República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0708832-9 A2**

*BRPI0708832A2*

(22) Data de Depósito: 29/03/2007
**(43) Data da Publicação: 14/06/2011**
**(RPI 2110)**

***(51) Int.Cl.:***
**A61K 47/48 2006.01**
**C07K 14/755 2006.01**

(54) Título: **CONSTRUÇÃO PROTEINÁCEA**

(30) Prioridade Unionista: 31/03/2006 US 60/787968, 06/04/2006 US 60/790239, 06/04/2006 US 60/790239, 31/03/2006 US 60/787968

(73) Titular(es): Baxter Healthcare S.A, Baxter International INC

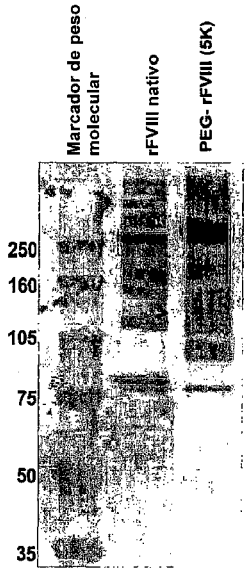
(72) Inventor(es): Herbert Gritsch, Juergen Siekamann, Katalin Varadi, Peter Turecek

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007007560 de 29/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO WO2007/126808de 08/11/2007

(57) Resumo: CONSTRUÇÃO PROTEINÁCEA. A invenção é uma construção proteinácea compreendendo uma molécula do Fator VIII tendo pelo menos uma porção do domínio B intacta, o qual é conjugado a um polímero solúvel em água, tal como o polietileno glicol com um peso molecular de mais do que 10.000 Daltons. A construção tem uma atividade biológica de pelo menos 80 % da atividade biológica do Fator VIII nativo, e a meia-vida in vivo da construção é aumentada em pelo menos 1,5 vez, em comparação com a meia-vida in vivo do fator FVIII nativo.



PI0708832-9

"CONSTRUÇÃO PROTEINÁCEA"

## CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a uma construção proteinácea compreendendo o fator VIII de coagulação (FVIII) sendo ligado a pelo menos um polímero solúvel, tal como um poli(óxido de alquileno), tal como o polietileno glicol. Além disso a presente invenção diz respeito a métodos para prolongar a meia-vida in vivo do FVIII no sangue de um mamífero que tenha um distúrbio de sangramento associado com imperfeições funcionais ou deficiências do FVIII.

## FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O fator VIII (FVIII) de coagulação circula no plasma em uma concentração muito baixa, e é ligado não covalentemente ao fator de von Willebrand (VWF). Durante a hemostasia, o FVIII é separado do VWF e atua como um cofator para a ativação do fator X (FX) mediada pelo fator IX ativado (FIXa) mediante intensificação da relação de ativação na presença de cálcio e de fosfolipídeos ou de membranas celulares.

O FVIII é sintetizado como um precursor de cadeia única de aproximadamente 270 a 330 kD com a estrutura de domínio A1-A2-B-A3-C1-C2. Quando purificado do plasma, o FVIII é composto de uma cadeia pesada (A1-A2-B) e uma cadeia leve (A3-C1-C2). A massa molecular da cadeia leve é de 80 kD, enquanto, por causa da proteólise dentro do domínio B, a cadeia pesada situa-se na faixa de 90 a 220 kD.

O FVIII é também sintetizado como uma proteína recombinante para uso terapêutico em distúrbios de sangramento. Vários ensaios in vitro foram delineados para determinar a eficácia potencial do FVIII recombinante (rFVIII) como um tratamento terapêutico. Estes ensaios imitam os efeitos in vivo do FVIII endógeno. O tratamento in vitro da trombina do FVIII resulta em um rápido aumento e subseqüente redução em sua atividade pró-coagulante, conforme medido pelo ensaio in vitro. Esta

ativação e inativação coincide com a proteólise específica limitada, tanto nas cadeias pesadas quanto nas leves, o que altera a disponibilidade de diferentes episódios de ligação no FVIII, por exemplo possibilitando que o FVIII se dissocie do VWF e se ligue a uma superfície fosfolipídica, ou alterando a capacidade de ligação a certos anticorpos monoclonais.

A ausência ou disfunção do FVIII acha-se associada com o distúrbio de sangramento mais freqüente, a hemofilia A. O tratamento de escolha para o controle da hemofilia A é a terapia de substituição com plasma derivado ou com concentrados de rFVIII. Os pacientes com hemofilia A severa com níveis de FVIII abaixo de 1 %, acham-se geralmente na terapia profilática com o objetivo de manter o FVIII acima de 1 % entre as doses, Levando-se em conta as meias-vidas médias dos vários produtos de FVIII na circulação, isto pode usualmente ser alcançado dando-se FVIII duas a três vezes por semana.

Existem muitos concentrados no mercado para o tratamento da hemofilia A. Um destes concentrados é o produto recombinante Advate®, que é produzido nas células de CHO e fabricado pela Baxter Healthcare Corporation. Nenhuma proteína ou albumina plasmática humana ou animal é adicionada no processo de cultura celular, purificação ou formulação final deste produto.

O objetivo de muitos fabricantes dos concentrados de FVIII e dos medicamentos terapêuticos de polipeptídeos, é desenvolver um produto para a próxima geração com propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas intensificadas, ao mesmo tempo em que mantenha todas as outras características do produto.

Os medicamentos polipeptídicos terapêuticos são rapidamente degradados pelas enzimas proteolíticas e neutralizados pelos anticorpos. Isto reduz sua meia-vida e o tempo de circulação, dessa forma limitando sua eficácia terapêutica. A adição de um polímero ou carboidrato solúveis a um

polipeptídeo foi observada impedir a degradação e aumentar a meia-vida dos polipeptídeos. Por exemplo, a PEGuilação dos medicamentos de polipeptídeos protege-os e melhora seus perfis farmacodinâmicos e farmacocinéticos (Harris, J. M. e Chess, R. B., Nat. Rev. Drug Discov. 2003; 2: 214-221). O processo de PEGuilação liga unidades de repetição do polietileno glicol (PEG) a um medicamento polipeptídico. A PEGuilação das moléculas pode levar a uma resistência aumentada dos medicamentos à degradação enzimática, à meia-vida in vivo aumentada, à freqüência de dosagem reduzida, à imunogenicidade decrescida, à estabilidade física e térmica aumentada, à solubilidade aumentada, à estabilidade líquida aumentada, e à agregação reduzida.

Assim sendo, a adição de um polímero solúvel, tal como através da PEGuilação, é uma abordagem para melhorar as propriedades de um produto de FVIII. O estado da técnica é documentado por diferentes patentes e pedidos de patentes:

A U.S. 6037452 descreve um conjugado de poli(óxido de alquileno-FVIII ou FIX, em que a proteína seja covalentemente ligada a um poli(óxido de alquileno) através de grupos carbonila do referido FVIII.

A EP 1258497 B1 descreve um método para preparar conjugados de FVIII e um polímero biocompatível. Esta patente foi suplementada por uma publicação de Röstin et al. (Bioconj. Chem. 2000; 11: 387-396). Os conjugados compreendem um FVIII recombinante deletado de domínio B, modificado com o polietileno glicol monometóxi. O conjugado tinha função de FVIII reduzida e a atividade coagulante rapidamente reduzida com o grau de modificação.

A WO 04075923A3 descreve o conjugado molecular de polímero-FVIII compreendendo uma pluralidade de conjugados em que cada conjugado tem um a três polímeros solúveis em água covalentemente ligados a uma molécula de FVIII. A molécula de FVIII é deletada de domínio B.

