionalmente, el constructo incluye una secuencia promotora y una potenciadora, un sitio o sitios de poliadenilación, un sitio o sitios de corte y empalme, secuencias de ácido nucleico que codifican para un marcador o marcadores seleccionables, secuencias de ácido nucleico que codifican para un marcador amplificable y/o ADN homólogo a ADN genómico en la célula receptora para dirigir la integración del ADN a un sitio seleccionado en el genoma (selección como diana de ADN o secuencias de ADN).

#### 35 Células huésped

40 Células huésped usadas para producir proteínas recombinantes son, por ejemplo y sin limitación, células bacterianas, de levaduras, de insectos, de vertebrados no mamíferos o de mamíferos; las células de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células de hámster, mono, chimpancé, perro, gato, bovinas, porcinas, de ratón, de rata, de conejo, de oveja y humanas. Las células huésped son células inmortalizadas (una línea celular) o células no inmortalizadas (primarias o secundarias) y son de una amplia variedad de tipos de células, tales como, pero sin limitarse a, fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales de mamífero, células epiteliales intestinales), células de ovario (por ejemplo, células de ovario de hámster chino o CHO), células endoteliales, células gliales, células neuronales, elementos formados de la sangre (por ejemplo, linfocitos, células de médula ósea), células musculares, hepatocitos y precursores de estos tipos de células somáticas. Las células huésped comúnmente usadas incluyen, sin limitación: células procariotas tales como bacterias Gram-negativas o Gram-positivas, es decir, cualquier cepa de *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Salmonella*, y similares; células eucariotas tales como células CHO (de ovario de hámster chino); células de riñón de cría de hámster (BHK); células 293 de riñón humano; células COS-7; células de insectos tales como D. Mel-2, Sf4, Sf5, Sf9 y Sf21 y High 5; células vegetales y diversas células de levaduras tales como *Saccharomyces* y *Pichia*.

55 Las células huésped que contienen el ADN o ARN que codifica para polipéptido se cultivan en condiciones apropiadas para el crecimiento de las células y la expresión del ADN o ARN. Las células que expresan el polipéptido se identifican, usando métodos conocidos, y la proteína recombinante se aísla y se purifica, usando métodos conocidos; o bien con o bien sin amplificación de la producción de polipéptido. La identificación se lleva a cabo, por ejemplo y sin limitación, a través de examen de células de mamífero modificadas genéticamente que presentan un fenotipo indicativo de la presencia de ADN o ARN que codifica para la proteína, tal como examen por PCR, examen mediante análisis de transferencia de tipo Southern o examen para la expresión de la proteína. La selección de células que han incorporado ADN que codifica para proteína se logra, por ejemplo, incluyendo un marcador seleccionable en el constructo de ADN y cultivando células transfectadas o infectadas que contienen un gen marcador seleccionable en condiciones apropiadas para la supervivencia de sólo las células que expresan el gen marcador seleccionable. La amplificación adicional del constructo de ADN introducido se efectúa cultivando células genéticamente modificadas en condiciones apropiadas para la amplificación (por ejemplo, cultivando células genéticamente modificadas que contienen un gen marcador amplificable en presencia de una concentración de un fármaco a la que sólo células que contienen múltiples copias del gen marcador amplificable pueden sobrevivir).

Las proteínas recombinantes que son proteínas fisiológicamente activas o proteínas terapéuticas incluyen, pero no se limitan a, citocinas, factores de crecimiento, factores de coagulación sanguínea, enzimas, quimiocinas, receptores de superficie celular solubles, moléculas de adhesión celular, anticuerpos, hormonas, proteínas del citoesqueleto, proteínas de la matriz, proteínas chaperona, proteínas estructurales, proteínas metabólicas y otras proteínas terapéuticas conocidas por los expertos en la técnica.

Los factores de coagulación sanguínea recombinantes a modo de ejemplo que se usan como productos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, factor II, factor III, factor V, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor de von Willebrand y fibrinógeno. El complejo proteico puede ser un complejo que comprende uno o más factores sanguíneos.

#### Factores sanguíneos

El factor VIII (FVIII) es una glicoproteína de plasma sanguíneo de aproximadamente 260 kDa de masa molecular producida en el hígado de mamíferos (n.º de registro de Genbank NP\_000123). Es un componente crítico de la cascada de reacciones de coagulación que conducen a la coagulación sanguínea. Dentro de esta cascada está una etapa en la que el factor IXa, conjuntamente con FVIII, convierte el factor X (n.º de registro de Genbank NP\_000495) en una forma activada, factor Xa. El FVIII actúa como cofactor en esta etapa, requiriéndose con iones de calcio y fosfolípido para la actividad del factor IXa. Los dos trastornos hemofílicos más comunes están provocados por una deficiencia de FVIII funcional (hemofilia A, aproximadamente el 80 % de todos los casos) o factor IXa funcional (hemofilia B o enfermedad de factor Christmas). El FVIII circula en el plasma a una concentración muy baja y está unido de manera no covalente a factor de von Willebrand (VWF). Durante la hemostasia, el FVIII se separa de VWF y actúa como cofactor para la activación de factor X (FX) mediada por factor IX activado (FIXa) potenciando la velocidad de activación en presencia de calcio y fosfolípidos o membranas celulares.

El FVIII se sintetiza como un precursor de una sola cadena de aproximadamente 270-330 kD con la estructura de dominios A1-A2-B-A3-C1-C2. Cuando se purifica del plasma, el FVIII se compone de una cadena pesada (A1-A2-B) y una cadena ligera (A3-C1- C2). La masa molecular de la cadena ligera es de 80 kD mientras que, debido a la proteólisis dentro del dominio B, la cadena pesada está en el intervalo de 90-220 kD.

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 de FVIII recombinante (rFVIII) como medicamento terapéutico. Estos ensayos imitan los efectos *in vivo* de FVIII endógeno. El tratamiento con trombina *in vitro* de FVIII da como resultado un aumento rápido y una disminución posterior en su actividad procoagulante, tal como se mide mediante un ensayo *in vitro*. Esta activación e inactivación coincide con la proteólisis limitada específica tanto en las cadenas pesadas como ligeras, que alteran la disponibilidad de diferentes epítomos de unión en FVIII, por ejemplo, permitiendo que FVIII se disocie de VWF y se una a una superficie de fosfolípidos o alterando la capacidad de unión a determinados anticuerpos monoclonales.

Hasta hace poco, el tratamiento convencional de la hemofilia A implicaba una infusión frecuente de preparaciones de concentrados de FVIII derivados de los plasmas de donantes humanos. Aunque esta terapia de sustitución es generalmente eficaz, tal tratamiento pone a los pacientes en riesgo de enfermedades transmisibles por virus tales como hepatitis y SIDA. Aunque este riesgo se ha reducido mediante la purificación adicional de FVIII del plasma mediante inmunopurificación usando anticuerpos monoclonales, y mediante la inactivación de virus mediante tratamiento con o bien un disolvente orgánico o bien calor, tales preparaciones han aumentado enormemente el coste del tratamiento y no carecen de riesgos. Por estos motivos, los pacientes se han tratado ocasionalmente, en vez de profilácticamente. Una complicación adicional es que aproximadamente el 15 % de pacientes desarrollan anticuerpos inhibidores frente a FVIII derivado de plasma. Los pacientes con hemofilia A grave con niveles de FVIII por debajo del 1 %, siguen generalmente una terapia profiláctica con el objetivo de mantener FVIII por encima del 1 % entre las dosis. Teniendo en cuenta las semividas promedio de los diversos productos de FVIII en la circulación, esto puede lograrse habitualmente administrando FVIII de dos a tres veces a la semana.

Un avance importante en el tratamiento de la hemofilia A fue el aislamiento de clones de ADNc que codifican para la secuencia de 2.351 aminoácidos completa de FVIII humano (véase, Wood *et al*, Nature, 312: 330 (1984) y la patente estadounidense n.º 4.757.006) y la provisión de la secuencia de ADN del gen de FVIII humano y métodos recombinantes para su producción. Los productos de FVIII para el tratamiento de la hemofilia incluyen, pero no se limitan a: ADVATE® (factor antihemofílico (recombinante), método libre de plasma/albumina, rAHF-PFM), factor antihemofílico recombinante (BIOCLATE™, GENARC®, HELIXATE FS®, KOATE®, KOGENATE FS®, RECOMBIMATE®); MONOCLATE-P®, preparación purificada de factor VIII:C, complejo de factor antihemofílico/factor de von Willebrand (humano) HUMATE-P® y ALPHANATE®, complejo de factor antihemofílico/factor de von Willebrand (humano); y HYATE C®, factor VIII de cerdo purificado. ADVATE® se produce en células CHO y lo fabrica Baxter Healthcare Corporation. No se añade ninguna albúmina o proteína plasmática humana o animal en el proceso de cultivo celular, purificación o formulación final de ADVATE®.

El factor de von Willebrand existe en el plasma en una serie de formas multiméricas de un peso molecular de desde

1x10<sup>6</sup> hasta 20x10<sup>6</sup> Dalton. El VWF (n.º de registro de Genbank NP\_000543) es una glicoproteína formada principalmente en las células endoteliales de mamíferos y posteriormente secretada a la circulación. En este sentido, partiendo de una cadena de polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 220 kD, se produce un dímero de VWF que tiene un peso molecular de 550 kD en las células mediante la formación de varios enlaces de azufre. Se forman polímeros adicionales del VWF con pesos moleculares crecientes, de hasta 20 millones de Dalton, mediante la unión de dímeros de VWF. Se supone que particularmente los multímeros de VWF de alto peso molecular tienen una importancia esencial en la coagulación sanguínea.

El síndrome de VWF se manifiesta clínicamente cuando hay o bien una subproducción o bien una sobreproducción de VWF. La sobreproducción de VWF provoca trombosis aumentada (formación de un coágulo o trombo dentro de un vaso sanguíneo, que obstruye el flujo de sangre) mientras que niveles reducidos de, o la falta de, formas de alto peso molecular de VWF provocan un aumento de la hemorragia y un tiempo de hemorragia aumentado debido a la inhibición de la agregación plaquetaria y el cierre de heridas.

Una deficiencia de VWF puede provocar también una hemofilia A fenotípica puesto que el VWF es un componente esencial del factor VIII funcional. En estos casos, la semivida del factor VIII se reduce hasta un grado tal que su función en la cascada de coagulación sanguínea se ve alterada. Los pacientes que padecen enfermedad de von Willebrand (VWD) o síndrome de VWF presentan frecuentemente una deficiencia de factor VIII. En estos pacientes, la actividad del factor VIII reducida no es la consecuencia de un defecto del gen cromosómico X, sino una consecuencia indirecta del cambio cuantitativo y cualitativo de VWF en el plasma. La diferenciación entre hemofilia A y VWD puede efectuarse normalmente midiendo el antígeno VWF o determinando la actividad de cofactor de ristocetina. Tanto el contenido en antígeno VWF como la actividad de cofactor de ristocetina están disminuidos en la mayoría de los pacientes con VWD, mientras que son normales en pacientes con hemofilia A. Los productos de VWF para el tratamiento del síndrome de VWF incluyen, pero no se limitan a: HUMATE-P, IMMUNATE®, INNOBRAND® y 8Y®, que son terapias que comprenden concentrado de FVIII/VWF a partir del plasma.

