

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2005.12.23	(73) Titular(es): BAXTER INTERNATIONAL INC. LAW DEPARTMENT, ONE BAXTER PARKWAY DEERFIELD, IL 60015 US
(30) Prioridade(s): 2004.12.27 US 639244 P 2005.04.04 US 668378 P 2005.04.15 US 671901 P 2005.05.26 US 685086 P	(72) Inventor(es): PETER TURECEK AT FRIEDRICH SCHEIFLINGER AT JUERGEN SIEKMANN AT
(43) Data de publicação do pedido: 2007.09.26	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2013.08.07 212/2013	

(54) Epígrafe: **CONJUGADOS DE POLÍMERO-FACTOR DE VON WILLEBRAND**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO REFERE-SE A UMA CONSTRUÇÃO PROTEICA (TAMBÉM DESIGNADA POR CONJUGADO DE POLÍMERO-VWF) COMPREENDENDO FACTOR DE VON WILLEBRAND (VWF) PLASMÁTICO E/OU RECOMBINANTE, O REFERIDO VWF ESTANDO LIGADO A PELO MENOS UMA MOLÉCULA DE POLÍMERO FISIOLÓGICAMENTE ACEITÁVEL, BEM COMO A UM COMPLEXO DA REFERIDA CONSTRUÇÃO PROTEICA E DE PELO MENOS UMA PROTEÍNA DE FACTOR VIII (FVIII). A MOLÉCULA DE POLÍMERO FISIOLÓGICAMENTE ACEITÁVEL PODE SER, POR EXEMPLO, POLIETILENOGLICOL (PEG) OU ÁCIDO POLISSIÁLICO (PSA). ADICIONALMENTE O PRESENTE INVENTO REFERE-SE A MÉTODOS PARA PROLONGAR A MEIA-VIDA IN VIVO DE VWF OU FVIII NO SANGUE DE UM MAMÍFERO POSSUINDO UM DISTÚRBO HEMORRÁGICO ASSOCIADO A DEFEITOS FUNCIONAIS OU DEFICIÊNCIAS DE PELO MENOS UM DE FVIII OU VWF.

RESUMO**"Conjugados de polímero-factor de von Willebrand"**

O presente invento refere-se a uma construção proteica (também designada por conjugado de polímero-VWF) compreendendo factor de von Willebrand (VWF) plasmático e/ou recombinante, o referido VWF estando ligado a pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável, bem como a um complexo da referida construção proteica e de pelo menos uma proteína de factor VIII (FVIII). A molécula de polímero fisiologicamente aceitável pode ser, por exemplo, polietilenoglicol (PEG) ou ácido polissialílico (PSA). Adicionalmente o presente invento refere-se a métodos para prolongar a meia-vida *in vivo* de VWF ou FVIII no sangue de um mamífero possuindo um distúrbio hemorrágico associado a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII ou VWF.

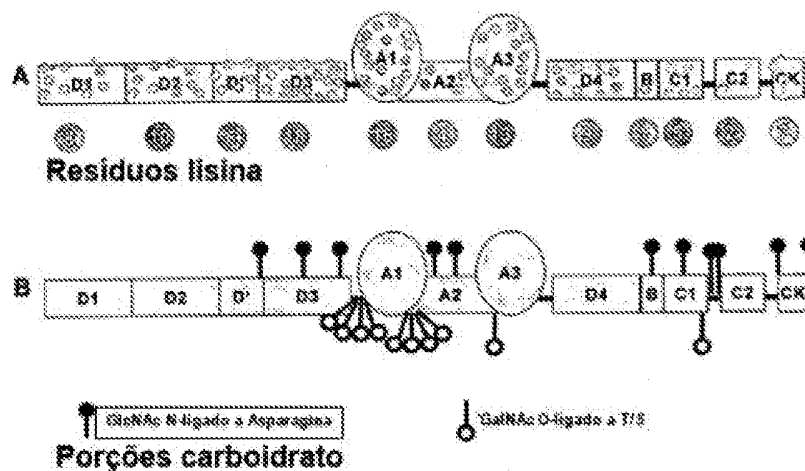


Figura 1

DESCRIÇÃO

"Conjugados de polímero-factor de von Willebrand"

CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se a métodos para prolongamento da meia-vida *in vivo* de FVIII no sangue de um mamífero possuindo um distúrbio hemorrágico associado a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII ou VWF.

ANTECEDENTES DO INVENTO

O VWF é uma glicoproteína adesiva multimérica presente no plasma de mamíferos, que tem múltiplas funções fisiológicas. Durante a hemóstase primária o VWF actua como um mediador entre receptores específicos sobre a superfície de plaquetas e componentes da matriz extracelular tais como colagénio. Além disso, o VWF serve como uma proteína transportadora e de estabilização para o pró-coagulante FVIII. O VWF é sintetizado em células endoteliais e megacariócitos como uma molécula precursora de 2813 aminoácidos. O polipéptido precursor, pré-pró-VWF, consiste de um péptido de sinal de 22 resíduos, de um pró-péptido de 741 resíduos e do polipéptido de 2050 resíduos encontrado em VWF plasmático maduro (Fischer *et al.*, FEBS Lett. 351: 345-348, 1994). Após secreção para o plasma o VWF circula na forma de várias espécies com diferentes tamanhos moleculares. Estas moléculas de VWF consistem de oligómeros e multímeros da subunidade madura de 2050 resíduos aminoácido. O VWF pode ser encontrado usualmente no plasma como um dímero e até multímeros consistindo de 50 - 100 dímeros (Ruggeri *et al.* Thromb. Haemost. 82: 576-584, 1999). A meia-vida *in vivo* de VWF humano na circulação de humano é aproximadamente 12 a 20 horas.