A U.S. 4970300 descreve um FVIII modificado, em que um conjugado infusível contendo uma proteína tendo atividade de FVIII, foi covalentemente ligado a um ligando não antigênico.

A U.S. 6048720 descreve conjugados de um polipeptídeo e um polímero biocompatível.

A WO 94/15625 descreve o FVIII ligado a polietileno glicol tendo um peso molecular preferido de não mais do que 5.000 Daltons.

Permanece uma necessidade de um FVIII tendo um polímero solúvel ligado para prolongar a meia-vida do FVIII in vivo, por exemplo um FVIII PEGuilado, tal como o FVIII de comprimento completo tendo PEG maior do que 10.000 Daltons a ele conjugado, o qual retenha a atividade funcional enquanto proporciona uma meia-vida in vivo prolongada, em comparação com o FVIII não PEGuilado.

**FIGURAS**

A Figura 1 mostra a ampliação e o aumento de massa do rFVIII após a conjugação com PEG medido por SDS-PAGE com o subseqüente imunomanchamento.

A Figura 2 mostra as farmacocinéticas do conjugado de PEG-rFVIII em comparação com o FVIII não conjugado em camundongos hemofílicos. Quadrados abertos: PEGrFVIII, dose 200 IU de FVIII/kg. Losangos fechados: rFVIII nativo, dose 200 IU de FVIII/kg.

A Figura 3 mostra a análise detalhada dos sítios de PEGuilação por SDS-PAGE, com o uso de vários anticorpos anti-FVIII.

A Figura 4 mostra a ativação e a inativação induzidas pela trombina, do rFVIII nativo e PEGuilado.

A Figura 5 mostra as faixas demonstrando os domínios do rFVIII nativo e PEGuilado.

A Figura 6 mostra a extensão da PEGuilação de vários domínios do rFVIII nativo e PEGuilado.

A Figura 7 mostra a relação de inativação da trombina do rFVIII nativo e PEGuilado.

**DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A invenção é uma construção proteinácea compreendendo uma molécula de FVIII tendo pelo menos uma porção do domínio B intacta, ligada a um polímero solúvel em água, o qual é um óxido de polialquileno, uma polivinil pirrolidona, um álcool polivinílico, polioxazolina, uma poli-acriloilmorfolina ou um carboidrato, tal como um ácido polissiálico (PSA). Em uma forma de realização da invenção, o polímero solúvel em água é uma molécula de polietileno glicol tendo um peso molecular de mais do que 10.000 Daltons. A construção retém a atividade funcional completa dos produtos de FVIII terapêuticos padrão, e proporciona uma meia-vida in vivo prolongada, em comparação com os produtos de FVIII terapêuticos padrão.

O material de partida da presente invenção é o FVIII, o qual pode ser originado do plasma humano, ou produzido por técnicas de engenharia recombinante, como descrito nas patentes U.S. 4.757.006; U.S. 5.733.873; U.S. 5.198.349; U.S. 5.250.421; U.S. 5.919.766; EP 306 968.

No presente, os termos "Fator VIII" ou "FVIII" referem-se a qualquer molécula de FVIII que tenha pelo menos uma porção do domínio B intacto, e que apresente atividade biológica que esteja associada com o FVIII nativo. Em uma forma de realização da invenção, a molécula de FVIII é o Fator VIII de comprimento completo. A molécula de FVIII é uma proteína que é codificada pelas seqüências de DNA capazes de hibridizar ao DNA codificando o Fator VIII:C. Uma tal proteína pode conter deleções de aminoácidos em vários sítios entre ou dentro dos domínios A1-A2-B-A3-C1-C2 (U.S. 4.868.112). A molécula do FVIII pode também ser análoga do FVIII nativo, em que um ou mais resíduos de aminoácidos tenham sido substituídos mediante a mutagênese dirigida ao sítio.

Por exemplo, uma molécula de FVIII pode ser PEGuilada por

uma variedade de métodos químicos (Roberts, J. M. et al., Advan. Drug Delivery Rev. 2002; 54: 459-476). Por exemplo, o FVIII pode ser PEGuilado pela combinação do PEG com grupos SH livres usando-se a química da maleimida ou o acoplamento das hidrazidas de PEG ou das aminas de PEG aos componentes de carboidrato do FVIII após a oxidação anterior.

Em uma forma de realização da invenção, o FVIII foi modificado através de resíduos de lisina mediante o uso de derivados de polietileno glicol contendo um éster ativo de N-hidroxissuccinimida (NHS), tal como o succinato de succinimidila, o glutarato de succinimidila ou o propionato de succinimidila. Estes derivados reagem com os resíduos de lisina do FVIII sob condições brandas mediante a formação de uma ligação amida estável. Em uma forma de realização da invenção, o comprimento da cadeia do derivado de PEG é de 5.000 Da. Outros derivados de PEG com comprimentos de cadeia de 500 a 2.000 Da, 2.000 a 5.000 Da, maiores do que 5.000 até 10.000 Da ou maiores do que 10.000 até 20.000 Da, ou maiores do que 20.000 até 150.000 Da, podem ser usados, incluindo as estruturas lineares e ramificadas.

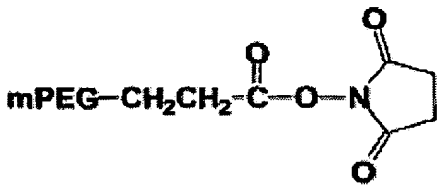
Métodos alternativos para a PEGuilação dos grupos amino são a combinação química com carbonatos de PEG, mediante a formação de ligações de uretano, ou a reação com aldeídos ou cetonas mediante a aminação redutiva formando ligações de amida secundárias.

Na presente invenção, uma molécula de FVIII é quimicamente modificada com o uso de derivados de PEG que são comercialmente disponíveis. Estes derivados de PEG podem ter uma estrutura linear ou ramificada. Exemplos de derivados de PEG contendo grupos de NHS são listados abaixo.

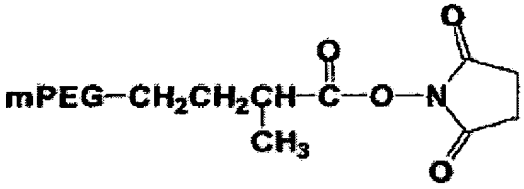
Os seguintes derivados de PEG são exemplos daqueles comercialmente disponíveis da Nektar Therapeutics (Huntsville, Al; ver www.nektar.com/PEG reagent catalog; Nektar Advanced PEGylation, lista de

preços de 2005-2006):

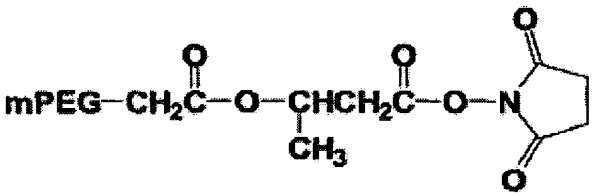
Propionato de mPEG-succinimidila (mPEG-SPA)



a-metilbutanoato de mPEG-succinimidila (mPEG-SMB)

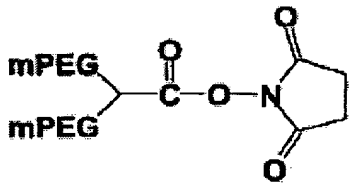


mPEG-CM-HBA-NHS (CM = carboximetila; HBA = Ácido Hidróxi butírico)



Estrutura de um derivado de PEG ramificado (Nektar Therapeutics):

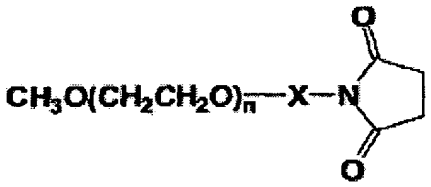
N-hidroxissuccinimida de PEG ramificado (mPEG2-NHS)



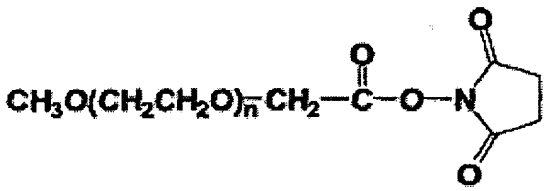
Este reagente com estrutura ramificada é descrito em mais detalhes por Kozlowski et al. (BioDrugs 2001; 5: 419-429).