El factor VII (proconvertina), una enzima serina proteasa, es una de las proteínas centrales en la cascada de coagulación sanguínea (n.º de registro de Genbank NP\_000122). El papel principal del factor VII (FVII) es iniciar el proceso de coagulación conjuntamente con factor tisular (TF). Tras la lesión del vaso, el TF se expone a la sangre y el factor VII circulante. Una vez unido a TF, el FVII se activa a FVIIa mediante diferentes proteasas, entre las cuales están trombina (factor IIa), factor X activado y el propio complejo de FVIIa-TF. Se ha introducido factor VIIa humano recombinante (NOVOSEVEN®) para su uso en hemorragia incontrolable en pacientes con hemofilia que han desarrollado inhibidores contra el factor de coagulación de sustitución.

El factor IX (FIX, factor Christmas) (n.º de registro de Genbank NP\_000124) es una serina proteasa que es inactiva a menos que se active por el factor XIa o factor VIIa (de la ruta del factor tisular). Cuando se activa a factor IXa, actúa hidrolizando un enlace arginina-isoleucina en el factor X para formar factor Xa. El factor VIII es un cofactor requerido para la actividad proteasa de FIX (Lowe GD, Br. J. Haematol. 115: 507-13, 2002). La deficiencia de factor IX provoca hemofilia B o enfermedad de Christmas.

Los factores sanguíneos adicionales incluyen factor II (trombina) (n.º de registro de Genbank NP\_000497), cuyas deficiencias provocan trombosis y disprotrombinemia; factor V, (n.º de registro de Genbank NP\_000121), cuyas deficiencias provocan diatesis hemorrágica o una forma de trombofilia, que se conoce como resistencia a proteína C activada, factor XI (n.º de registro de Genbank NP\_000119), cuyas deficiencias provocan síndrome de Rosenthal (hemofilia C) y subunidad A (n.º de registro de Genbank NP\_000120) y subunidad B (n.º de registro de Genbank NP\_001985) de factor XIII, cuyas deficiencias se caracterizan como deficiencia de tipo I (deficiencia de tanto las subunidades A como B) y deficiencia de tipo II (deficiencia de la subunidad A sola), cualquiera de las cuales puede dar como resultado una tendencia a la hemorragia permanente, cicatrización de heridas defectuosa y aborto habitual.

#### Análogos o variantes de polipéptidos

Se conocen bien en la técnica métodos para preparar fragmentos, variantes o análogos de polipéptidos. Se preparan fragmentos de un polipéptido usando métodos que incluyen escisión enzimática (por ejemplo, tripsina, quimotripsina) y también usando medios recombinantes para generar un fragmento de polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos específica. Se generan fragmentos, en un aspecto, para que comprendan un dominio de unión a ligando, un dominio de unión a receptor, un dominio de dimerización o multimerización o cualquier otro dominio identificable conocido en la técnica.

Los análogos son, en determinados aspectos, sustancialmente homólogos o sustancialmente idénticos al polipéptido que se produce de manera natural del cual se deriva el análogo, y los análogos contemplados por la invención son los que conservan al menos parte de la actividad biológica del polipéptido que se produce de manera natural tal como se describió anteriormente.

Los análogos de sustitución intercambian normalmente un aminoácido del tipo natural por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, tales como

estabilidad frente a la escisión proteolítica, sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Sustituciones de este tipo son generalmente conservativas. Por "sustitución de aminoácido conservativa" quiere decirse la sustitución de un aminoácido por un aminoácido que tiene una cadena lateral de un carácter químico similar. Los aminoácidos similares para realizar sustituciones conservativas incluyen aquellos que tienen una cadena lateral ácida (ácido glutámico, ácido aspártico); una cadena lateral básica (arginina, lisina, histidina); una cadena lateral de amida polar (glutamina, asparagina); una cadena lateral hidrófoba, alifática (leucina, isoleucina, valina, alanina, glicina); una cadena lateral aromática (fenilalanina, triptófano, tirosina); una cadena lateral pequeña (glicina, alanina, serina, treonina, metionina); o una cadena lateral de hidroxilo alifática (serina, treonina).

5 Un operario experto genera fácilmente análogos y fragmentos de polinucleótidos para que codifiquen para fragmentos o análogos biológicamente activos de la molécula que se produce de manera natural que presenta la misma o similar actividad biológica que la molécula que se produce de manera natural. Los métodos puestos en práctica de manera rutinaria incluyen técnicas de PCR, digestión enzimática de ADN que codifica para la molécula de proteína y ligación a secuencias de polinucleótido heterólogas, y similares. Por ejemplo, puede emplearse mutagénesis puntual, usando PCR y otras técnicas bien conocidas en la técnica, para identificar con particularidad qué residuos de aminoácido son importantes en actividades particulares asociadas con la actividad de la proteína. Por tanto, un experto en la técnica será capaz de generar cambios en bases individuales en la hebra de ADN dando como resultado un codón alterado y una mutación de cambio de sentido.

10 Se contempla además que la proteína o el polipéptido se modifique para preparar un análogo que es una proteína tal como se describe en el presente documento que comprende además un segundo agente que es un polipéptido, es decir, una proteína de fusión. En una realización, el segundo agente que es un polipéptido es una citocina, factor de crecimiento, factor sanguíneo, enzima, quimiocina, receptor de superficie celular soluble, molécula de adhesión celular, anticuerpo, hormona, proteína del citoesqueleto, proteína de la matriz, proteína chaperona, proteína estructural, proteína metabólica y otras proteínas terapéuticas conocidas por los expertos en la técnica, o fragmento o dominio activo de una proteína descrita anteriormente o de cualquier otro tipo de proteína conocida en la técnica. En una realización relacionada, el segundo agente es un factor de coagulación sanguínea tal como factor II, factor III, factor V, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor de von Willebrand y fibrinógeno. La proteína de fusión contemplada se prepara mediante técnicas químicas o recombinantes bien conocidas en la técnica.

20 Las variantes de proteínas contempladas incluyen polipéptidos modificados químicamente mediante técnicas tales como ubiquitinación, glicosilación, conjugación a agentes terapéuticos o de diagnóstico, marcaje (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas), unión de un polímero covalente tal como pegilación (derivatización con polietilenglicol), introducción de enlaces no hidrolizables e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos tales como ornitina, que no aparecen normalmente en proteínas humanas. Las variantes conservan las propiedades de unión de moléculas de la invención no modificadas.

35 Otras variantes de polipéptidos útiles en los métodos de la presente invención incluyen polipéptidos que comprenden restos polisialilados (PSA). Se describen métodos para preparar polipéptido polisialilado en la publicación de patente estadounidense 20060160948 y Saenko *et al.* Haemophilia 12:42-51, 2006.

#### Polímeros solubles en agua

45 La memoria descriptiva contempla proteínas o polipéptidos modificados químicamente, que se han unido a un resto químico que proporciona efectos ventajosos a la producción, viabilidad de la proteína o polipéptido. Por ejemplo, se conoce en la técnica que la conjugación no específica o específica de sitio (por ejemplo, N-terminal) de polímeros solubles en agua, por ejemplo, PEG o PEO, a polipéptidos mejora la semivida reduciendo potencialmente la inmunogenicidad, el aclaramiento renal y/o mejorando la resistencia a proteasas. Los polipéptidos pueden comprender polímeros solubles en agua, tales como PEG, unidos covalentemente al extremo N- o C-terminal del péptido para aumentar la semivida y/o estabilidad de la molécula.

50 Polímeros solubles en agua, incluyendo pero sin limitarse a, poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxi alquilmetacrilamida), poli(metacrilato de hidroxialquilo), poli(sacáridos), poli( $\alpha$ -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfosfaceno, polioxazolona, poli(N-acriloilmorfolina), polímeros de poli(óxido de alquileo), poli(ácido maleico), poli(DL-alanina), polisacáridos, tales como carboximetilcelulosa, dextrano, almidón o derivados de almidón, ácido hialurónico y quitina, poli(met)acrilatos, así como poli(ácido siálico) (PSA), y combinaciones de cualquiera de los anteriores, se conjugan comúnmente con proteínas o péptidos para aumentar la estabilidad o el tamaño de una proteína o un péptido.

60 La modificación química de macromoléculas se realiza, en un aspecto, de un modo no específico (conduciendo a mezclas de especies derivatizadas) o de un modo específico de sitio (basándose en derivatización dirigida por la reactividad de la macromolécula de tipo natural y/o modificación selectiva de sitio usando una combinación de mutagénesis dirigida al sitio y modificación química) o, alternativamente, usando métodos de ligación de proteínas expresadas (Curr Opin Biotechnol. 13(4):297-303 (2002)).

La memoria descriptiva contempla el uso de polímeros solubles en agua, por ejemplo, moléculas de PEG o PEO que pueden variar en tipo, conjugación, unión y longitud. Los conjugados de PEG-proteína incluyen pero no se limitan a conjugados lineales o ramificados, conjugados de polímero-proteínas unidos mediante química basada en NHS (N-hidroxisuccinimida) o aldehído, variantes con una unión química diferente entre la cadena de polímero soluble en agua y el sitio de conjugación, y variantes que difieren en las longitudes. El peso molecular promedio del PEG puede oscilar entre aproximadamente 2 y 200 kilodalton ("kDa"), entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 120 kDa, entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 100 kDa, entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 50 kDa, entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 25 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 10 kDa o entre aproximadamente 2 kDa y 5 kDa.

En un aspecto de referencia, la memoria descriptiva contempla conjugados de PEG-proteína seleccionados del grupo que consiste en conjugados de PEG-proteína lineales que están conjugados a NHS y oscilan en longitud entre  $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n-$ , en donde  $n =$  de 10 a 2000, conjugados de PEG-proteína lineales que están conjugados a aldehído y oscilan en longitud entre  $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n-$ , en donde  $n =$  de 10 a 2000, conjugados de PEG-proteína de múltiples brazos y ramificados de dos brazos y oscilan en longitud desde 10 hasta 2000, y conjugados de PEG-proteína ramificados de tres brazos que están conjugados a NHS. La memoria descriptiva también contempla conjugados de PEG-proteína que contienen diferentes uniones químicas, por ejemplo,  $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n-$  y  $-(\text{CH}_2)_n-$  (en donde  $n =$  de 1 a 5) entre su sitio de conjugación y la cadena de PEG. La memoria descriptiva contempla además conjugados de PEG-proteína cargados, aniónicos para reducir el aclaramiento renal, incluyendo pero sin limitarse a compuestos carboxilados, sulfatados y fosforilados (aniónicos) (Caliceti, *Adv Drug Deliv Rev* 55:1261-77, 2003; Perlman, *J Clin Endo Metab* 88:3227-35, 2003; Pitkin, *Antimicrob Ag Chemo* 29: 440-44, 1986; Vehaskari, *Kidney Intl* 22:127-135, 1982). En una realización adicional, el péptido está conjugado opcionalmente a un resto que incluye bisfosfonato, hidratos de carbono, ácidos grasos o aminoácidos adicionales.