O FVIII tem uma meia-vida *in vivo* relativamente curta de aproximadamente 8 a 12 horas requerendo dosagens repetidas frequentes para tratamento de pacientes de distúrbios hemorrágicos associados a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII e VWF.

Na especialidade anterior foi descrito que VWF recombinante (rVWF) produzido numa cultura de células eucarióticas está mais intacto e é menos degradado proteoliticamente do que VWF derivado de plasma (Fischer et al., FEBS Lett. 375: 259-262, 1995). A EP 0 784 632 descreve um método para isolamento de VWF altamente puro por purificação de VWF recombinante utilizando cromatografia de permuta aniónica. Métodos para uma produção em grande escala de VWF homogéneo e estruturalmente intacto são também conhecidos na especialidade (Schlokot et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 24: 257-267, 1996; Fischer et al., CMLS 53: 943-950, 1997). O VWF recombinante tem sido caracterizado utilizando modelos de canino, murino e porcino da doença de von Willebrand (VWD) (Turecek et al., Blood 90: 3555-3567, 1997; Roussi et al., Blood Coag. Fibrinol. 9: 361-372, 1998; Schwarz et al., Haemophilia 4: 53-62, 1998; Schwarz et al., Semin. Thromb. Hemost. 28: 215-225, 2002). A WO 00/49047 descreve um método para produzir uma preparação de VWF por tratamento de pró-VWF com trombina. Um método para purificação de proteínas que se ligam a VWF por utilização de um rVWF imobilizado sobre um transportador é revelado na WO 98/25969. A utilização farmacêutica de pró-péptidos de VWF (pró-VWF) derivados de plasma e recombinantes para tratamento de distúrbios de coagulação do sangue é descrita na EP 0 977 584. A US 6 037 452 descreve a ligação de FVIII e factor IX (FIX) a um poli(óxido de alquilen) através de um ligador ou de um agente de acoplamento. Na EP 0 774 261 mostra-se que a utilização de VWF recombinante possuindo uma meia-vida biológica prolongada *in vivo* estabiliza FVIII no sangue de um mamífero e induz a produção de FVIII endógeno. No entanto, para pacientes possuindo distúrbios hemorrágicos baseados em VWF ou FVIII, existe uma necessidade de aumentar adicionalmente a meia-vida *in vivo* de VWF e FVIII.

É conhecido que o VWF estabiliza FVIII *in vivo* e, assim, desempenha um papel crucial para regular os níveis de FVIII no plasma e como consequência é um factor central para controlar a hemóstase primária e secundária. É também conhecido que, após aplicação de produtos terapêuticos contendo VWF, se pode observar um aumento em FVIII:C endógeno

até 1 a 3 unidades por ml em 24 horas demonstrando o efeito de estabilização *in vivo* de VWF sobre FVIII.

Existe uma forte necessidade de uma nova substância para alargar o espectro de tratamento para deficiências em FVIII de coagulação também conhecidas como hemofilia A.

Assim, o presente invento proporciona um novo sistema para prolongamento da meia-vida *in vivo* de FVIII no sangue de um mamífero. É um objectivo adicional do presente invento proporcionar métodos para o tratamento melhorado de distúrbios hemorrágicos associados a defeitos funcionais ou deficiências de um ou ambos de FVIII e VWF.

A WO 97/11957, a EP 1 258 497 e a EP 1 260 582 revelam, cada uma, conjugados de um polipéptido e de um polímero biocompatível e um processo para preparação dos mesmos. A WO 94/15625 revela FVIII modificado com PEG possuindo uma meia-vida *in vivo* prolongada. A US 6 037 452 revela FVIII de actuação longa, não imunogénico, que está ligado covalentemente a um poli(óxido de alquilenos) tal como PEG. A WO 2004/075923 revela conjugados de FVIII ligados covalentemente a de um a três polímeros solúveis em água. Lewis et al. (1994) Bioconjugate J., 5: 565-576 revelam um método solúvel em água para modificação de proteínas com DOTA.

Um primeiro aspecto do invento proporciona uma construção proteica que não está ligada a Factor VIII (FVIII) para utilização no tratamento de um distúrbio hemorrágico associado a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII e VWF num mamífero por prolongamento da meia-vida *in vivo* de FVIII endógeno no sangue do mamífero;

onde a construção proteica compreende

- (a) uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um precursor, subunidade ou fragmento de VWF possuindo uma actividade biológica de VWF conforme determinado num ensaio de cofactor de ristocetina ou num ensaio de ligação de colagénio, e seus dímeros e multímeros; e

- (b) pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável ligada à referida molécula de VWF;

a referida construção possuindo a capacidade de ligação à molécula de FVIII endógena do mamífero, onde quando administrada ao mamífero a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de VWF e a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII endógeno ligada à referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII ligada a VWF não ligado a pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável.

Um segundo aspecto do invento proporciona uma construção proteica que não está ligada a Factor VIII (FVIII) para utilização no tratamento de um distúrbio hemorrágico associado a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII e VWF num mamífero por prolongamento da meia-vida *in vivo* de FVIII ou um precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII no sangue do mamífero;

onde a construção proteica compreende

- (a) uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um precursor, subunidade ou fragmento de VWF possuindo uma actividade biológica de VWF conforme determinado num ensaio de cofactor de ristocetina ou num ensaio de ligação de colagénio, e seus dímeros e multímeros; e
- (b) pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável ligada à referida molécula de VWF;

onde é administrada ao mamífero uma primeira dose de pelo menos uma molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII;

onde a referida construção tem a capacidade de ligação à molécula de FVIII administrada ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII, onde quando administrada ao mamífero a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de VWF e a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII administrada ou

precursor, subunidade ou fragmento de FVIII ligados à referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento ligados a VWF não ligado a pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável.