Outros exemplos de derivados de PEG acham-se comercialmente disponíveis da NOF Corporation (Tóquio, Japão; ver www.nof.co.jp/english: Catálogo 2005)

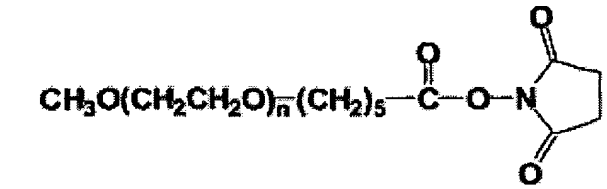
Estrutura Geral dos derivados de PEG linear (NOF Corp.):



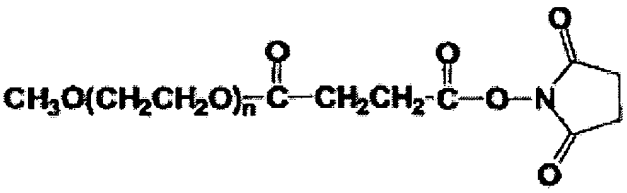
X = carboximetila



X = carboxipentila

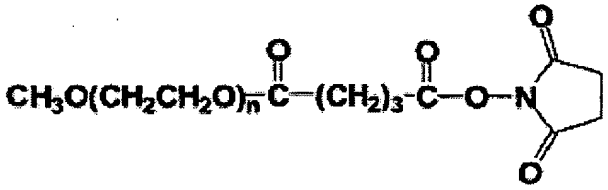


X = succinato



succinato de succinimidila de mPEG

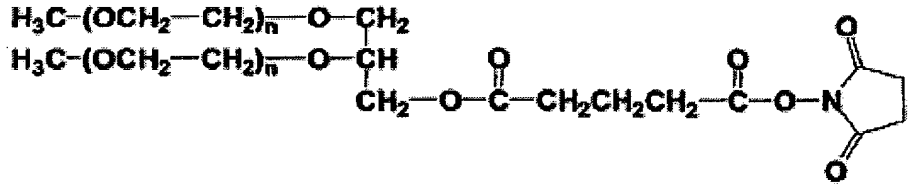
X = glutarato



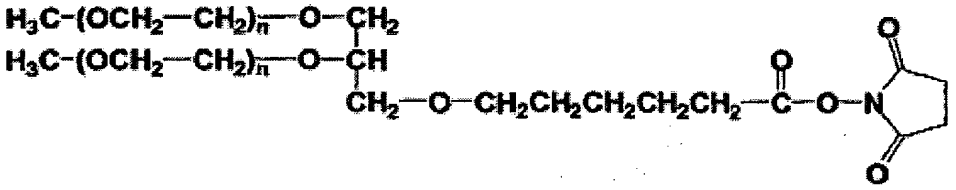
glutarato de succinimidila de mPEG

Estruturas de derivados de PEG ramificado (NOF Corp.):

2,3-bis(metilpolioxietileno-óxi)-1-(1,5-dioxo-5-succinimidilóxi-pentilóxi)-propano



2,3-bis(metilpolioxietileno-óxi)-1-(succinimidil carboxipentilóxi)propano



Estes derivados de propano mostram uma estrutura de glicerol com um padrão de substituição de 1,2. Na presente invenção, os derivados de PEG ramificados com base nas estruturas de glicerol com substituição de 1,3 ou outras estruturas ramificadas descritas na U.S. 2003/0143596A1, também podem ser usados.

Os derivados de PEG com degradável (por exemplo, ligadores hidrolisáveis) como descrito por Tsubery et al. (J. Biol. Chem. 2004; 279: 38118-38124) e Shechter et al. (WO 04089280 A3) podem também ser usados na presente invenção.

Surpreendentemente, o FVIII PEGuilado desta invenção apresenta atividade funcional completa, combinada com uma meia-vida in vivo do FVIII prolongada. Além disso, o rFVIII PEGuilado parece ser mais resistente contra a inativação da trombina. Isto foi mostrado por uma variedade de métodos in vitro e in vivo, e é ilustrado pelos seguintes exemplos.

**EXEMPLOS**

**EXEMPLO 1**

PEGUILAÇÃO DOS RESÍDUOS DE LISINA NO rFVIII COM SUCCINATO DE SUCCINIMIDILA DE mPEG

Uma solução de uma massa de rFVIII derivada do processo de

fabricação Advate (3.400 U/ml) foi filtrada em gel mediante o uso de colunas Econo-Pac 10DG (Bio-Rad) com o uso de tampão de Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, contendo 0,5 % de sacarose e 0,1 % de Polissorbato 80. Depois, succinato de succinimidila de mPEG (Abuchowski et al. Cancer Biochim. Biophys. 1984; 7: 175-186) com um comprimento de cadeia de 5.000 Da (PEG-SS 5000) foi adicionado a esta solução sob agitação suave (5 mg de PEG-SS / mg de proteína) e o valor do pH foi ajustado em 7,4 pela adição em gotas de NaOH 0,5 M. Depois a PEGuilação foi realizada sob agitação suave por 1 hora na temperatura ambiente.

Subseqüentemente, a mistura de reação foi aplicada sobre uma resina de cromatografia de troca de íons equilibrada (Fractogel EMD TMAE 650M / coluna XK-10 da Pharmacia, altura do leito: 15,0 cm) em tampão de Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, contendo 0,5 % de sacarose e 0,1 % de Polissorbato 80. Depois, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio de 20 CV para remover o reagente em excesso, e o rFVIII PEGuilado foi eluído com tampão de eluição (Hepes 20 mM, NaCl 1,0 M, 0,5 % de sacarose, 0,1 % de Polissorbato 80 pH 7,4). O eluído foi concentrado mediante ultrafiltração/diafiltração com uma membrana consistindo em celulose regenerada e com um corte de peso molecular de 30 kD, usando um sistema de tampão consistindo em Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5 % de sacarose, pH 7,4.

**EXEMPLO 2**

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO rFVIII PEGUILADO IN VITRO

O RFVIII derivado do processo de fabricação Advate foi PEGuilado de acordo com o Exemplo 1 e o produto de FVIII PEGuilado foi bioquimicamente caracterizado. A atividade funcional do PEG-rFVIII foi determinada pelo uso do ensaio cromogênico de FVIII [Rosen, S., Scand, J. Haematol. 1984; 33 (Supl. 40): 139-145). O método baseia-se no Assay of Blood Coagulation Factor VIII 5ª edição da Farmacopéia Européia (5.05)

2.7.4.