Los PEG y PEO incluyen moléculas con una distribución de pesos moleculares, es decir, polidispersas. La distribución de tamaño puede caracterizarse estadísticamente por su peso molecular promedio en peso (Mw) y su peso molecular promedio en número (Mn), cuya razón se denomina índice de polidispersidad (Mw/Mn). Mw y Mn pueden medirse mediante espectroscopía de masas. La mayoría de los conjugados de PEG-proteína, particularmente los conjugados a PEG mayor de 1 KD, presentan un intervalo de pesos moleculares debido a la naturaleza polidispersa de la molécula de PEG original. Por ejemplo, en el caso de mPEG2K (Sunbright ME-020HS, NOF), las masas moleculares reales se distribuyen a lo largo de un intervalo de 1,5 ~ 3,0 KD con un índice de polidispersidad de 1,036. Excepciones son proteínas conjugadas a reactivos a base de  $\text{MS}(\text{PEG})_n$  ( $N=4, 8, 12$  ó  $24$ , por ejemplo, PEO4, PEO12) (Pierce), que se preparan especialmente como mezclas monodispersas con longitud de cadena diferenciada y peso molecular definido.

Para determinar si la semivida terapéutica *in vivo* de un péptido se beneficiaría de la pegilación, se sintetiza una variedad de diferentes conjugados de PEG-proteína, se caracterizan *in vitro* e *in vivo* para determinar la farmacocinética.

Los métodos para preparar la proteína pegilada de la presente memoria descriptiva comprenden generalmente las etapas de (a) hacer reaccionar la proteína de interés con polietilenglicol en condiciones mediante las cuales el PEG se une al extremo N-terminal/C-terminal de la proteína, y (b) obtener el/los producto(s) de reacción. Debido a que la pegilación de una proteína alteraría significativamente la actividad intrínseca de la proteína, se exploran diferentes tipos de PEG. La química que puede usarse para la pegilación de la proteína incluye la acilación de las aminas primarias de la proteína usando el éster de NHS de metoxi-PEG (O-[(N-succinimidiloxycarbonil)-metil]-O'-metilpolietilenglicol). La acilación con metoxi-PEG-NHS o metoxi-PEG-SPA da como resultado una unión amida que elimina la carga de la amina primaria original (también, Boc-PEG para el extremo C-terminal). A diferencia de la síntesis de proteínas en ribosomas, la síntesis de péptidos sintéticos avanza desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal. Por tanto, Boc-PEG es un método (es decir, usando síntesis de éter-(B)utilo(o)xi(c)arbonilo (Boc, t-Boc)) para unir PEG al extremo C-terminal del péptido (R. B. Merrifield (1963). "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide". *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154). Alternativamente, se usa química de (F)luorenil-(m)et(o)xi-(c)arbonilo (Fmoc) (Atherton, E.; Sheppard, R.C. (1989). *Solid Phase peptide synthesis: a practical approach*. Oxford, England: IRL Press.) porque no requiere el uso peligroso ácido flurhídrico para eliminar grupos protectores de cadenas laterales.

En la invención, cuando el polímero soluble en agua es PSA, el peso molecular promedio del PSA oscilará entre aproximadamente 2 y 80 kDa, entre 5 y 60 kDa, entre 10 y 40 kDa o entre 15 y 25 kDa.

Los ligadores estables a modo de ejemplo que pueden facilitar la conjugación del polímero soluble en agua al polipéptido de interés incluyen, pero no se limitan a, uniones amida, amina, éter, carbamato, tiourea, urea, tiocarbamato, tiocarbonato, tioéter, tioéster y ditiocarbamato, tales como  $\omega, \omega$ -aminoalcano, N-carboxialquilmaleimida, o ácidos aminoalcanoicos, éster de sulfosuccinimida de maleimidobenzoílo, glutaraldehído, o anhídrido succínico, N,N'-disuccinimidiloxalato de N-carboximetilmaleimida y oxalato de 1,1'-bis[6-(trifluorometil)benzo-triazolilo].

En otras realizaciones, el polímero soluble en agua se conjuga al polipéptido usando ligadores liberables, degradables o hidrolizables, según las reivindicaciones. Un enlace hidrolizable es un enlace relativamente débil que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no sólo del tipo general de unión que conecta dos átomos centrales sino también de los sustituyentes unidos a estos átomos centrales. Se describen métodos de preparación de conjugados que comprenden polímeros solubles en agua que tienen ligadores hidrolizables en la patente estadounidense 7.259.224 (Nektar Therapeutics) y la patente estadounidense 7.267.941 (Nektar Therapeutics y National Institutes of Health). Por ejemplo, puede prepararse un PEG que tiene uniones éster en la estructura principal del polímero que se someten a hidrólisis. Esta hidrólisis da como resultado la escisión del polímero en fragmentos de peso molecular inferior. Los ligadores hidrolíticamente inestables, liberables o degradables apropiados incluyen pero no se limitan a éster de carboxilato, éster de fosfato, anhídridos, acetales, cetales, acil oxialquil éter, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos, tioésteres, tiolésteres y carbonatos. Los ligadores hidrolíticamente degradables que pueden estar contenidos dentro de la estructura principal del polímero incluyen uniones carbamato, carbonato, sulfato y acil oxialquil éter; uniones imina, que resultan, por ejemplo, de la reacción de una amina y un aldehído (véase, por ejemplo, Ouchi *et al.*, Polymer Preprints, 38(1):582-3 (1997)); uniones carbamato, éster de fosfato, hidrazona, acetal, cetal u ortoéster, incluyendo ligadores de acetona-bis-(N-maleimidoetil)cetal (MK).

Los presentes métodos proporcionan una mezcla sustancialmente homogénea de conjugado de polímero-proteína. "Sustancialmente homogénea" tal como se usa en el presente documento significa que sólo se observan moléculas de conjugado de polímero-proteína. El conjugado de polímero-proteína tiene actividad biológica y las presentes preparaciones de proteínas pegiladas "sustancialmente homogéneas" son las que son lo suficientemente homogéneas como para mostrar las ventajas de una preparación homogénea, por ejemplo, facilidad de aplicación clínica en la predictibilidad de la farmacocinética de lote a lote.

Las moléculas de polímero contempladas para su uso en los métodos de unión descritos en el presente documento pueden seleccionarse de polímeros solubles en agua o una mezcla de los mismos. El polímero puede tener un único grupo reactivo, tal como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación, de modo que el grado de polimerización puede controlarse. El polímero soluble en agua, o mezcla del mismo si se desea, puede seleccionarse del grupo que consiste en, por ejemplo, PEG, monometoxi-PEG, PEO, dextrano, almidón o derivados de almidón, poli-(N-vinilpirrolidona), homopolímeros de propilenglicol, ácidos grasos, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), HPMA, FLEXIMAR™, y poli(alcohol vinílico), mono-(C1-C10)alcoxi-PEG, ariloxi-PEG, tresilmonometoxi-PEG, PEG-propionaldehído, carbonato de bis-succinimidilo-PEG, celulosa, otros polímeros a base de hidratos de carbono, o mezclas de los mismos. El polímero seleccionado debe ser soluble en agua de modo que la proteína a la que se une no precipite en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. El polímero puede estar ramificado o no ramificado. Preferiblemente, para uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable. En la técnica se conocen bien métodos para generar péptidos que comprenden un resto de PEG. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense 5.824.784.

El término PEG pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono-ariloxi o alcoxi (C1-C10)-polietilenglicol. El polímero de PEG puede estar ramificado o no ramificado. Preferiblemente, para uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable. En una realización, el aldehído reactivo es PEG-propionaldehído, que es estable en agua, o derivados de mono-ariloxilo o alcoxilo C1-C10 del mismo (véase la patente estadounidense n.º 5.252.714).

La presente memoria descriptiva contempla varias longitudes de polímeros de PEG lineales diferentes incluyendo pero sin limitarse a de 10 a 2000 unidades de repetición (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-) o conjugados de polímeros de PEG ramificados de dos brazos. Se contemplan además PEG-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> a base de NHS o aldehído, que tienen desde 12 hasta 50 unidades. En general, para las reacciones de pegilación contempladas en el presente documento, el peso molecular promedio del resto de PEG añadido es de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 60 kDa (indicando el término "aproximadamente" +/-1 kDa). Más preferiblemente, el peso molecular promedio es de aproximadamente 10 - 40 kDa.

La invención proporciona proteínas modificadas, concretamente FVIII, que tienen un bajo grado de polímero soluble en agua conjugado a la proteína. En un aspecto de referencia, la forma poco pegilada de la proteína se genera usando un exceso molar disminuido de polímero soluble en agua con respecto a proteína en la reacción de conjugación. Por ejemplo, los métodos típicos para pegilar una proteína usan un exceso de 61,8 M de PEG con respecto a la proteína de interés. Se contempla que se generen proteínas poco pegiladas tal como se describe en el presente documento usando un exceso molar en la reacción que es menor que el usado en técnicas convencionales. Se divulga que el polímero soluble en agua puede ser polietilenglicol (PEG). Se contempla que el PEG sea un PEG lineal o ramificado, y puede tener el peso molecular y las características descritos en el presente documento.

Adicionalmente, se contempla que la proteína poco pegilada descrita en el presente documento comprenda al menos uno y no más de 10 restos de polímero soluble en agua por molécula de factor sanguíneo. En un aspecto de referencia, la proteína modificada comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 restos de polímero soluble en agua por

molécula de proteína. En otro aspecto de referencia la proteína modificada comprende entre 4 y 8 restos de polímero soluble en agua, inclusive (es decir, incluye 4, 5, 6, 7 y 8 restos de polímero), por molécula de proteína. La proteína modificada es un factor sanguíneo. El factor sanguíneo modificado puede comprender entre 1 y 4 restos de polímero soluble en agua, inclusive, por molécula de proteína. El factor sanguíneo modificado puede comprender entre 4 y 6 restos de polímero soluble en agua, inclusive, por molécula de proteína. En todavía otra realización el factor sanguíneo modificado comprende 1 ó 2 restos de polímero soluble en agua por molécula de proteína según las reivindicaciones.

Tal como se usa en el presente documento, el término "entre" cuando se usa en el contexto de números de polímeros solubles en agua, por ejemplo, "comprende entre 4 y 8 polímeros solubles en agua", incluye los números mencionados y los números entre los números mencionados. Por ejemplo, entre 4 y 8 polímeros solubles en agua se refiere a 4, 5, 6, 7 y 8 polímeros solubles en agua.