Um terceiro aspecto do invento proporciona uma molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII para utilização no tratamento de um distúrbio hemorrágico associado a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII e VWF num mamífero por prolongamento da meia-vida *in vivo* de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII no sangue do mamífero;

onde é administrada ao mamífero uma primeira dose de pelo menos uma construção proteica que não está ligada a FVIII e que compreende:

- (a) uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um precursor, subunidade ou fragmento de VWF possuindo uma actividade biológica de VWF conforme determinado num ensaio de cofactor de ristocetina ou num ensaio de ligação de colagénio, e seus dímeros e multímeros; e
- (b) pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável ligada à referida molécula de VWF;

onde a referida construção tem a capacidade de ligação à molécula de FVIII administrada ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII, onde quando administrada ao mamífero a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de VWF e a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII administrada ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII ligados à referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento ligados a VWF não ligado a pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável.

Um quarto aspecto do invento proporciona um complexo para utilização no tratamento de um distúrbio hemorrágico

associado a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII e VWF num mamífero por prolongamento da meia-vida *in vivo* de FVIII ou um precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII no sangue de um mamífero;

onde o complexo compreende:

uma construção proteica compreendendo

- (a) uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um precursor, subunidade ou fragmento de VWF possuindo uma actividade biológica de VWF conforme determinado num ensaio de cofactor de ristocetina ou num ensaio de ligação de colagénio, e seus dímeros e multímeros; e
- (b) pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável ligada à referida molécula de VWF; e

uma molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII ligada à construção proteica;

onde quando administrada ao mamífero a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de VWF e a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII ligados à referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento ligados a VWF não ligado a pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável.

É também aqui descrita uma construção proteica compreendendo factor de von Willebrand (VWF) plasmático e/ou recombinante ou seus derivados biologicamente activos, o referido VWF ou os referidos seus derivados biologicamente activos estando ligados a uma ou mais moléculas de polímero fisiologicamente aceitáveis, onde a meia-vida *in vivo* da construção proteica é prolongada no sangue de um mamífero, particularmente um humano. Adicionalmente, é aqui descrito um complexo entre a referida construção proteica e pelo menos uma proteína de factor FVIII (FVIII) ou um seu derivado biologicamente activo, onde a meia-vida *in vivo* da referida proteína FVIII ou do referido seu derivado biologicamente

activo é também prolongada no sangue de um mamífero. São aqui adicionalmente descritas composições farmacêuticas contendo a referida construção proteica ou o referido complexo bem como são proporcionados métodos para prolongar a meia-vida *in vivo* de FVIII no sangue de um mamífero possuindo um distúrbio hemorrágico associado a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII e VWF utilizando a referida construção proteica ou o referido complexo de acordo com o presente invento. São também aqui descritos métodos para preparação da construção proteica (por exemplo nos pontos (i) a (xii) abaixo).

(i) Um método para formar uma construção proteica compreendendo uma molécula de VWF e uma porção PEG ligada covalentemente a pelo menos um resíduo carboidrato na referida molécula de VWF, compreendendo;

(a) proporcionar uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um derivado biologicamente activo de VWF, e seus dímeros e multímeros;

(b) oxidar resíduos carboidrato na referida molécula de VWF;

(c) pôr em contacto os referidos resíduos carboidrato com um reagente de PEG contendo um grupo hidrazida; e

(d) permitir ao referido reagente de PEG hidrazida ligar-se covalentemente a pelo menos um resíduo carboidrato no referido VWF, formando desse modo a referida construção, onde a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* de uma molécula de VWF, e onde a referida construção é capaz de se ligar a pelo menos uma molécula de FVIII ou um derivado biologicamente activo de FVIII.

(ii) Um método para formar uma construção proteica compreendendo uma molécula de VWF e uma porção PEG ligada covalentemente a pelo menos um grupo amino primário na referida molécula de VWF, compreendendo;

(a) proporcionar uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um derivado biologicamente activo de VWF, e seus dímeros e multímeros;

(b) pôr em contacto o referido grupo amino primário na referida molécula de VWF com um reagente de PEG; e

(c) permitir ao referido reagente de PEG ligar-se covalentemente ao referido grupo amino primário no referido VWF, formando desse modo a referida construção, onde a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* de uma molécula de VWF, e onde a referida construção é capaz de se ligar a pelo menos uma molécula de FVIII ou um derivado biologicamente activo de FVIII.

(iii) Um método para formar uma construção proteica compreendendo uma molécula de VWF e uma porção PEG ligada covalentemente a pelo menos um grupo amino primário por aminação redutiva na referida molécula de VWF, compreendendo;

- (a) proporcionar uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um derivado biologicamente activo de VWF, e seus dímeros e multímeros;
- (b) pôr em contacto resíduos lisina na referida molécula de VWF com um reagente de PEG contendo um grupo aldeído para formar uma base de Schiff em solução;
- (c) pôr em contacto a referida solução com um agente de redução para formar uma amina secundária; e
- (d) permitir ao referido reagente de PEG ligar-se covalentemente à referida molécula de VWF, formando desse modo a referida construção, onde a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* de uma molécula de VWF, e onde a referida construção é capaz de se ligar a pelo menos uma molécula de factor VIII (FVIII) ou um derivado biologicamente activo de FVIII.

(iv) Um método para formar uma construção proteica compreendendo uma molécula de VWF e uma porção PEG ligada covalentemente a pelo menos um resíduo lisina na referida molécula de VWF, compreendendo;

- (a) proporcionar uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um derivado biologicamente activo de VWF, e seus dímeros e multímeros;
- (b) pôr em contacto resíduos lisina na referida molécula de VWF com um reagente de PEG contendo um grupo aldeído para formar uma base de Schiff em solução;

(c) pôr em contacto a referida solução com um agente reactivo para formar uma amina secundária; e
(d) permitir ao referido reagente de PEG ligar-se covalentemente à referida molécula de VWF, formando desse modo a referida construção, onde a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* de uma molécula de VWF, e onde a referida construção é capaz de se ligar a pelo menos uma molécula de factor VIII (FVIII) ou um derivado biologicamente activo de FVIII.