Uma amostra contendo o fator VIII (FVIII:C) é misturada com trombina, fator IX ativado (FIXa), fosfolipídeos e fator X (FX) em um tampão contendo cálcio. O FVIII é ativado pela trombina e subseqüentemente forma um complexo com os fosfolipídeos, FIXa e íons de cálcio. Este complexo ativa o fator X no fator Xa, o qual por sua vez cliva o substrato cromogênico FXa-1 (AcOH*CH3OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA). O decurso de tempo da para-nitroanilina (pNA) liberada é medido com uma leitora de microplacas em 405 nm. O declive da reação é proporcional à concentração do fator VIII na amostra. O valor do antígeno de FVIII foi medido pelo uso de um sistema de ELISA comercialmente disponível (Cedarlane, Hornby, Ontário, Canadá) com modificações de menor importância. Destes valores, as relações de cromogênio de FVIII/antígeno de FVIII foram calculadas. O conteúdo de proteínas nas preparações foi determinado pela medição da densidade óptica em 280 nm. Destes dados, o conteúdo de proteína foi calculado (Hoyer, L. W. em: Human Protein Data. Installments 1-6; Heberli Ed.; Wiley VCH, Weinheim, Alemanha, 1998) e expresso em mg/ml.

TABELA 1

| | rFVIII nativo | PEG-rFVIII PEG-SS 5K (5 mg por mg de proteína) |
|---|---|---|
| Atividade de FVIII:Chr [U/ml] | 3.430 | 64 |
| FVIII:Ag (U/ml) | 4.067 | 81 |
| Relação de FVIII:Chr/FVIII:Ag | 0,84 | 0,79 |
| Recuperação da atividade biológica (%) | 100 | 94 |

Os dados da Tabela 1 mostram que, na preparação do rFVIII PEGuilado, a atividade biológica (expressa pela relação da atividade cromogênica do FVIII para o antígeno de FVIII) é recuperada em mais do que 90 % em comparação com a atividade biológica do rFVIII nativo (100 %).

**EXEMPLO 3**

CARACTERIZAÇÃO DO rFVIII PEGUILADO MEDIANTE SDS-PAGE E TÉCNICAS DE IMUNOMANCHAMENTO

O rFVIII nativo foi caracterizado por SDS-PAGE sob condições de redução pelo uso de um gel de gradiente de 4 a 12 % de poliacrilamida obtido da Invitrogen (Carlsbad, Califórnia, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Como marcadores de peso molecular (MW), os marcadores Precision Plus (10 kD a 250 kD) obtidos da Bio-Rad (Hercules, CA, USA) foram usados. Depois, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PCDF obtida da Bio-Rad (Hercules, CA, USA) mediante eletromanchamento e, subseqüentemente, incubadas com um anticorpo de FVIII:C policlonal anti-humano de carneiro obtido da Cedarlane (Hornby, Ontário, Canadá). As últimas etapas do procedimento de imunomanchamento foram a incubação com um anticorpo anticarneiro conjugado à fosfatase alcalina (ALP) obtido da Accurate (Westbury, NY, USA), seguida pela visualização final mediante o uso de um kit de substrato de ALP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Os resultados acham-se resumidos na Figura 1. A mancha demonstra a estrutura do domínio do rFVIII nativo e PEGuilado. É mostrado que o rFVIII PEGuilado tem faixas mais amplas e massas moleculares elevadas do que a proteína recombinante nativa.

**EXEMPLO 4**

FARMACOCINÉTICA DO rFVIII PEGUILADO EM UM MODELO DE CAMUNDONGO SILENCIADO DEFICIENTE DE FVIII

Camundongos deficientes de FVIII descritos em detalhes por Bi et al. (Nat. Genet. 1995; 10: 119-121) foram usados como um modelo de hemofilia A humana severa. Grupos de 5 camundongos receberam uma injeção de bolo (10 ml/kg) através da veia da cauda, ou com PEG-rFVIII (PEG-SS, 5K) preparado de acordo com o Exemplo 1, ou com rFVIII nativo em uma dose de 200 IU de FVIII/kg de peso corporal. Plasma citratado, mediante punção do coração após anestesia, foi preparado dos grupos respectivos, em 5 minutos, 3, 6, 9 e 24 horas após a injeção. Os níveis de atividade do FVIII foram medidos nas amostras de plasma. Os resultados

desta experiência são resumidos na Figura 2. A meia-vida média aumentou de 1,9 hora (para o rFVIII nativo) para 4,9 horas (para o rFVIII PEGuilado), a área sob a curva (AUC) aumentou de 13,0 para 25,2 horas*IU/ml. O cálculo da meia-vida foi realizado com MicroMath Scientist, modelo 1, da biblioteca de farmacocinética (MicroMath, Saint Louis, MO, USA).

**EXEMPLO 5**

ANÁLISE DETALHADA DA PEGUILAÇÃO DO rFVIII PELAS TÉCNICAS DE SDS-PAGE E IMUNOMANCHAMENTO

rFVIII nativo e PEGuilado foram digeridos com trombina 1 nM por 60 minutos em 60 °C, o que resultou na clivagem específica da molécula de FVIII com produtos de degradação bem definidos. Estes fragmentos de cadeia pesada e leve foram separados por SDS-PAGE, seguido por eletromanchamento, como descrito no Exemplo 3. Para visualizar os fragmentos clivados, um anticorpo policlonal e anticorpos monoclonais contra os domínios A1 e A2 de cadeia pesada, o domínio B e o domínio A3 N-terminal de cadeia leve foram aplicados.

Como observado na Figura 3, todos os domínios foram PEGuilados, não obstante em uma extensão diferente. O domínio B foi intensamente PEGuilado. Ambos os domínios, A1 e A2, da cadeia pesada, foram parcialmente PEGuilados. Vários graus de PEGuilação (mono-, di-, tri- ...) puderam ser observados no domínio A3 de cadeia leve. De acordo com o Exemplo 6, o FVIII PEGuilado pareceu ser mais resistente à trombina.

**EXEMPLO 6**

RESISTÊNCIA À TROMBINA DO rFVIII PEGUILADO

O tratamento da trombina in vitro do FVIII resulta em um rápido aumento e subseqüente redução na sua atividade pró-coagulante. A relação de ativação e de inativação, que depende da concentração da trombina e da integridade do FVIII, foi monitorado por um ensaio do cofator de FIXa, como segue:

O FVIII foi incubado em 37 °C com trombina a 0,5 ou 1 nM. Sub-amostras foram retiradas em intervalos de tempo entre 0,5 a 40 minutos e adicionadas a uma mistura de FIXa, FX, vesículas de PL e $CaCl_2$ também contendo um inibidor de trombina específico para interromper as outras reações mediadas pela trombina, e incubadas por 3 minutos. Uma sub-amostra foi adicionada a um substrato cromogênico, o qual foi seletivamente clivado por Fxa e continha EDTA para interromper outra ativação Xa; Após uma incubação de 15 minutos, a reação foi encerrada por ácido acético. Os valores da absorbância (A405), que são proporcionais às concentrações de Fxa, foram medidos em uma leitora de ELISA e transformados nas concentrações de Fxa com o uso de uma curva de referência de Fxa purificado. As concentrações de Fxa geradas foram traçadas em gráfico em relação ao tempo de incubação com trombina.

A relação de inativação de pseudoprimeira ordem do FVIII foi determinada pelo ajuste da parte de declínio das curvas com um único ajuste exponencial.

TABELA 2

| | Relação de inativação de primeira ordem k' (1/min) | | k' relativo |
|---|---|---|---|
| Trombina | FVIII nativo | PEG-FVIII | PEG/nativo |
| 0,5 nM | 0,14 | 0,08 | 0,57 |
| 1 nM | 0,24 | 0,14 | 0,58 |

Como mostrado na Figura 4 e na Tabela 2, o rFVIII PEGuilado apresentou uma menor relação de inativação em ambas as concentrações de trombina aplicadas.