El factor sanguíneo es factor VIII. En una realización todavía adicional, la molécula de factor sanguíneo es humana.

En otro aspecto de referencia el factor sanguíneo modificado comprende entre 4 y 8 restos de PEG, entre 4 y 6 restos de PEG o entre 1 y 4 restos de PEG, inclusive, por molécula de factor VIII. En todavía otro aspecto de referencia el factor sanguíneo modificado comprende 1 ó 2 restos de PEG por molécula de factor VIII. Se contempla que las moléculas de PEG estén conectadas o conjugadas al factor sanguíneo por medio de un ligador estable, liberable o hidrolizable.

El factor sanguíneo modificado comprende 1 ó 2 restos de PSA por molécula de factor VIII. Se contempla que las moléculas de PSA estén conectadas o conjugadas al factor sanguíneo por medio de un ligador estable, liberable o hidrolizable.

En otro aspecto de referencia, el factor sanguíneo modificado es FVIIa. En un aspecto de referencia relacionado, el factor sanguíneo modificado comprende entre 1 y 6 restos de polímero soluble en agua, inclusive, por molécula de FVIIa. En algunos aspectos de referencia, el factor sanguíneo modificado comprende 1 ó 2 restos de polímero soluble en agua por molécula de FVIIa. En un aspecto de referencia relacionado, el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en PEG o PSA. En determinadas realizaciones, los polímeros están conectados por medio de un ligador estable, liberable o hidrolizable.

En todavía otros aspectos de referencia, el factor sanguíneo modificado es FIX. En un aspecto de referencia, el factor sanguíneo modificado comprende entre 1 y 6 restos de polímero soluble en agua, inclusive, por molécula de FIX. En algunos aspectos de referencia, el factor sanguíneo modificado comprende 1 ó 2 restos de polímero soluble en agua por molécula de FIX. En un aspecto de referencia relacionado, el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en PEG o PSA. En una realización, los polímeros están conectados por medio de un ligador estable, liberable o hidrolizable.

#### Composiciones farmacéuticas

La presente invención contempla composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces de proteína o productos derivados de la invención junto con diluyentes, estabilizadores, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido en tampón (por ejemplo, Tris-HCl, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico) y sustancias de carga (por ejemplo, lactosa, manitol); véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.) páginas 1435:1712. Una cantidad eficaz de principio activo es una cantidad terapéutica, profiláctica o diagnósticamente eficaz, que puede determinarla fácilmente un experto en la técnica teniendo en consideración factores tales como peso corporal, edad y objetivo terapéutico.

Las composiciones de polímero-proteína de la presente invención pueden incluir también un agente tamponante para mantener el pH de la disolución dentro de un intervalo deseado. Los agentes preferidos incluyen acetato de sodio, fosfato de sodio y citrato de sodio. También pueden usarse mezclas de estos agentes tamponantes. La cantidad de agente tamponante útil en la composición depende en gran medida del tampón particular usado y el pH de la disolución. Por ejemplo, el acetato es un tampón más eficaz a pH 5 que a pH 6 de modo que puede usarse menos acetato en una disolución a pH 5 que a pH 6. El intervalo de pH preferido para las composiciones de la presente invención es pH 3,0-7,5.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir además un agente de ajuste de la isotonicidad para hacer que la disolución sea isotónica y más compatible para la inyección. El agente más preferido es cloruro de sodio dentro de un intervalo de concentración de 0-150 mM.

Los métodos descritos en el presente documento usan composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas descritas anteriormente, junto con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, y

opcionalmente otros componentes terapéuticos y/o profilácticos. Tales excipientes incluyen líquidos tales como agua, solución salina, glicerol, polietilenglicol, ácido hialurónico, etanol, ciclodextrinas, ciclodextrinas modificadas (es decir, sulfobutil éter ciclodextrinas), etc. Los expertos en la técnica también conocen excipientes adecuados para formulaciones no líquidas.

Pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables en las composiciones de la presente invención e incluyen, por ejemplo, sales de ácido mineral tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. Está disponible una discusión concienzuda de excipientes y sales farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990).

Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes biológicas, tensioactivos, y similares, pueden estar presentes en tales vehículos. Un tampón biológico puede ser prácticamente cualquier disolución que sea farmacológicamente aceptable y que dote a la formulación del pH deseado, es decir, un pH en el intervalo fisiológicamente aceptable. Los ejemplos de disoluciones tampón incluyen solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada de Hank, y similares.

### Kits

Como aspecto adicional, la memoria descriptiva incluye kits que comprenden uno o más compuestos o composiciones envasados de una manera que facilita su uso para poner en práctica los métodos de la invención. En una realización, un kit de este tipo incluye un compuesto o composición descrito en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende un factor sanguíneo modificado, tal como factor VIII poco pegilado), envasado en un recipiente tal como un frasco o botella sellado, con una etiqueta fijada al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o la composición en la puesta en práctica del método. Preferiblemente, el compuesto o la composición se envasa en una forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir además un dispositivo adecuado para administrar la composición según una vía de administración específica. Preferiblemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de la composición de factor sanguíneo modificado.

Aspectos y detalles adicionales de la invención resultarán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, que se pretende que sean ilustrativos.

### **Ejemplos**

#### Ejemplo de referencia 1

#### Síntesis de factor VIII poco pegilado

La modificación de factores de coagulación sanguínea mediante la adición de polímeros solubles en agua se ha llevado a cabo con el fin de prolongar la semivida y mejorar la estabilidad de moléculas que se administran como proteínas terapéuticas. Sin embargo, un alto grado de unión de polímeros solubles en agua puede conducir a mayor toxicidad *in vivo*. Por tanto, con el fin de mejorar la eficacia de moléculas terapéuticas, se realizaron experimentos para reducir el grado de conjugación de polímeros solubles en agua.

La síntesis de rFVIII pegilado que contiene un dominio B intacto se describe en la publicación de patente estadounidense 20070244301 y la publicación de patente internacional WO 2007/126808. Este rFVIII pegilado que contiene un dominio B intacto mostró características *in vitro* e *in vivo* mejoradas en condiciones experimentales, y dio como resultado una cadena ligera al menos parcialmente pegilada (A3-C1-C2) de la molécula de rFVIII.

Sin embargo, un proceso químico que conduce a un grado relativamente alto de modificación de la proteína terapéutica no es económico debido a las altas cantidades requeridas de reactivos. Además, altos grados de pegilación conducen a un aumento del riesgo toxicológico debido a las altas cantidades del polímero y el ligador. Por tanto, con el fin de generar una molécula que tiene un menor grado de restos de PEG, la concentración de reactivos en el proceso de preparación se redujo y se prepararon diferentes PEGrFVIII reduciendo la concentración de reactivos desde un exceso de 61,8 M (convencional) hasta un exceso de 30 M, 25 M, 20 M y 15 M, respectivamente.

Las variantes de pegilación descritas en la técnica tienen características de liberación variables así como diferentes pesos moleculares de las cadenas de PEG. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 2008082669 y US20080234193 (Nektar Therapeutics y Baxter Healthcare). Se preparó una variante de rFVIII pegilado que tenía una ramificación (ramificación larga de Lys 20K) con un peso molecular de la cadena de PEG de 20 kD con una característica de liberación prolongada mediante el uso de un exceso de 61,8 M de un reactivo de PEG liberable. Este rFVIII pegilado se seleccionó como candidato principal para modificar el grado de pegilación debido a los datos *in vitro* e *in vivo* medidos de las moléculas. Para el candidato de rFVIII pegilado inicial, se midió un grado de pegilación de 11,1 PEG/rFVIII (mol/mol) mediante el uso de métodos de HPLC tal como se describe en la técnica (véase por ejemplo, Chen *et al.*, Bioconjug Chem. 18:371-8, 2007) cuando se preparó el conjugado usando un

exceso de 61,8 M de PEG.

El proceso para la pegilación de rFVIII fue tal como sigue: pegilación de rFVIII durante 2 h a T.A. a pH 7,2 +/- 0,2 (c = 2 mg/ml); concentración de reactivos (3,9 mg de reactivo/mg de proteína - exceso de 61,8 M); detención/extinción de la reacción mediante la adición de glicina; purificación sobre Q-Sepharose HP. Elución con NaCl ~ 0,5 M; UF/DF y formulación final de la molécula pegilada. Se prepararon los conjugados con bajo contenido en PEG como anteriormente usando el exceso molar indicado del polímero de PEG. Las muestras de PEG-rFVIII usadas fueron las siguientes: exceso de 15 M: VIEHLUFB08007PHR; exceso de 20 M: VIEHLUFB08016PHR; exceso de 25 M: VIEHLUFB08017PHR; exceso de 30 M: VIEHLUFB08008PHR, VIEHLUFB08009PHR, VIEHLUFB07029PHR; exceso de 61,8 M (protocolo convencional en la técnica) y FVIII nativo: VIEHLUFB08018PHR, ORHLUFB07016PHR, ORHLUFB07017PHR, ORHLUFB08001PHR, ORHLUFB08002PHR.

Para el candidato resintetizado, se determinó un grado de 8 PEG/rFVIII. Se caracterizaron adicionalmente los FVIII con bajo contenido en PEG *in vitro* e *in vivo* tal como se describe en los ejemplos a continuación.

#### Ejemplo de referencia 2

##### Análisis de moléculas de factores sanguíneos poco pegiladas *in vitro*

En un aspecto, se analizaron las muestras con bajo contenido en PEG para determinar el peso molecular y la estructura general de la molécula de PEGFVIII, así como para determinar la actividad específica de la molécula de FVIII conjugada con PEG. Se llevó a cabo el análisis de SDS-PAGE de la estructura de PEG-FVIII como en el documento WO 2007/126808. En resumen, se caracterizó rFVIII nativo mediante SDS PAGE en condiciones reductoras usando un gel de gradiente de poliacrilamida al 4-12 % obtenido de Invitrogen (Carlsbad, California, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Como marcadores de peso molecular (PM) se usaron marcadores Precision Plus (10 kD - 250 kD) obtenidos de Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.). Entonces se transfirieron las proteínas sobre una membrana de PVDF obtenida de Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.) mediante electrotransferencia y se incubaron posteriormente con un anticuerpo de oveja policlonal anti-FVIII:C humano obtenido de Cedarlane (Hornby, Ontario, Canadá). Las últimas etapas del procedimiento de inmunotinción fueron la incubación con una fosfatasa alcalina (ALP) conjugada con anticuerpo anti-oveja obtenido de Accurate (Westbury, NY, EE.UU.) seguido por la visualización final mediante el uso de un kit de sustrato de ALP (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Adicionalmente, se sometió a ensayo la actividad específica de la molécula de FVIII tal como se describe en el documento WO 2007/126808, usando el ensayo cromogénico de FVIII (Rosen S, Scand J Haematol 33:(supl. 40):139-45, 1984). El método se basa en la Ph. Eur. 5ª edición (5.05) 2.7.4 Assay of Blood Coagulation Factor VIII. Se mezcla una muestra, que contiene factor VIII, con trombina, factor IX activado (FIXa), fosfolípidos y factor X (FX) en un tampón que contiene calcio. El FVIII se activa por trombina y posteriormente forma un complejo con fosfolípidos, FIXa e iones de calcio. Este complejo activa el factor X a factor Xa, que a su vez escinde el sustrato cromogénico FXa-1 (AcOH\*CH3OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA). El transcurso temporal de la para-nitroanilina (pNA) liberada se mide con un lector de microplacas a 405 nm. La pendiente de la reacción es proporcional a la concentración de factor VIII en la muestra. El valor de antígeno FVIII se midió mediante el uso de un sistema de ELISA comercialmente disponible (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canadá) con modificaciones menores. A partir de estos valores, se calcularon las razones de cromógeno de FVIII/antígeno FVIII. Se determinó el contenido en proteína en las preparaciones midiendo la densidad óptica a 280 nm. A partir de estos datos, se calculó el contenido en proteína.