(v) Um método para formar uma construção proteica compreendendo uma molécula de VWF e uma porção PEG ligada covalentemente a pelo menos um grupo sulfidrilo livre ou gerado na referida molécula de VWF, compreendendo;

(a) proporcionar uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um derivado biologicamente activo de VWF, e seus dímeros e multímeros;

(b) pôr em contacto o referido grupo sulfidrilo na referida molécula de VWF com um reagente de PEG contendo um grupo maleimida; e

(c) permitir ao referido reagente de PEG ligar-se covalentemente a pelo menos um grupo sulfidrilo no referido VWF, formando desse modo a referida construção, onde a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* de uma molécula de VWF, e onde a referida construção é capaz de se ligar a pelo menos uma molécula de factor VIII (FVIII) ou um derivado biologicamente activo de FVIII.

(vi) Um método para formar uma construção proteica compreendendo uma molécula de VWF e uma porção PEG ligada covalentemente a pelo menos um grupo carboxilo na referida molécula de VWF, compreendendo;

(a) proporcionar uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um derivado biologicamente activo de VWF, e seus dímeros e multímeros;

(b) pôr em contacto grupos carboxilo na referida molécula de VWF com um reagente de PEG contendo um grupo amino e uma carbodi-imida solúvel em água para formar uma ligação amida; e

(c) permitir à referida porção PEG ligar-se covalentemente ao referido VWF, formando desse modo a referida construção, onde a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* de uma molécula de VWF, e onde a referida construção é capaz de se ligar a pelo menos uma molécula de FVIII ou um derivado biologicamente activo de FVIII.

(vii) Um método para formar uma construção proteica compreendendo uma molécula de VWF e uma porção PEG ligada covalentemente à referida molécula de VWF, a referida porção PEG não estando ligada ao local de ligação de FVIII da referida molécula de VWF, o método compreendendo;

(a) proporcionar uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um derivado biologicamente activo de VWF, e seus dímeros e multímeros;

(b) pôr em contacto o local de ligação de FVIII na referida molécula de VWF com um agente protector de local de ligação de Factor VIII, formando desse modo uma molécula de VWF com um local de ligação de FVIII protegido;

(c) pôr em contacto um local reactivo na referida molécula de VWF do passo (b) com um reagente de PEG;

(d) permitir ao referido reagente de PEG ligar-se covalentemente à referida molécula de VWF; e

(e) separar o referido agente protector de local de ligação de FVIII da referida molécula de VWF, formando desse modo a referida construção, onde a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* de uma molécula de VWF, e onde a referida construção é capaz de se ligar a pelo menos uma molécula de factor VIII (FVIII) ou um derivado biologicamente activo de FVIII.

(viii) Um método para formar uma construção proteica compreendendo uma molécula de VWF e uma porção ácido polissialico (PSA) ligada de modo cruzado covalentemente à referida molécula de VWF, compreendendo;

(a) proporcionar uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um derivado biologicamente activo de VWF, e seus dímeros e multímeros;

(b) pôr em contacto a referida molécula de VWF com uma solução contendo PSA e glutaraldeído; e

(c) permitir ao referido PSA ligar-se de modo cruzado covalentemente ao referido VWF, formando desse modo a referida construção, onde a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* de uma molécula de VWF, e onde a referida construção é capaz de se ligar a pelo menos uma molécula de FVIII ou um derivado biologicamente activo de FVIII.

(ix) Um método para formar uma construção proteica compreendendo uma molécula de VWF e uma porção PSA ligada covalentemente a pelo menos um resíduo carboidrato na referida molécula de VWF, compreendendo;

(a) proporcionar uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um derivado biologicamente activo de VWF, e seus dímeros e multímeros;

(b) oxidar resíduos carboidrato na referida molécula de VWF;

(c) pôr em contacto os referidos resíduos carboidrato com um reagente de PSA contendo um grupo hidrazida; e

(d) permitir ao referido reagente de PSA ligar-se covalentemente a pelo menos um resíduo carboidrato no referido VWF, formando desse modo a referida construção, onde a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* de uma molécula de VWF, e onde a referida construção é capaz de se ligar a pelo menos uma molécula de FVIII ou um derivado biologicamente activo de FVIII.

(x) Um método para formar uma construção proteica compreendendo uma molécula de VWF e uma porção ácido hialurónico (HA) ligada covalentemente a pelo menos um resíduo lisina na referida molécula de VWF, compreendendo;

(a) proporcionar uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um derivado biologicamente activo de VWF, e seus dímeros e multímeros;

(b) pôr em contacto uma solução de HA com um agente oxidante para formar HA activado;

(c) pôr em contacto a referida molécula de VWF com o referido HA activado, formando desse modo a referida

construção, onde a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* de uma molécula de VWF, e onde a referida construção é capaz de se ligar a pelo menos uma molécula de factor FVIII ou um derivado biologicamente activo de FVIII.

(xi) Um método para formar uma construção proteica compreendendo uma molécula de VWF e uma porção PEG ligada covalentemente a pelo menos um grupo carboidrato na referida molécula de VWF, compreendendo;

(a) proporcionar uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um derivado biologicamente activo de VWF, e seus dímeros e multímeros;

(b) pôr em contacto um grupo carboidrato na referida molécula de VWF com uma enzima oxidante para formar uma porção carboidrato oxidada no referido VWF;

(c) pôr em contacto a referida porção carboidrato oxidada no referido VWF com um reagente de PEG contendo um grupo hidrazida; e

(d) permitir à referida porção PEG ligar-se covalentemente ao referido VWF, formando desse modo a referida construção, onde a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* de uma molécula de VWF, e onde a referida construção é capaz de se ligar a pelo menos uma molécula de FVIII ou um derivado biologicamente activo de FVIII.