**EXEMPLO 7**

PEGUILAÇÃO DOS RESÍDUOS DE LISINA EM rFViii COM 2,3-BIS-(METIL-POLIOXOETILENO-ÓXI)-1-(1,5-DIOXO-5-SUCCINIMIDILÓXI, PENTILÓXI)PROPANO

Uma solução de rFVIII em tampão de Hepes 20 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM, 0,5 % de sacarose e 0,1 % de Polissorbato 80, foi

preparada de material em massa derivado do processo de fabricação Advate contendo 489 IU de FVIII/ml. Um reagente de glutarato de succinimidila de PEG (PEG-SG) ramificado [2,3-bis(metilpolioxietileno-óxi)-1-(1,5-dioxo-5-succinimidilóxi, pentilóxi)propano] obtido da NOF Corporation (Tóquio, Japão), com um peso molecular de 20 kD, foi adicionado a 153 ml desta solução sob agitação suave (5 mg de reagente/mg de proteína), e o valor do pH foi ajustado em 7,4 pela adição em gotas de NaOH 0,5 M após 10 minutos. Depois, a PEGuilação do rFVIII foi realizada sob agitação suave por 1 hora na temperatura ambiente.

Subseqüentemente, a mistura de reação foi aplicada sobre uma resina de cromatografia de troca de íons equilibrada (coluna de Fractogel EMD TMAE 650M / Pharmacia XK-50, altura do leito: 14,5 cm) em tampão Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, contendo 0,5 % de sacarose e 0,1 % de Polissorbato 80, com o uso de uma vazão linear de 1 cm/minuto. A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio de 25 CV para remover o reagente excedente (vazão linear: 2 cm/minuto) e o rFVIII peguilado foi eluído com tampão de eluição (Hepes 20 mM, NaCl 1,0 M, 0,5 % de sacarose, 0,1 % de Polissorbato 80, pH 7,4) em uma vazão linear de 0,5 cm/minuto. Depois o eluído foi concentrado por ultrafiltração/diafiltração com uma membrana consistindo em celulose regenerada e com um corte de peso molecular de 30 kD com o uso de um sistema de tampão consistindo em Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5 % de sacarose, pH 7,4.

**EXEMPLO 8**

CARACTERIZAÇÃO IN VITRO DO rFVIII PEGUILADO COM 20 kD DE PEG-SG RAMIFICADO

O RFVIII derivado do processo de fabricação Advate foi PEGuilado através de resíduos de lisina com o uso de um reagente de PEG-SG ramificado de acordo com o Exemplo 7, e o produto de rFVIII PEGuilado foi bioquimicamente caracterizado como descrito no Exemplo 2.

**TABELA 3**

| | RFVIII nativo | PEG-rFVIII PEG-SG 20K (5 mg por mg de proteína) |
|---|---|---|
| Atividade de FVIII:Chr [U/ml] | 9.950 | 1,040 |
| FVIII:Ag [U/ml] | 20.807 | 1.763 |
| Razão FVIII:Chr/FVIII:Ag | 0,48 | 0,59 |
| Recuperação de atividade biológica (%) | 100 | 120 |

Os dados da Tabela 3 mostram que, na preparação do rFVIII PEGuilado, a atividade biológica (expressa pela relação da atividade cromogênica do FVIII para o antígeno de FVIII) recuperou-se completamente em comparação com a atividade biológica do rFVIII nativo (100 %).

O rFVIII PEGuilado foi caracterizado por SDS-PAGE e técnicas de imunomanchamento sob condições de redução pelo uso de um gel de gradiente de 4 a 12 % de poliacrilamida como descrito no Exemplo 3. Os resultados acham-se resumidos na Figura 5. A mancha demonstra a estrutura do domínio do rFVIII nativo e PEGuilado. É mostrado que o rFVIII PEGuilado tem faixas mais amplas e massas moleculares elevadas do que a proteína recombinante nativa.

Para uma análise mais detalhada da PEGuilação da preparação de rFVIII por SDS-PAGE e técnicas de imunomanchamento, os rFVIII nativo e PEGuilado foram digeridos com trombina 1 nM por 60 minutos em 60 °C, o que resultou na clivagem específica da molécula de FVIII com produtos de degradação bem definidos, como descrito no Exemplo 5. Os fragmentos foram separados por SDS-PAGE, seguido por eletromanchamento, e visualizados por diferentes anticorpos anti-FVIII. Como observado na Figura 6, todos os domínios foram PEGuilados, embora em uma extensão diferente. O domínio B foi intensamente PEGuilado. Vários graus de PEGuilação (mono-, di-, tri-PEGuilação) puderam ser observados no domínio A3 de cadeia leve. Os resultados indicam que o rFVIII PEGuilado pareceu ser mais resistente à trombina.

A relação de ativação e de inativação pela trombina foi

monitorado por um ensaio do cofator FIXa como descrito no Exemplo 6. A relação de inativação de pseudoprimeira ordem do FVIII foi determinado pelo ajuste da parte de declínio das curvas com um ajuste exponencial único.

TABELA 4

| | Relação de inativação de primeira ordem k' (1/min) | | k' relativo |
|---|---|---|---|
| Trombina | FVIII nativo | PEG-FVIII | PEG/nativo |
| 0,5 nM | 0,13 | 0,09 | 0,67 |
| 1 nM | 0,21 | 0,15 | 0,71 |

Como mostrado na Figura 7 e na Tabela 4, o rFVIII PEGuilado apresentou uma menor relação de inativação em ambas as concentrações de trombina aplicadas.

# REIVINDICAÇÕES

1. Construção proteinácea, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) uma molécula do Fator VIII tendo pelo menos uma porção do domínio B intacta; e

(b) pelo menos uma molécula de polietileno glicol ligada à referida molécula de Fator VIII, referida molécula de polietileno glicol tendo um peso molecular mais elevado do que 10.000 Daltons;

referida construção tendo uma atividade biológica de pelo menos 80 % da atividade biológica do Fator VIII nativo, em que as atividades biológicas da construção e do Fator VIII nativo são determinadas pelas relações da atividade cromogênica para o valor do antígeno do FVIII (FVIII:Chr/FVIII:Ag), e em que a meia-vida in vivo da referida construção é aumentada em pelo menos 1,5 vez, em comparação com a meia-vida in vivo do Fator VIII nativo.

2. Construção proteinácea de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que tem uma atividade biológica de pelo menos 90 % da atividade biológica do Fator VIII nativo.

3. Construção proteinácea de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida molécula do Fator VIII é um Fator VIII recombinante.

4. Construção proteinácea de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida molécula do Fator VIII é o Fator VIII de comprimento completo.

5. Construção proteinácea de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de polietileno glicol tem um peso molecular de mais do que 10.000 Da até cerca de 125.000 Da.

6. Construção proteinácea de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de polietileno glicol tem

um peso molecular de cerca de 15.000 a cerca de 20.000 Da.

7. Construção proteinácea de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de polietileno glicol tem um peso molecular de cerca de 18.000 a cerca de 25.000 Da.

8. Construção proteinácea de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de polietileno glicol tem um peso molecular de cerca de 20.000 Da.

9. Construção proteinácea de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de polietileno glicol tem um peso molecular de cerca de 20.000 a cerca de 150.000 Da.

10. Construção proteinácea de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de polietileno glicol tem uma estrutura linear ou ramificada.