En la figura 1 se muestran los resultados de SDS-PAGE. La evaluación por SDS-PAGE del contenido en FVIII usando anticuerpos específicos para FVIII demuestra que FVIII combinado con un exceso molar inferior de moléculas de PEG (exceso de 15, 20, 25 y 30 M) produjo moléculas de peso molecular inferior en comparación con el FVIII nativo, pero las moléculas de FVIII detectadas son similares a las que aparecen cuando se usa un exceso superior de moléculas de PEG (exceso de 61,8 M). El estudio con sonda de la SDS-PAGE con un anticuerpo específico para PEG detectó especies de peso molecular superior del PEG-FVIII en todas las muestras de PEG sometidas a prueba.

En la tabla 1 se muestra el análisis de la actividad específica de FVIII poco pegilado (y datos de productos relevantes). Estos resultados muestran que la actividad específica del FVIII poco pegilado es más similar a FVIII nativo que PEG-FVIII preparado usando el exceso molar alto. Por ejemplo, la muestra de PEG-FVIII preparada usando sólo un exceso de 15 M de PEG demostró una actividad específica de 2221 UI/mg en comparación con la actividad específica de FVIII nativa de 3706 UI/mg. En cambio, muestras preparadas usando el protocolo de pegilación común, que tenían un exceso de 61,8 M de PEG, mostraron una actividad específica desde tanto como 398 UI/mg hasta tan sólo 104 UI/mg. Por tanto, PEG-FVIII preparado usando un exceso de 15 M de PEG presentó aproximadamente 5,5 veces más actividad que la actividad más alta de un PEG-FVIII preparado usando protocolos convencionales (exceso de 61,8 M). De manera similar, FVIII preparado con un exceso de 20 M de PEG mostró una actividad al menos 3,8 veces mayor que FVIII preparado usando protocolos convencionales, un exceso de 25 M de moléculas de PEG-FVIII presentó una actividad al menos 3,2 veces mayor que los protocolos de preparación convencionales y un exceso de 30 M de PEG-FVIII (969 UI/ml) mostró al menos 2,4 veces más que los protocolos

de preparación convencionales (exceso de 61,8 M de PEG).

Estos resultados ilustran que las proteínas FVIII pegiladas usando una razón de exceso molar bajo de PEG con respecto a FVIII dan como resultado FVIII con bajo contenido en PEG que tiene una actividad biológica cercana a la de la proteína FVIII nativa en comparación con PEG-FVIII preparado usando un exceso molar alto de PEG, que muestra una actividad específica aproximadamente 9 veces menor que FVIII nativo. El aumento de la actividad específica y el número reducido inferior de PEG proporciona una molécula terapéutica más eficaz que tiene una posibilidad reducida de efectos secundarios tóxicos.

### 5 Ejemplo de referencia 3

#### Farmacocinética de moléculas poco pegiladas *in vivo*

15 Con el fin de determinar la farmacocinética del rFVIII poco pegilado *in vivo*, se usó un modelo de ratón con desactivación deficiente en FVIII. Se usaron ratones deficientes en FVIII tal como se describen en Bi *et al.* (Nat Genet 1995; 10:119-21) como modelo de hemofilia A humana grave.

20 Los ratones (n=6) recibieron una inyección en bolo por medio de la vena de la cola de o bien FVIII con bajo contenido en PEG preparado según el ejemplo 1 o bien rFVIII nativo en una dosis de 20-30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal. Las muestras de PEG-rFVIII usadas fueron las siguientes: rFVIIIPEGH07001FC (grado de 8,5 PEG - mol/mol, PEG unido) a 297  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; VIEHLUFB07029PHR (grado de 7,9 PEG - mol/mol, PEG unido) a 144  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; VIEHLUFB08007PHR (grado de 4,4 PEG - mol/mol, PEG unido) a 66  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Se preparó plasma con citrato mediante punción cardíaca tras la anestesia a partir de los grupos respectivos, a los 5 minutos, 3, 6, 9, 16, 24 y 32 horas, y en algunos casos a las 48, 56 y 72 horas tras la inyección. Se midieron los niveles de actividad de FVIII en muestras de plasma. Se realizó el cálculo de la semivida con MicroMath Scientist, modelo 1 a partir de la biblioteca farmacocinética (MicroMath, Saint Louis, MO, EE.UU.).

30 Los resultados de este experimento se resumen en las figuras 2 y 3 y la tabla 2. Los resultados muestran que la semivida terminal es similar para PEG-rFVIII con grados de pegilación de entre 4,4 y 8,5 (figura 3 y tabla 2). La tabla 2 ilustra que la semivida (HL) y el tiempo de residencia medio (MRT) del rFVIII poco pegilado aumentan en comparación con el FVIII nativo. Adicionalmente, el área bajo la curva (AUC) aumenta en el FVIII poco pegilado en comparación con FVIII nativo, indicando la farmacocinética mejorada de la variante de FVIII poco pegilada en comparación con rFVIII nativo. Además, la carga de proteína para lograr la dosis de actividad de FVIII deseada es menor con variantes de PEG-rFVIII con menor grado de pegilación.

35 Un gráfico de los datos de AUC, semivida y MRT frente al grado de pegilación (figura 4) muestra que hay una correlación lineal de AUC y MRT con el grado de pegilación de hasta aproximadamente 8 PEG/FVIII, y no hay ningún aumento adicional con mayores grados de pegilación. La semivida terminal aumenta ligeramente cuando el número de moléculas de PEG por FVIII es mayor de 5 PEG/FVIII.

40 En resumen, los datos sugieren que las variantes de rFVIII poco pegiladas preparadas usando un exceso de 15 M, 20 M, 25 M y 30 M de PEG, tienen propiedades *in vivo* e *in vitro* mejoradas en comparación con PEG-rFVIII preparado según el proceso convencional (exceso de 61,8 M de PEG). La actividad de la forma poco pegilada de FVIII es más similar a la de la molécula nativa que preparaciones previas de FVIII con alto contenido en PEG, lo que sugiere que pueden usarse factores sanguíneos con bajo contenido en PEG a una dosis inferior durante la terapia, reduciendo de ese modo la posibilidad de desarrollar anticuerpos neutralizantes contra el factor sanguíneo y reduciendo la toxicidad de la composición.

### 50 Ejemplo de referencia 4

#### Preparación de rFIX poco pegilado

55 Se contempla que otras proteínas de factores sanguíneos se conjuguen a polímeros solubles en agua tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se pegila FIX recombinante (rFIX) mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo NHS. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie SUNBRIGHT® ME de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). rFIX se pegila a pH 7,4 en tampón Hepes (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM) a una concentración de proteína de 2 mg/ml y una concentración de reactivo de 5 mg/ml. La reacción de pegilación se lleva a cabo a TA durante 2 horas con agitación suave. Entonces se detiene la reacción mediante la adición de glicina (concentración final: 10 mM) e incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces se aplica la mezcla a una columna de Q - Sepharose HP (GE-Healthcare, Uppsala, Suecia) para la purificación y separación de rFIX monopegilado, que contiene sólo un residuo de PEG, a partir de rFIX nativo y trazas de rFIX di y tripegilado. Finalmente, se recogen las fracciones que contienen rFIX monopegilado y se someten a ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) usando una membrana de 30 kD hecha de celulosa regenerada (Millipore).

### 65 Ejemplo de referencia 5

Preparación de rFVIIa poco pegilado

Se pegila FVIIa recombinante (rFVIIa) mediante el uso de un reactivo de pegilación de 20 kD lineal que contiene un grupo NHS. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie SUNBRIGHT® GS de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). rFVIIa se pegila a pH 7,4 en tampón Hepes (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM) a una concentración de proteína de 2 mg/ml y una concentración de reactivo de 5 mg/ml. La reacción de pegilación se lleva a cabo a TA durante 2 horas con agitación suave. Se detiene la reacción mediante la adición de glicina (concentración final: 10 mM) e incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se purifica el conjugado de PEG-rFVIIa mediante cromatografía de intercambio iónico sobre Q-Sepharose FF (GE Healthcare). Se carga la disolución sobre la columna, que se equilibra previamente con tampón Hepes 20 mM que contiene CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4 (capacidad de carga: 1,5 mg de proteína/ml de gel). Se eluye el conjugado con tampón Hepes 20 mM que contiene CaCl<sub>2</sub> 1 mM y cloruro de sodio 500 mM. El eluato contiene predominantemente rFVIIa monopegilado. Finalmente se concentra el eluato mediante UF/DF usando una membrana de 30 kD hecha de polietersulfona (Millipore).

Ejemplo 6Preparación de rFVIII poco polisialilado

Además de la pegilación, las proteínas de factores sanguíneos se conjugan con otros polímeros solubles en agua.

Se polisialiló rFVIII mediante aminación reductora usando poli(ácido siálico) (PSA) oxidado con una distribución de tamaño estrecha ( $PD \leq 1,1$ ) y un PM de 20 kD, que se obtuvo del Serum Institute de la India (Pune, India).