(xii) Um método para formar uma construção proteica compreendendo uma molécula de VWF e uma porção PEG ligada covalentemente à referida molécula de VWF, compreendendo;

(a) proporcionar uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um derivado biologicamente activo de VWF, e seus dímeros e multímeros;

(b) pôr em contacto a referida molécula de VWF com um reagente de PEG para formar uma solução;

(c) colocar a referida solução dentro de uma câmara de perfusão pelo que é criada tensão de cisalhamento na referida molécula de VWF por utilização de uma bomba peristáltica; e

(d) permitir ao referido reagente de PEG ligar-se covalentemente ao referido VWF, formando desse modo a

referida construção, onde a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* de uma molécula de VWF, e onde a referida construção é capaz de se ligar a pelo menos uma molécula de FVIII ou um derivado biologicamente activo de FVIII.

Um aspecto do presente invento refere-se à utilização de uma construção proteica (na descrição seguinte também designada como "conjugado de polímero-VWF") compreendendo VWF plasmático e/ou recombinante ou seus derivados biologicamente activos, o referido VWF ou os referidos seus derivados biologicamente activos estando ligados a um ou mais tipos de moléculas de polímero fisiologicamente aceitáveis, onde a meia-vida *in vivo* do referido VWF ou dos referidos seus derivados biologicamente activos é prolongada no sangue de um mamífero.

Um aspecto adicional do presente invento é proporcionar a utilização de conjugados de polímero-VWF, que seguem dois mecanismos farmacológicos principais, e de formas dos referidos conjugados de polímero-VWF possuindo características intermédias entre as duas formas. Uma forma transporta estavelmente o polímero conjugado com VWF e será eliminada como uma molécula integral ao longo do tempo após aplicação a um mamífero. A outra forma é caracterizada por reversibilidade do polímero conjugado com VWF. Após administração a um mamífero, as moléculas de polímero ligadas a VWF serão gradualmente libertadas de VWF e o VWF não conjugado tornar-se-á disponível como o agente farmacologicamente funcional. As características de libertação dependerão da química de conjugação e da composição e da estrutura das moléculas de polímero ligadas a VWF.

Os conjugados de polímero-VWF são úteis combinados com FVIII para estabilizar FVIII para uma meia-vida aumentada.

Quando o conjugado é preparado para se ligar a e estabilizar FVIII, o grau ou nível de polímero ligado ao VWF é proporcionado de modo a não interferir com a região de ligação do VWF. Como será mostrado nos exemplos, pode-se conseguir uma conjugação satisfatória de polímero ao VWF sem

interferir com a capacidade de ligação de VWF e FVIII. O grau de conjugação de polímero pode também ser controlado ou modificado para manter a actividade de VWF ao mesmo tempo mantendo também a capacidade do VWF para se ligar a FVIII. Nesta forma os conjugados de polímero-VWF proporcionam um VWF terapeuticamente activo, ao mesmo tempo estabilizando também FVIII para uma meia-vida aumentada.

As moléculas de VWF e FVIII úteis para o presente invento incluem a proteína a todo o comprimento, precursores da proteína, subunidades ou fragmentos da proteína, e seus derivados funcionais. A referência a VWF e FVIII ou FVIII pretende incluir todas as formas potenciais destas proteínas.

Como aqui utilizado "derivado biologicamente activo" inclui qualquer derivado de uma molécula possuindo substancialmente as mesmas propriedades funcionais e/ou biológicas da referida molécula, tais como propriedades de ligação, e/ou a mesma base estrutural, tal como uma cadeia central peptídica ou uma unidade polimérica básica.

O VWF útil para o presente invento inclui todas as formas potenciais, incluindo as formas monoméricas e multiméricas. Uma forma particularmente útil de VWF são homomultímeros de pelo menos dois VWFs. As proteínas de VWF podem ser um derivado biologicamente activo ou, quando se destinam a ser utilizadas somente como um estabilizador para FVIII, o VWF pode ser de uma forma não biologicamente activa. Deverá também ser entendido que o presente invento abrange a utilização de diferentes formas de VWF em combinação. Por exemplo, uma composição útil para o presente invento pode incluir diferentes multímeros, diferentes derivados e ambos os derivados biologicamente activos e derivados não biologicamente activos. Em hemóstase primária o VWF serve como uma ponte entre plaquetas e componentes específicos da matriz extracelular, tal como colagénio. A actividade biológica de VWF neste processo pode ser medida por dois ensaios *in vitro* diferentes (Turecek et al., Semin. Thromb. Hemost. 28:149-160, 2002). O ensaio de cofactor de ristocetina é baseado na aglutinação de plaquetas, frescas ou fixas com formalina, induzida pelo antibiótico ristocetina na presença de VWF. O grau de aglutinação de plaquetas depende

da concentração de VWF e pode ser medida pelo método turbidimétrico, e.g. por utilização de um agregómetro (Weiss et al., J. Clin. Invest. 52: 2708-2716, 1973; Macfarlane et al., Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 306-308, 1975). O segundo método é o ensaio de ligação de colagénio, que é baseado na tecnologia ELISA (Brown e Bosak, Thromb. Res. 43: 303-311, 1986; Favalaro, Thromb. Haemost. 83: 127-135, 2000). Uma placa de microtitulação é revestida com colagénio de tipo I ou III. Depois o VWF é ligado à superfície de colagénio e subsequentemente detectado com um anticorpo policlonal marcado com enzima. O último passo é a reacção de substrato, que pode ser monitorizada fotometricamente com um leitor ELISA.