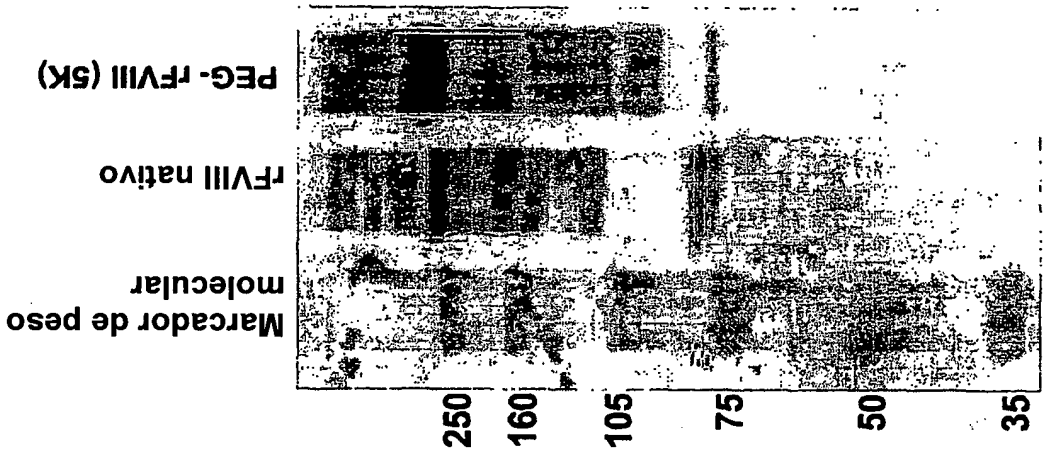

Marcador de peso molecular
rFVIII nativo
PEG- rFVIII (5K)
250
160
105
75
50
35

Figura 1

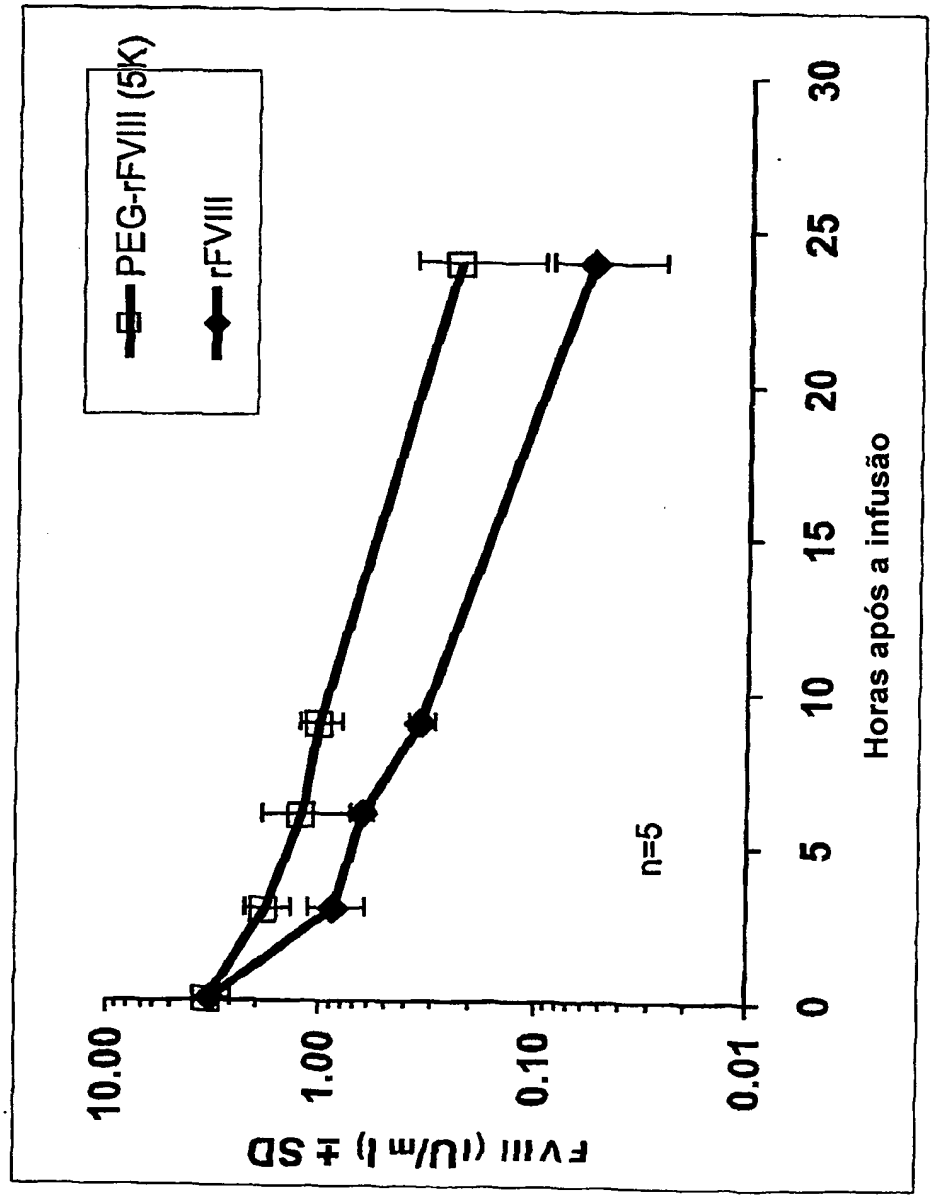

PEG-rFVIII (5K)
rFVIII
FVIII (IU/ml) ± SD
10.00
1.00
0.10
0.01
n=5
0
5
10
15
20
25
30
Horas após a infusão