La conjugación de PSA con rFVIII se llevó a cabo a + 4 °C en una sala fría. Se realizó la conjugación con una concentración de rFVIII de 2 mg/ml, y con un exceso molar de 200 veces de PSA oxidado. Se disolvió el PSA en tampón Hepes (tampón Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 350 mM, pH 7,4) para dar una concentración final de 200 mg de PSA/ml. Se añadió la disolución de PSA a la disolución de rFVIII y se añadió la cantidad requerida de NaCNBH<sub>3</sub> en una disolución de 80 mg/ml en tampón Hepes, pH 7,4 para dar una concentración final de 50 mM. Se mezcló suavemente la mezcla de reacción y se ajustó el pH a 7,4 mediante adición gota a gota de NaOH 0,5 M hasta pH 7,4. Se agitó suavemente la mezcla de reacción en la oscuridad durante 16 horas a +4 °C en una sala fría. Entonces se purificó el conjugado mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) sobre fenil - Sepharose FF (GE Healthcare). Tras la reacción química, se diluyó la mezcla de reacción con NH<sub>4</sub>Ac 8 M en tampón Hepes (Hepes 50 mM, NaCl 350 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 6,9) para dar una concentración final de 2,5 M y se corrigió el pH mediante la adición de NaOH 0,5 M hasta pH 6,9. Entonces se cargó la muestra sobre la columna de HIC. Se lavó la columna con aproximadamente 2,5 volúmenes de columna (CV) de tampón de lavado (NH<sub>4</sub>Ac 2,5 M en Hepes 50 mM, NaCl 350 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 6,9) seguido por lavado con aproximadamente 10 CV de tampón de lavado (NaCl 3 M en Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM; pH 6,9). Se eluyó la columna con 6 CV de tampón de elución (Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7,4). Se sometió la fracción que contenía conjugado a UF/DF usando una membrana de 30 kD (celulosa regenerada/Millipore).

Ejemplo 7Caracterización *in vitro* e *in vivo* de rFVIII poco polisialilado

Se sometió a ensayo el conjugado de PSA-rFVIII que tenía un bajo grado de polisialilación preparado mediante aminación reductora según el ejemplo 6 para determinar la actividad proteica *in vitro* e *in vivo*.

Se caracterizó analíticamente la preparación de PSA-rFVIII midiendo el contenido en proteína (ensayo de BCA) y la actividad cromogénica de FVIII. Se calculó una actividad específica de 2469 UI/mg para esta preparación. Esto es un 44 % en comparación con el material de partida de rFVIII. Se determinó el grado de polisialilación mediante el ensayo de resorcinol (Svennerholm L, Biochim Biophys Acta 24:604-11; 1957). Se midió un grado de polisialilación de 2,1 moléculas de PSA/monómero de FVIII.

También se usó el PSA-rFVIII para estudios de farmacocinética (PK) en ratones hemofílicos. Grupos de 6 ratones hemofílicos recibieron una inyección en bolo por medio de la vena de la cola en una dosis de 200 UI de FVIII/kg de peso corporal. Se preparó plasma con citrato mediante punción cardiaca tras la anestesia a partir de los grupos respectivos, a los 5 minutos, 3, 6, 9, 16, 24, 32 horas y en algunos casos a las 42 horas tras la inyección. Se midieron los niveles de actividad de FVIII en muestras de plasma. Se realizó el cálculo de la semivida y el área bajo la curva (AUC) con MS Excel. Los resultados de este experimento se ilustran en la figura 4. Para esta curva de eliminación, se midió una AUC ajustada a la dosis de 0,054 (UI x h/ml)/(UI/kg) para FVIII y de 0,076 (UI x h/ml)/(UI/kg) para el conjugado de PSA-rFVIII. Los resultados muestran que el PSA-rFVIII circula más tiempo que rFVIII nativo y la AUC correspondiente de PSA-rFVIII aumenta en un factor de 1,4.

Ejemplo de referencia 8Preparación de rFIX poco polisialilado

FIX recombinante (rFIX) se polisialila mediante aminación reductora usando poli(ácido siálico) (PSA) oxidado con una distribución de tamaño estrecha ( $PD \leq 1,1$ ) y un PM de 20 kD, que puede obtenerse del Serum Institute de la India (Pune, India).

La conjugación de PSA con rFIX se lleva a cabo a + 4 °C en una sala fría. Se realiza la conjugación usando una concentración de rFIX de 2 mg/ml, y con un exceso molar de 160 veces de PSA oxidado. Se disuelve el PSA en tampón Hepes (tampón Hepes 50 mM,  $CaCl_2$  5 mM, NaCl 350 mM, pH 7,4) para dar una concentración final de 200 mg de PSA/ml. Se añade la disolución de PSA a la disolución de rFIX y se añade la cantidad requerida de  $NaCNBH_3$  en una disolución de 80 mg/ml en tampón Hepes, pH 7,4 para dar una concentración final de 50 mM y el pH de la disolución obtenida se ajusta mediante adición gota a gota de NaOH 0,5 M hasta pH 7,4. Se agita suavemente la mezcla de reacción en la oscuridad durante 16 horas a +4 °C en una sala fría. Posteriormente, se purifica el conjugado mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) sobre butil Sepharose FF (GE Healthcare). Tras la reacción química, se diluye la mezcla de reacción con NaCl 5 M en tampón Hepes (Hepes 50 mM,  $CaCl_2$  5 mM, pH 6,9) para dar una concentración final de 3 M y se ajusta el pH hasta pH 6,9 usando NaOH 0,5 M. Se carga la muestra sobre la columna de HIC y se lava con 10 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrio (NaCl 3,0 M en Hepes 50 mM,  $CaCl_2$  5 mM, pH 6,9). Posteriormente, se eluye el conjugado de PSA-rFIX con 6 CV de tampón de elución (Hepes 50 mM,  $CaCl_2$  5 mM, pH 7,4). Se somete la fracción que contiene conjugado a UF/DF usando una membrana de 30 kD (celulosa regenerada/Millipore). Se espera que la preparación contenga predominantemente rFIX con uno y dos grupos PSA.

#### Ejemplo de referencia 9

##### Preparación de rFVIIa poco polisialilado

Se polisialila rFVIIa mediante aminación reductora usando poli(ácido siálico) (PSA) oxidado con una distribución de tamaño estrecha ( $PD \leq 1,1$ ) y un PM de 20 kD, que puede obtenerse del Serum Institute de la India (Pune, India).

La conjugación de PSA con rFVIIa se lleva a cabo a + 4 °C en una sala fría. Se realiza la conjugación usando una concentración de rFVIIa de 2 mg/ml, y con un exceso molar de 125 veces de PSA oxidado. Se disuelve el PSA en tampón Hepes (tampón Hepes 50 mM,  $CaCl_2$  5 mM, NaCl 350 mM, pH 7,4) y se ajusta el pH a 7,4 mediante adición gota a gota de NaOH 2 M para dar una concentración final de 150 mg/ml. Se añade la disolución de PSA a la disolución de rFVIIa y se añade la cantidad requerida de  $NaCNBH_3$  en una disolución de 80 mg/ml en tampón Hepes, pH 7,4 para dar una concentración final de 50 mM. Se mezcla suavemente la mezcla de reacción y se ajusta el pH a 7,4 de nuevo. Se agita suavemente la mezcla de reacción en la oscuridad durante 16 horas. Posteriormente, se purifica el conjugado mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) sobre butil Sepharose FF (GE Healthcare). Tras la reacción química, se diluye la mezcla de reacción con NaCl 5 M en tampón Hepes (Hepes 50 mM,  $CaCl_2$  5 mM, pH 6,9) para dar una concentración final de 3 M. Se carga entonces la muestra sobre la columna de HIC y se lava con 10 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrio (NaCl 3,0 M en Hepes 50 mM,  $CaCl_2$  5 mM, pH 6,9). Posteriormente, se eluye el conjugado de PSA-rFVIIa con 10 CV de tampón de elución (Hepes 50 mM,  $CaCl_2$  5 mM, pH 7,4). Se combinan las fracciones que contienen conjugado y se someten a UF/DF usando una membrana de 30 kD (celulosa regenerada/Millipore). Finalmente, se concentra el eluato mediante UF/DF usando una membrana hecha de polietersulfona (Millipore). Se espera que la preparación contenga predominantemente rFVIIa con uno y dos grupos PSA.

#### Ejemplo 10

##### Tratamiento de trastornos de la coagulación sanguínea usando factores sanguíneos modificados con un bajo grado polímero soluble en agua

Se tratan sujetos que tienen una deficiencia en un factor de coagulación sanguínea con composiciones de factor sanguíneo modificado tal como se describe en el presente documento. La administración de factor(es) sanguíneo(s) modificado(s) que tiene(n) un bajo grado de polímero soluble en agua en modelos animales de trastornos de la coagulación sanguínea y usando protocolos conocidos en la técnica para tratar a humanos que padecen trastornos sanguíneos proporciona la base para administrar a los sujetos el/los factor(es) sanguíneo(s) modificado(s) descrito(s) en el presente documento solo(s) o en combinación con otros agentes terapéuticos, por ejemplo agentes quimioterápicos o radioterápicos, citocinas, factores de crecimiento, y otros agentes terapéuticos comúnmente usados.

Por ejemplo, se tratan pacientes con hemofilia A que tienen una deficiencia en FVIII con FVIII poco pegilado a dosis terapéuticamente eficaces, tal como determina fácilmente el médico encargado. Véase por ejemplo, Di Paola *et al.*, Haemophilia. 13:124-30, 2007, que describen la administración y comparación de dos preparaciones diferentes de FVIII de sustitución a pacientes con hemofilia grave.

También se tratan pacientes con hemofilia que pueden tener o no una deficiencia de proteína FVIII (por ejemplo, pacientes con hemofilia B o C) con otros factores sanguíneos modificados tales como VWF, FVII, FIX, FXI

modificado o los apropiados para el estado patológico. Véase, por ejemplo, Konkle *et al.*, J Thromb Haemost. 5:1904-13, 2007, que describen el tratamiento de pacientes con hemofilia que desarrollaron inhibidores contra FVIII y FIX con FVIIa purificado.