Como aqui utilizado, "VWF derivado de plasma (pdVWF)" inclui todas as formas da proteína encontradas no sangue incluindo o VWF maduro obtido a partir de um mamífero possuindo a propriedade de estabilização *in vivo*, e.g. ligação, de pelo menos uma molécula de FVIII. No entanto, o invento não está limitado ao VWF maduro. Um derivado biologicamente activo do referido pVWF é o pró-VWF que contém o pró-péptido. Outras formas de VWF úteis para o presente invento incluem a construção proteica que compreende VWF imaturo incluindo a molécula de VWF precursor (pré-pró-VWF) sintetizada por células endoteliais e megacariócitos, e/ou o pró-péptido de VWF (pró-VWF) e/ou pdVWF maduro obtidos pela clivagem do péptido de sinal e pró-péptido, respectivamente da molécula de precursor. Exemplos adicionais de derivados biologicamente activos de pdVWF incluem pró-fármacos que são processados ou convertidos na forma biologicamente activa, ou que são biologicamente activos como tal, formas truncadas, formas possuindo deleções, formas possuindo substituições, formas possuindo outras adições para além das pró-formas, fragmentos da forma madura, formas quiméricas e formas possuindo modificações pós-tradução em comparação com a forma natural. Um pdVWF útil para o presente invento inclui também aquelas formas não biologicamente activas. Isto pode ser conseguido por modificação do VWF maduro ou de outras formas de ocorrência natural encontradas no sangue. A fonte para VWF útil para o invento é um mamífero, incluindo a versão porcina e humana.

Como aqui utilizado, "VWF recombinante (rVWF)" inclui VWF obtido através de tecnologia de ADN recombinante. Uma forma de rVWF útil tem pelo menos a propriedade de estabilização *in vivo*, e.g. ligação, de pelo menos uma molécula de FVIII e possuindo opcionalmente um padrão de glicosilação que é farmacologicamente aceitável. Exemplos específicos da mesma incluem VWF sem domínio A2 e assim resistente a proteólise (Lankhof *et al.*, Thromb. Haemost. 77: 1008-1013, 1997), o fragmento de VWF de Val 449 a Asn 730 incluindo o domínio de ligação de glicoproteína 1b e locais de ligação para colagénio e heparina (Pietu *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 1339-1347, 1989). A determinação da estabilização de pelo menos uma molécula de FVIII pode ser realizada em mamíferos deficientes em VWF de acordo com métodos conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, como descrito no Exemplo 8 abaixo, ratinhos deficientes em VWF são tratados intravenosamente através da veia caudal com VWF, e segue-se o nível de actividade de FVIII no seu plasma ao longo do tempo. O nível de actividade de FVIII pode ser medido, por exemplo, num ensaio cromogénico conforme publicado na European Pharmacopoeia (Ph. Eur., 3.^a Ed. 1997:2.7.4).

A amostra contendo FVIII (FVIII:C) é misturada com trombina, factor IX activado (FIXa), fosfolípidos e factor X (FX) num tampão contendo cálcio. O FVIII é activado por trombina e subsequentemente forma um complexo com fosfolípidos, FIXa e iões cálcio. Este complexo activa FX em FXa, que por sua vez cliva um substrato cromogénico (e.g. (AcOH*CH₃OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA). A evolução com o tempo da para-nitroanilina (pNA) libertada é medida a 405 nm. A velocidade da reacção é proporcional à concentração de FVIII na amostra.

O rVWF do presente invento pode ser produzido por qualquer método conhecido na especialidade. Um exemplo específico é revelado na WO86/06096 publicada em 23 de Outubro de 1986 e no Pedido de Patente dos E.U.A. 07/559 509, depositado em 23 de Julho de 1990, no nome de Ginsburg *et al.* Isto pode incluir qualquer método conhecido na especialidade para (i) a produção de ADN recombinante por engenharia genética, e.g. via transcrição reversa de ARN e/ou

amplificação de ADN, (ii) introdução de ADN recombinante em células procarióticas ou eucarióticas por transfecção, e.g. via electroporação ou micro-injecção, (iii) cultura das referidas células transformadas, e.g. de um modo contínuo ou descontínuo, (iv) expressão de VWF, e.g. constitutivamente ou por indução, e (v) isolamento do referido VWF, e.g. a partir do meio de cultura ou por colheita das células transformadas, de modo a (vi) obter rVWF purificado, e.g. através de cromatografia de permuta aniónica ou cromatografia de afinidade.

O rVWF pode ser produzido por expressão num sistema hospedeiro procariótico ou eucariótico adequado caracterizado por produzir uma molécula de VWF farmacologicamente aceitável. Exemplos de células eucarióticas são células de mamífero, tais como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep e HepG2. Não existe qualquer limitação particular aos reagentes ou condições utilizadas para produzir ou isolar VWF de acordo com o presente invento e pode-se utilizar qualquer sistema conhecido na especialidade ou disponível comercialmente. Numa concretização preferida do presente invento o rVWF é obtido por métodos como descrito no estado da especialidade.

Pode-se utilizar uma ampla variedade de vectores para a preparação do rVWF e podem ser seleccionados a partir de vectores de expressão eucarióticos e procarióticos. Exemplos de vectores para expressão procariótica incluem plasmídeos tais como pRSET, pET, pBAD, etc., onde os promotores utilizados em vectores de expressão procarióticos incluem lac, trc, trp, recA, araBAD, etc. Exemplos de vectores para expressão eucariótica incluem: (i) para expressão em levedura, vectores tais como pAO, pPIC, pYES, pMET, utilizando promotores tais como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc; (ii) para expressão em células de insecto, vectores tais como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., utilizando promotores tais como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., e (iii) para expressão em células de mamífero, vectores tais como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pCDNA3, pBPV, etc., e vectores derivados de sistemas virais tais como vírus vacínia, vírus adeno-associados, vírus herpes, retrovírus, etc., utilizando promotores tais como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV e β -actina.