Figura 2

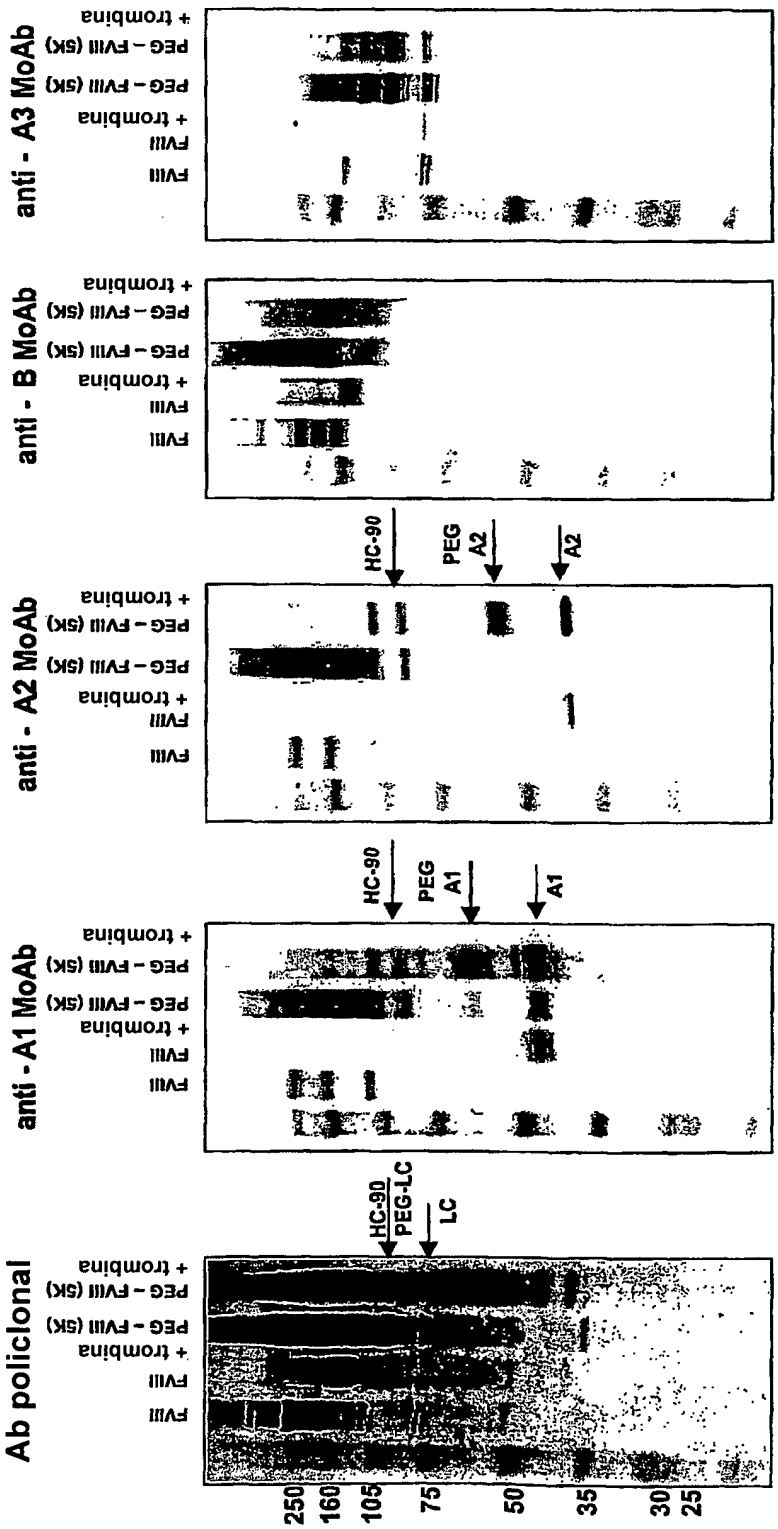

anti - A3 MoAb
anti - B MoAb
anti - A2 MoAb
anti - A1 MoAb
Ab policlonal
FVIII
FVIII
+ trombina
PEG – FVIII (5K)
PEG – FVIII (5K)
+ trombina
HC-90
PEG A2
A2
HC-90
PEG A1
A1
HC-90
PEG-LC
LC
250
160
105
75
50
35
30
25

Figura 3

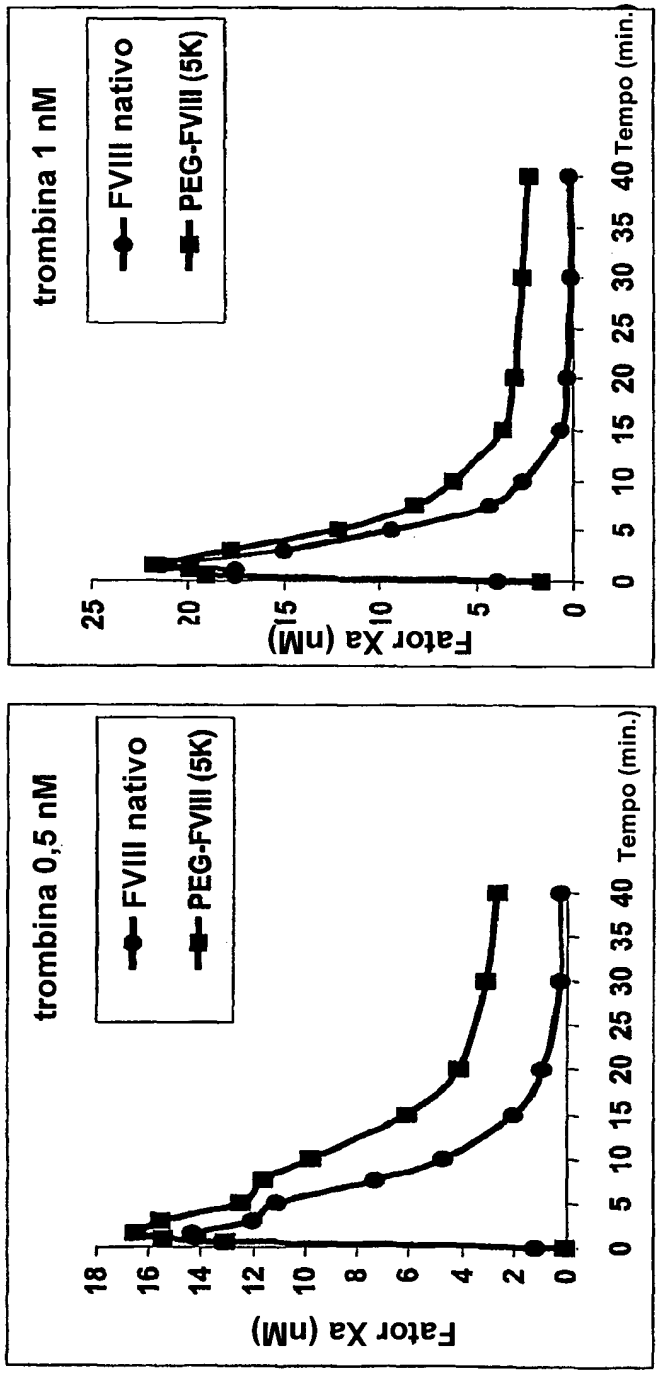

trombina 0,5 nM
FVIII nativo
PEG-FVIII (5K)
Fator Xa (nM)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0 5 10 15 20 25 30 35 40 Tempo (min.)
trombina 1 nM
FVIII nativo
PEG-FVIII (5K)
Fator Xa (nM)
0
5
10
15
20
25
0 5 10 15 20 25 30 35 40 Tempo (min.)