- 5 Se ha usado VWF purificado para tratar a pacientes que padecen enfermedad de Willebrand (Majumdar *et al.*, Blood Coagul Fibrinolysis. 4:1035-7, 1993). Se usa VWF modificado que tiene un bajo grado de polímero soluble en agua tal como se describe en el presente documento en regímenes conocidos por los expertos en la técnica para tratar a pacientes que se beneficiarían de VWF de sustitución.
- 10 Adicionalmente, otros trastornos de la coagulación sanguínea conocidos en la técnica, por ejemplo, deficiencia de factor X, deficiencia de factor VII, enfermedad de Alexander y deficiencia de factor XIII pueden tratarse con dosis terapéuticamente eficaces del/de los factor(es) sanguíneo(s) modificado(s) apropiado(s).
- 15 La administración de los factores sanguíneos modificados puede durar 1-24 horas, o más tiempo, y puede optimizarse usando experimentación de rutina. El factor sanguíneo modificado puede administrarse también durante una duración que no requiere tratamiento prolongado. Adicionalmente, la composición de factor sanguíneo modificado puede administrarse diariamente, semanalmente, bisemanalmente o a otras frecuencias eficaces, tal como podría determinar un experto habitual en la técnica.
- 20 Se contempla que se administre un factor sanguíneo modificado a pacientes en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como con otros agentes quimioterápicos o radioterápicos, o con factores de crecimiento o citocinas. Cuando se administra en combinación con otro agente, la cantidad de factor sanguíneo modificado puede reducirse como corresponda. Se administran segundos agentes en una cantidad determinada para que sean seguros y eficaces en la mejora de la enfermedad humana.
- 25 Se contempla que se administren citocinas o factores de crecimiento, y agentes quimioterápicos o agentes radioterápicos en la misma formulación que el factor sanguíneo modificado y se administren simultáneamente. Alternativamente, los agentes pueden administrarse también en una formulación independiente y todavía se administran simultáneamente con el factor sanguíneo modificado. Tal como se usa en el presente documento,
- 30 simultáneamente se refiere a agentes administrados en el plazo de 30 minutos uno de otro. El segundo agente puede administrarse también antes de la administración del factor sanguíneo modificado. Administración previa se refiere a la administración del agente en el plazo del intervalo de una semana antes del tratamiento con factor sanguíneo modificado hasta 30 minutos antes de la administración de factor sanguíneo modificado. Se contempla además que el segundo agente se administre posteriormente a la administración del factor sanguíneo modificado. La
- 35 administración posterior pretende describir la administración desde 30 minutos después del tratamiento con factor sanguíneo modificado hasta una semana después de la administración del factor sanguíneo modificado. También pueden administrarse composiciones de factor sanguíneo modificado conjuntamente con un régimen de radioterapia en un sujeto que tiene un trastorno de la coagulación sanguínea y una forma de cáncer, llevándose a cabo el tratamiento tal como prescribe el médico encargado.
- 40 Se espera que se les ocurran numerosas modificaciones y variaciones en la invención tal como se expone en los ejemplos ilustrativos a los expertos en la técnica. En consecuencia, la invención sólo debe estar limitada por las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Molécula de factor VIII (FVIII) modificada químicamente que comprende una molécula de FVIII recombinante y 1 ó 2 restos de poli(ácido siálico) (PSA) por molécula de FVIII, en la que los restos de PSA se unen a la molécula de FVIII a través de aminación reductora.
2. Molécula de FVIII modificada químicamente según la reivindicación 1, en la que los restos de PSA se unen por medio de un ligador liberable o hidrolizable, o por medio de un ligador estable.
- 10 3. Molécula de FVIII modificada químicamente según la reivindicación 1, en la que el peso molecular del PSA está en el intervalo de desde 2 hasta 80 kDa, preferiblemente en el intervalo de desde 5 hasta 60 kDa, más preferiblemente en el intervalo de desde 10 hasta 40 kDa o lo más preferiblemente en el intervalo de desde 15 hasta 25 kDa.
- 15 4. Composición farmacéutica que comprende la molécula de FVIII modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Molécula de FVIII modificada químicamente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece un trastorno de la coagulación sanguínea.
- 20 6. Molécula de FVIII modificada químicamente para el uso según la reivindicación 5, en la que el trastorno de la coagulación sanguínea se selecciona del grupo que consiste en hemofilia A y síndrome de von Willebrand.
- 25 7. Molécula de FVIII modificada químicamente para el uso según la reivindicación 5, en la que el trastorno de la coagulación sanguínea es hemofilia A.