O FVIII útil com o presente invento inclui aquelas formas que são biologicamente activas incluindo o FVIII a todo o comprimento e qualquer derivado com a capacidade de actuar como um cofactor na activação de FX de coagulação e a capacidade de formar um complexo com VWF. O FVIII utilizado de acordo com o presente invento pode ser um FVIII derivado de plasma (pdFVIII) ou um FVIII recombinante (rFVIII) ou seus derivados biologicamente activos. O pdFVIII e o rFVIII podem ser produzidos por qualquer método conhecido na especialidade. O pdFVIII pode ser purificado por quaisquer meios adequados. Um método útil é descrito na Patente dos E.U.A. N.º 5 470 954, que é aqui incorporada por referência. As proteínas de rFVIII podem ser preparadas por quaisquer meios adequados. Exemplos de tais rFVIII incluem RECOMBINATE e ADVATE ambos fabricados e comercializados pela Baxter Healthcare Corporation; REFACTO, uma forma de FVIII de domínio B eliminado produzida e comercializada pela Wyeth Corporation; e KOGENATE, produzido e comercializado pela Bayer Corporation. Métodos e exemplos de rFVIII são descritos nas Patentes dos E.U.A. N.ºs 4 757 006, 4 965 199 e 5 618 788.

Como aqui utilizado, "polímero fisiologicamente aceitável" inclui polímeros que são solúveis numa solução ou suspensão aquosa e não têm qualquer impacto negativo, tal como efeitos colaterais, em mamíferos por administração do conjugado de polímero-VWF numa quantidade farmacologicamente eficaz. Não existe qualquer limitação particular ao polímero fisiologicamente aceitável utilizado de acordo com o presente invento. Os polímeros são tipicamente caracterizados como possuindo preferivelmente de 2 a cerca de 300 unidades de repetição. Exemplos destes polímeros incluem, mas não estão limitados a, poli(alquilenoglicóis) tais como polietilenoglicol (PEG), poli(propilenoglicol) (PPG), copolímeros de etilenoglicol e propilenoglicol e outros, poli(poliol oxietilado), poli(álcool olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmetacrilamida), poli(hidroxiálquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(álcool vinílico), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina), e combinações de quaisquer dos anteriores.

O polímero fisiologicamente aceitável não está limitado a uma estrutura particular e pode ser linear (e.g. alcoxi-PEG ou PEG bifuncional), ramificado ou com múltiplos braços (e.g. PEG bifurcado ou PEG ligado a um núcleo de poliol), dendrítico, ou com elementos de ligação degradáveis. Além disso, a estrutura interna do polímero pode estar organizada segundo vários padrões diferentes e pode ser seleccionada entre o grupo consistindo de homopolímero, copolímero alternante, copolímero aleatório, copolímero de bloco, terpolímero alternante, terpolímero aleatório e terpolímero de bloco.

Estes polímeros incluem também polímeros de poli(óxido de alquilenos), poli(ácido maleico), poli(DL-alanina), tais como carboximetilcelulose, dextrano, ácido hialurónico e quitina, e poli(met)acrilatos.

Numa concretização do presente invento, o polímero fisiologicamente aceitável é PEG e seus derivados. A cadeia lateral de PEG pode ser linear, ramificada, bifurcada ou pode consistir de múltiplos braços. Não existe qualquer limitação específica do PEG utilizado de acordo com o presente invento. Um PEG particularmente útil tem um peso molecular no intervalo de 3000-20000. Existem várias moléculas de PEG úteis que são do domínio público, i.e. que nunca foram patenteadas ou que estão agora fora de patente. Outras moléculas de PEG úteis são reveladas nas WO 03/040211, US 6 566 506, US 6 864 350 e US 6 455 639, por exemplo.

Noutra concretização do presente invento, o polímero fisiologicamente aceitável é ácido polissialico (PSA) e seus derivados. O PSA pode ser ligado a VWF pelo método descrito na US 4 356 170, que é aqui incorporada por referência. Numa concretização do invento o composto de polissacárido pode ser um polissacárido de ocorrência natural, um derivado de um polissacárido de ocorrência natural, ou um polissacárido de ocorrência natural derivatizado. A porção polissacárido do composto tem mais do que 5, tipicamente pelo menos 10, e noutra concretização pelo menos 20 a 50 resíduos ácido siálico na cadeia de polímero. Compostos de polissacárido prontamente disponíveis podem ter até 500 resíduos de

sacárido no total, mas usualmente têm menos do que 300 resíduos na cadeia de polímero. Geralmente, todos os resíduos de sacárido no composto são resíduos de ácido siálico.

Pelo menos a porção ácido polissialico do composto de polissacárido, e numa concretização todo o composto, é altamente hidrófilo. A hidrofília é conferida principalmente pelos grupos carboxilo pendentes das unidades ácido siálico, bem como pelos grupos hidroxilo. A unidade de sacárido pode conter outros grupos funcionais, tais como grupos amina, hidroxilo ou sulfato, ou suas combinações. Estes grupos podem estar presentes em compostos de sacárido de ocorrência natural, ou ser introduzidos em compostos de polissacárido derivatizados.

Compostos de polissacárido de utilização particular para o invento são aqueles produzidos por bactérias. Alguns destes polissacáridos de ocorrência natural são conhecidos como glicolípidos. É particularmente vantajoso se os compostos de polissacárido estiverem substancialmente livres de unidades de galactose terminais, que tendem a ser reconhecidas por receptores de galactose de hepatócitos e células de Kupffer.