Figura 4

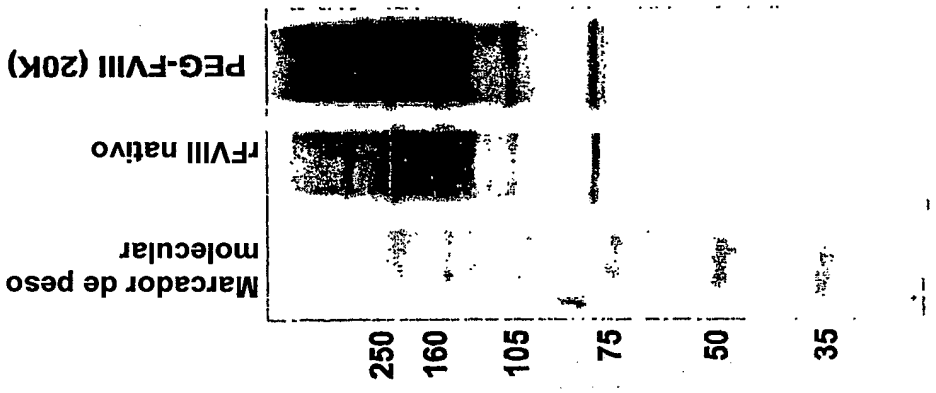

PEG-FVIII (20K)
rFVIII nativo
Marcador de peso molecular
250
160
105
75
50
35

Figura 5

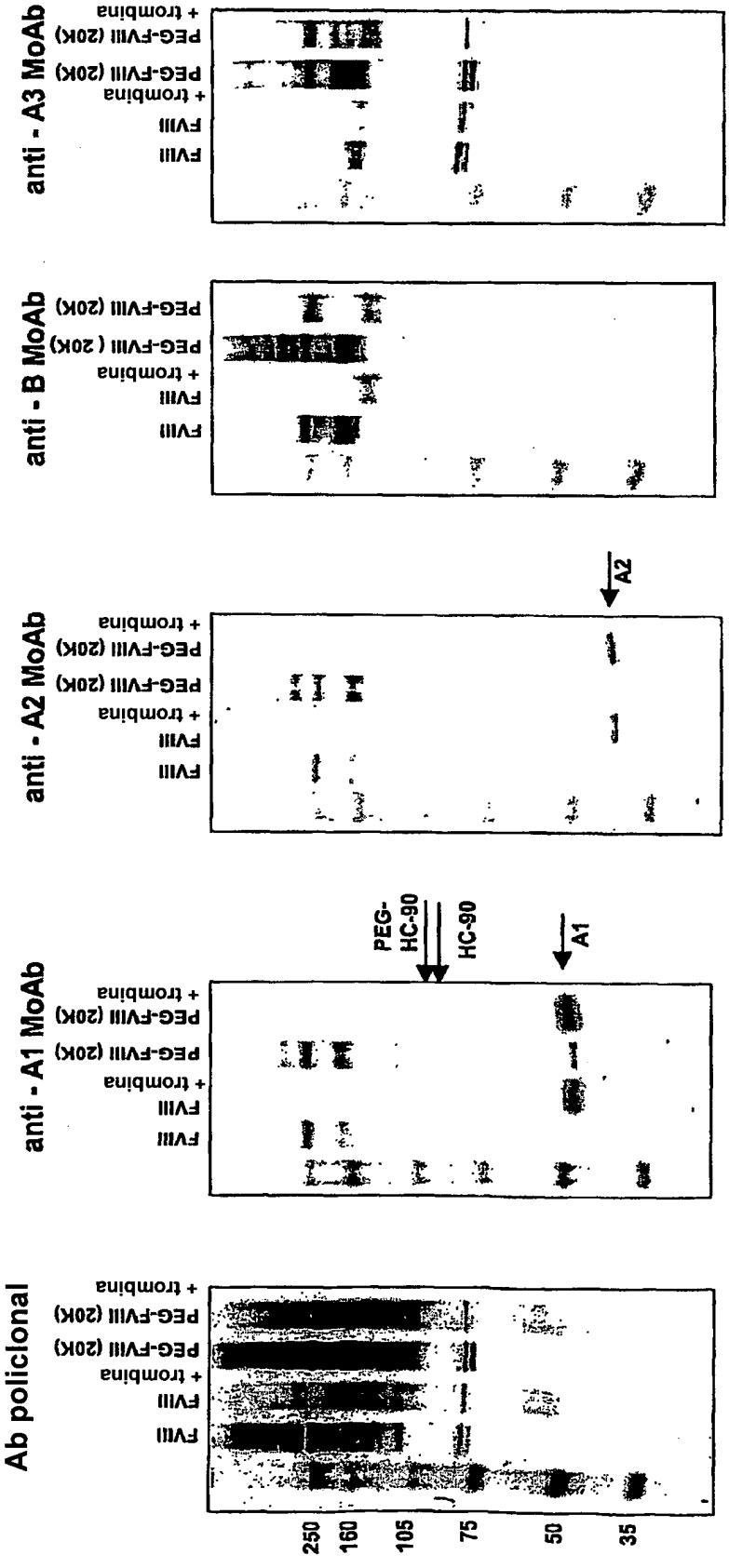

Ab policional
anti - A1 MoAb
anti - A2 MoAb
anti - B MoAb
anti - A3 MoAb
FVIII
FVIII
+ trombina
PEG-FVIII (20K)
PEG-FVIII (20K)
+ trombina
PEG-HC-90
HC-90
A1
A2
250
160
105
75
50
35

Figura 6

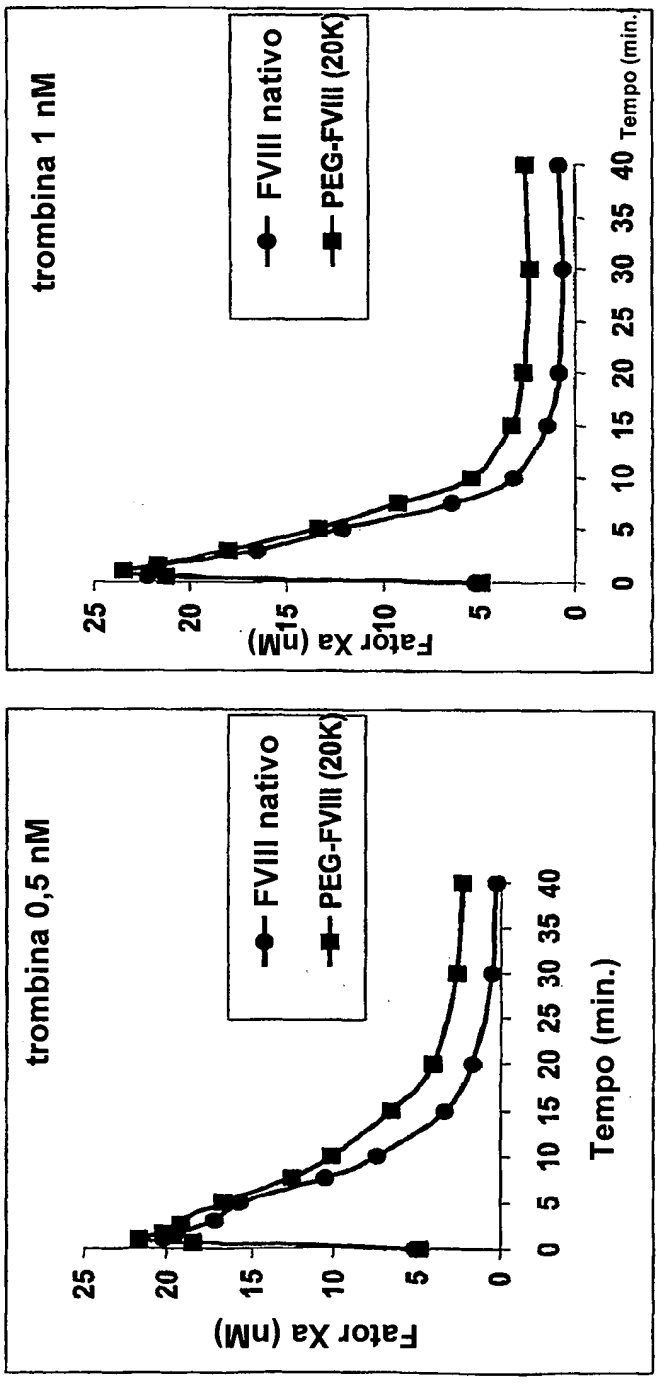

trombina 1 nM
FVIII nativo
PEG-FVIII (20K)
Fator Xa (nM)
0
5
10
15
20
25
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tempo (min.)
trombina 0,5 nM
FVIII nativo
PEG-FVIII (20K)
Fator Xa (nM)
0
5
10
15
20
25
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tempo (min.)

Figura 7

RESUMO

"CONSTRUÇÃO PROTEINÁCEA"

A invenção é uma construção proteinácea compreendendo uma molécula do Fator VIII tendo pelo menos uma porção do domínio B intacta, o qual é conjugado a um polímero solúvel em água, tal como o polietileno glicol com um peso molecular de mais do que 10.000 Daltons. A construção tem uma atividade biológica de pelo menos 80 % da atividade biológica do Fator VIII nativo, e a meia-vida in vivo da construção é aumentada em pelo menos 1,5 vez, em comparação com a meia-vida in vivo do fator FVIII nativo.