FIGURA 1A

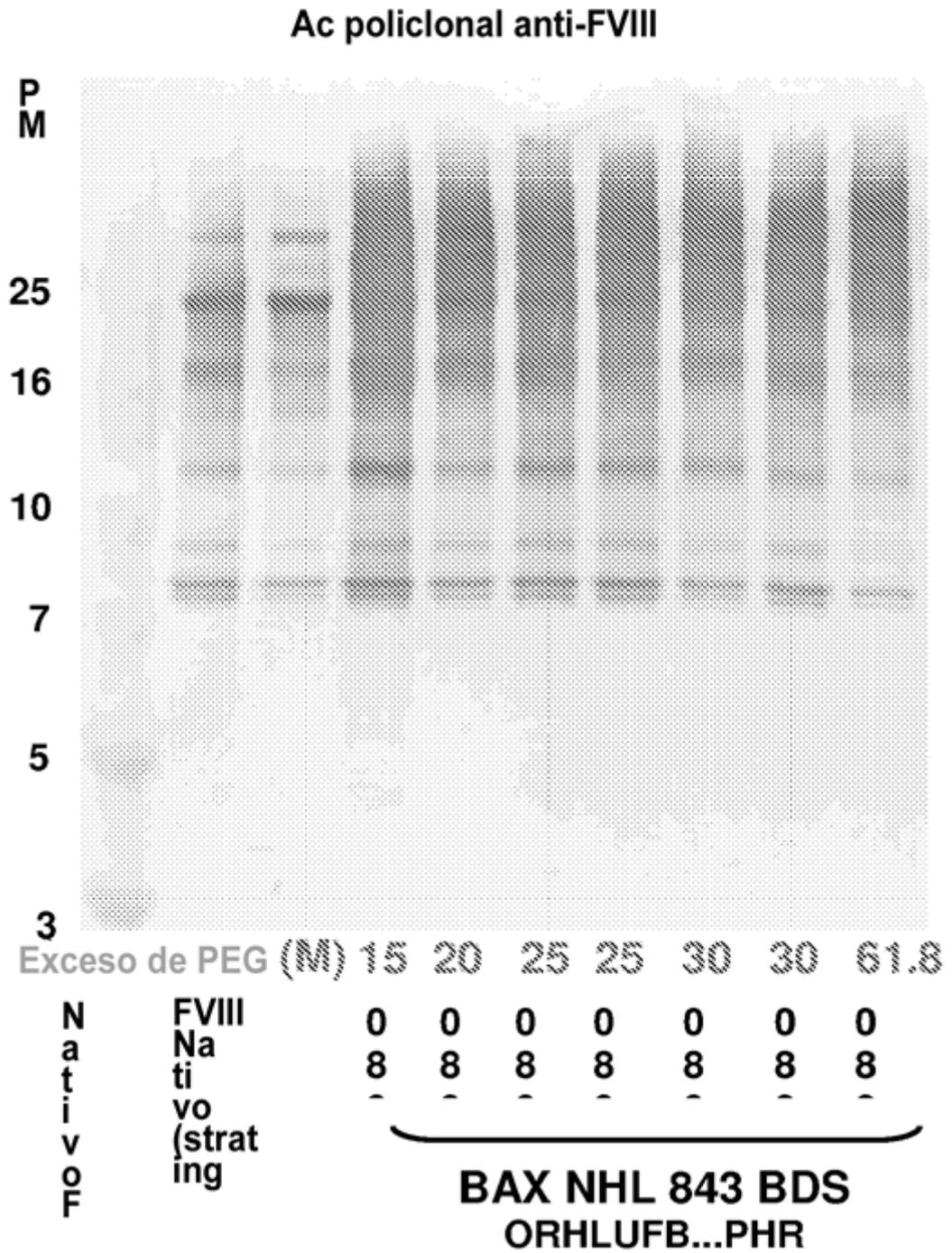


FIGURA 1B

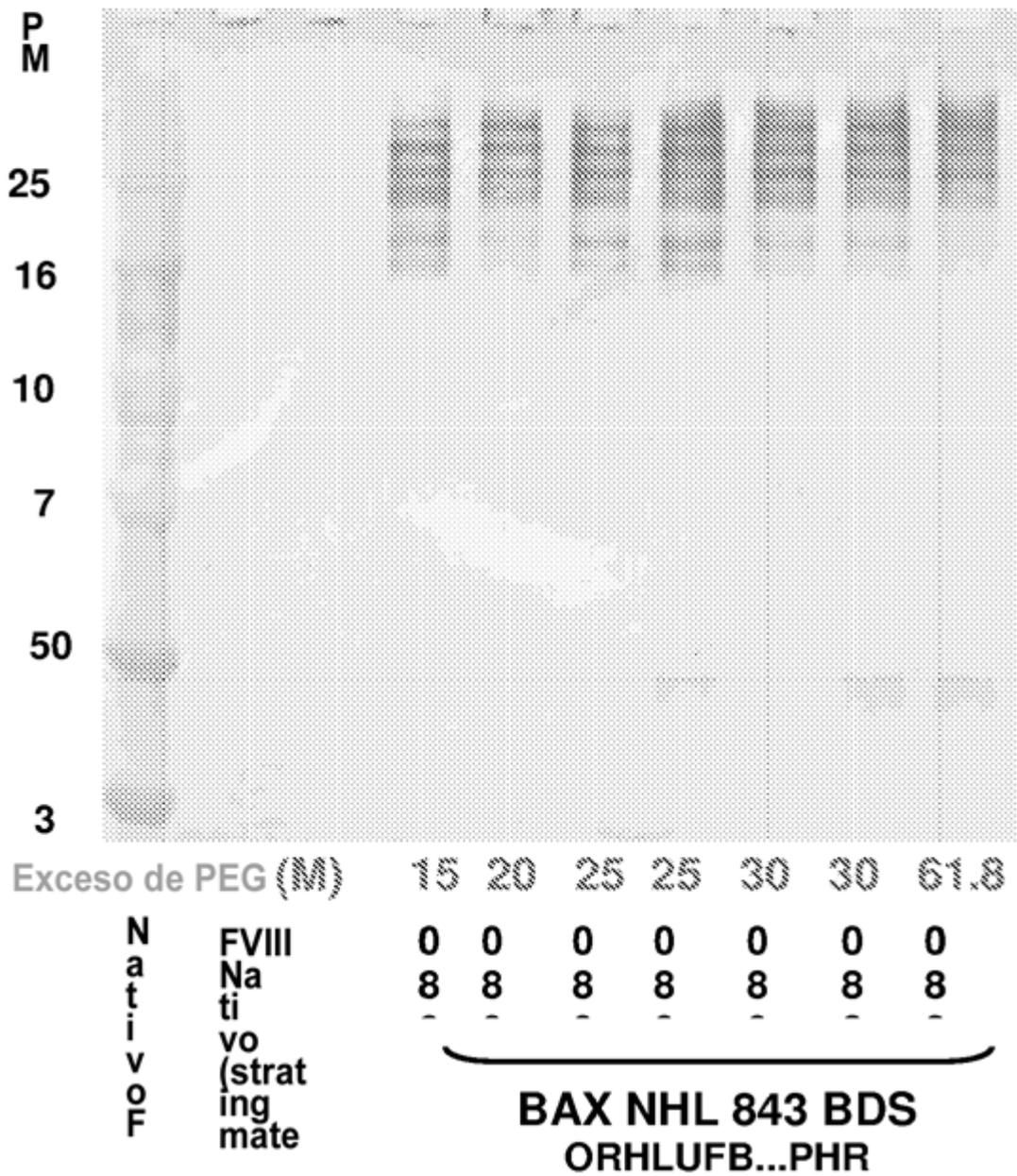


FIGURA 2

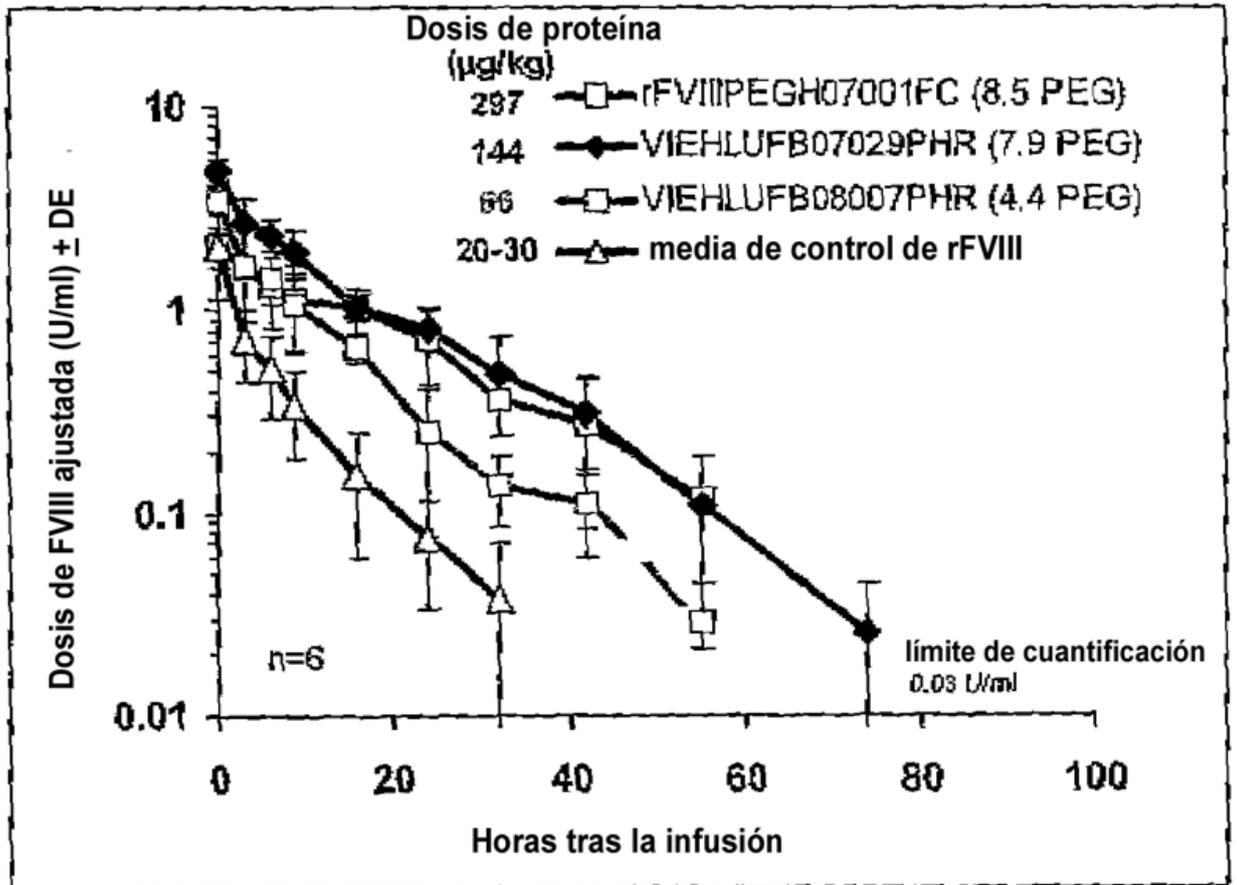


FIGURA 3

Fig. 3A

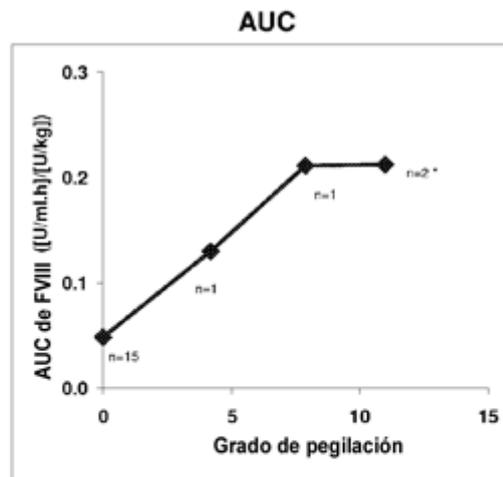


Fig. 3B

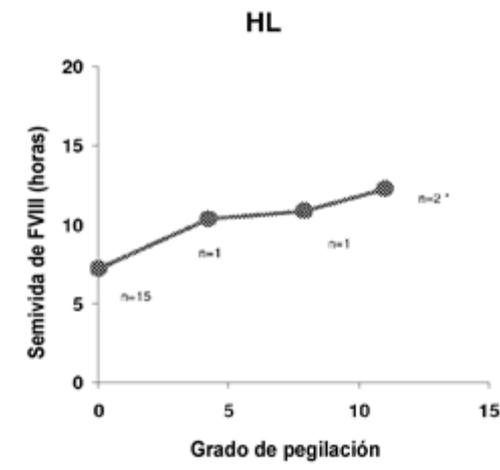


Fig. 3C

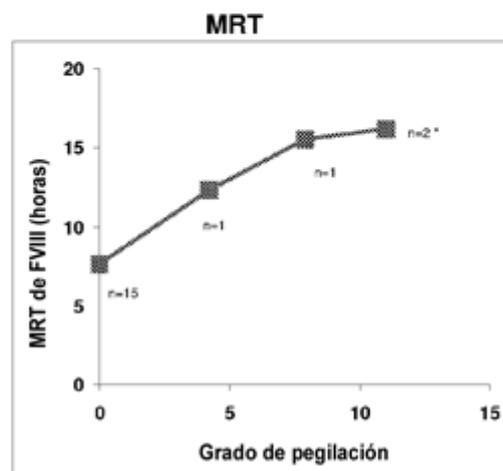


FIGURA 4

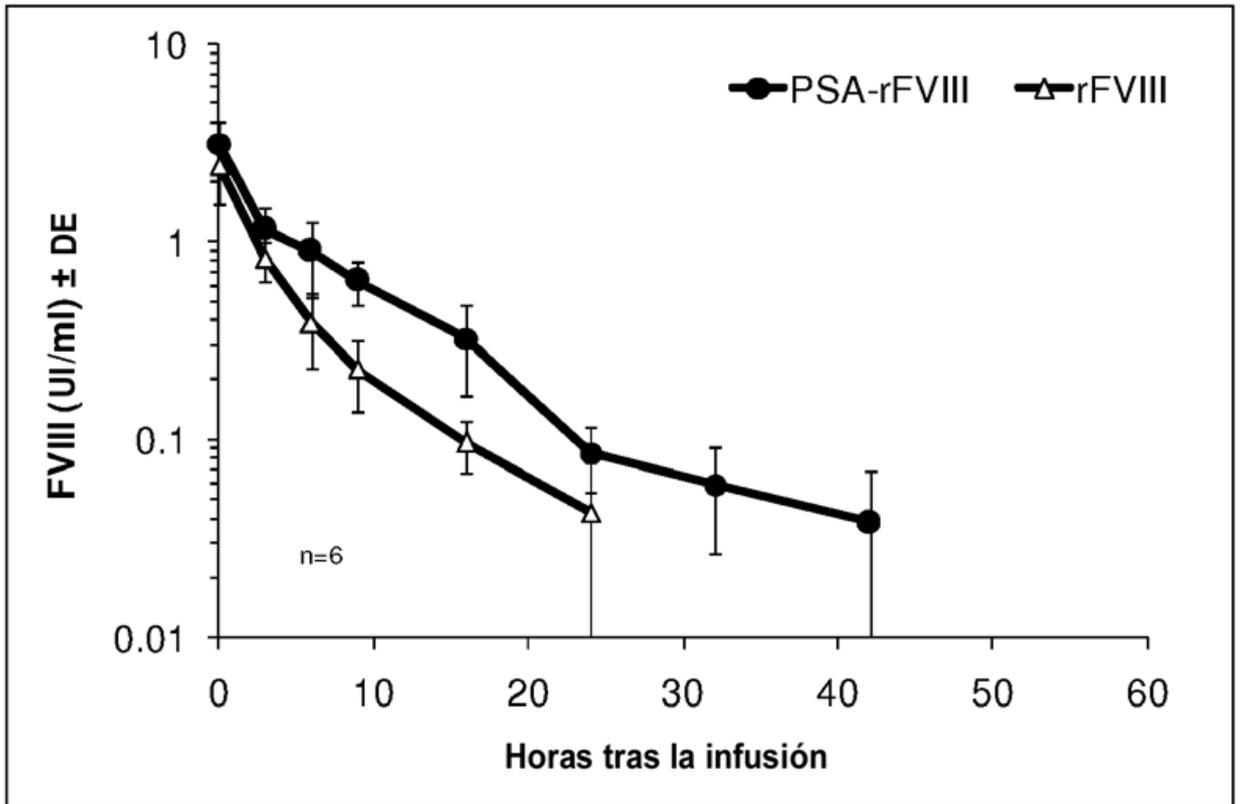


TABLA 1

Preparación	AUC ajus. a la dosis	aumento	HL (h) (IC del 95%)	aumento	MRT (h)	aumento
rFVIIIPEGH07001FC (8.5 PEG)	0.142	3.0 veces	12.6 (8.7- 18.7)	1.8 veces	19.5	2.6 veces
VIEHLUFB07029PHR (7.9 PEG)	0.211	4.4 veces	10.8 (8.0- 16.5)	1.5 veces	15.5	2.0 veces
VIEHLUFB08007PHR (4.4 PEG)	0.130	2.7 veces	10.3 (8.5- 14.1)	1.4 veces	12.3	1.6 veces
Media de rFVIII(n=15 experimentos)	0.048	=1	7.2 (3.0-53.3)	=1	7.6	=1

TABLA 2

Exceso molar de PEG	N.º de lote	Grado de PEG (mol/mol) (PEG unido)	PEG libre (%)	FVIII libre (%)	Actividad de FVIII chr específica (UI/mg)
	rFVIII nativo (material de partida para la pegilación)				3706 interv. : 3381-4147
	PHS #8007-8018) media, n=7				
15 M	VIEHLUFB08007PHR	4.4	6.8	45.4	2221
20 M	VIEHLUFB08016PHR	5.3	10.5	25.2	1525
25 M	VIEHLUFB08017PHR	6.2	12.2	22.2	1301
30 M	VIEHLUFB06008PHR	8.8	6.8	15.0	789
	VIEHLUFB08009PHR	8.6	8.7	15.6	816
	VIEHLUFB07029PHR	7.9	8.8	14.8	969
61.8 M (escala de lab.)	VIEHLUFB08018PHR	12.8	9.1	5.3	398
61.8 M (lotes preclínicos)	ORHLUFB07016PHR	19.4	9.6	4.2	116
	ORHLUFB07017PHR	10.5	15.9	<2	153
	ORHLUFB08001PHR	16.0	10.4	3.7	104
	ORHLUFB08002PHR	15.2	10.5	6.5	336