Os multímeros de VWF podem estar ligados aos compostos de polissacárido por qualquer de várias técnicas conhecidas dos peritos na especialidade. Exemplos incluem a ligação através da ligação peptídica entre um grupo carboxilo sobre qualquer um do VWF ou do polissacárido e um grupo amina do outro, ou uma ligação éster entre um grupo carboxilo de um deles e um grupo hidroxilo do outro. Alternativamente uma base de Schiff pode ser formada entre um grupo amino de um deles e um grupo aldeído do outro. Outros mecanismos de ligação estão dentro das competências habituais na especialidade. Vários exemplos são identificados na coluna 7, linha 15, até à coluna 8, linha 5 da Patente dos E.U.A. Número 5 846 951.

Como aqui utilizado, a referência ao VWF ligado a uma ou mais moléculas de polímero fisiologicamente aceitáveis inclui qualquer ligação química adequada, tal como, ligado covalentemente ou ligado não covalentemente tal como por interações iónicas, hidrofóbicas, de afinidade ou de

bioafinidade. O polímero pode também estar acoplado à proteína por utilização de reagentes bifuncionais e através de um braço espaçador. Adicionalmente a molécula de polímero pode ser acoplada ao VWF por interacção de afinidade. Por exemplo, o VWF pode ser biotinilado e polímeros conjugados com avidina ou estreptavidina podem ser ligados ao VWF. Além disso, anticorpos policlonais ou monoclonais anti-VWF, bem como seus fragmentos, podem ser ligados a um polímero e depois este complexo pode ser ligado ao VWF. Os polímeros podem ser ligados ao VWF também por métodos enzimáticos tais como, por exemplo, a transferência de sacáridos com poliglicosiltransferase como ensinado na US 6 379 933 ou glicopeguilação como ensinado na US 2004 0132640 A1. Outra abordagem é a ligação de polímeros ao VWF com base na sua função biológica como a ligação de colagénios PEGilados ou fragmentos de colagénio aos domínios A1 e A3 do VWF. Para este propósito, podem-se utilizar colagénios de tipo I e III, e.g. a partir de placenta de humano, exibindo uma forte interacção com o VWF. A ligação dos polímeros pode ser estável ou reversível após aplicação *in vivo* da construção proteica.

Como aqui utilizado, "VWF PEGilado" inclui VWF que está ligado a um ou mais PEGs, e como aqui utilizado "PEGilação" inclui o processo de ligação de um ou mais PEGs a VWF. Métodos adequados de PEGilação são revelados nas Patentes dos E.U.A. N.ºs 5 122 614 e 5 539 063.

De acordo com uma concretização do presente invento o polímero fisiologicamente aceitável é PEG ou um derivado de PEG, que é ligado covalentemente a VWF por qualquer estratégia e método conhecido na especialidade. As estratégias de modificação mais comuns são a ligação de pelo menos uma molécula de polímero através de grupos amino de resíduos lisina, a ligação de pelo menos uma molécula de polímero através de cadeias laterais de carboidrato, a ligação de pelo menos uma molécula de polímero através de grupos sulfidrílo, a ligação de pelo menos uma molécula de polímero através de grupos carboxilo de ácidos aspárticos e ácidos glutâmicos bem como a ligação de pelo menos uma molécula de polímero de grupos hidroxilo e a ligação de pelo menos uma molécula de polímero do terminal N.

Numa concretização do presente invento a ligação de pelo menos uma molécula de polímero a VWF pode ser realizada acoplando covalentemente a referida molécula de polímero aos grupos amino das cadeias laterais de lisina de VWF. O VWF humano contém 108 resíduos lisina livres com grupos NH_2 nas cadeias laterais, que são susceptíveis de se ligarem a pelo menos uma molécula de polímero. Exemplos de resíduos lisina de VWF aos quais a molécula de polímero pode ser ligada covalentemente de acordo com o presente invento são apresentados na Fig. 1A. Derivados de PEG adequados que podem ser ligados covalentemente aos resíduos lisina de VWF são, por exemplo, polietilenoglicóis com um éster activo de N-hidroxi-succinimida (NHS) tal como succinato de succinimidilo, glutarato de succinimidilo ou propionato de succinimidilo, que reagem com os resíduos lisina sob condições moderadas formando uma ligação amida. Outros exemplos de PEG activado são aqueles com um carbonato activo tal como carbonato de succinimidilo (SC-PEG) e carbonato de benzotriazole (BTC-PEG) (ver página 463 de Roberts *et al.*, Advanced Drug Delivery Reviews 54: 459-476, 2002). SC-PEG e BTC-PEG reagem preferencialmente com resíduos lisina para formar uma ligação carbamato, mas também são conhecidos por reagirem com resíduos histidina e tirosina. Métodos alternativos são a ligação de pelo menos uma molécula de polímero com carbonatos de PEG formando ligações uretano ou com aldeídos ou cetonas formando aminas secundárias, e.g. após redução com cianoborohidreto de sódio. Outros reagentes de acilação de PEG que produzem proteínas ligadas a uretano incluem carbonato de p-nitrofenilo, carbonato de triclorofenilo e carbonilimidazole. Estes reagentes são preparados fazendo reagir cloroformatos ou carbonilimidazole com o grupo hidroxilo terminal em monometoxi-PEG (mPEG) (ver página 464 de Roberts *et al.*, acima). Outro exemplo refere-se à assim denominada química de PEGilação de "segunda geração" pela qual mPEG-propionaldeído, sob condições ácidas, é selectivo pela α -amina N-terminal (ver página 464 de Roberts *et al.*, acima). Podem-se utilizar reagentes de PEG libertáveis tais como PEG-anidrido maleico, carbonatos de succinimidilo de feniléter de mPEG, e carbonatos de succinimidilo de benzamida de mPEG, para produzir um conjugado que, sob condições fisiológicas, libertará a

proteína terapêutica "sem marcador", como descrito na página 469 de Roberts *et al.*, acima.

Numa concretização adicional do presente invento, o VWF pode também ser ligado a pelo menos uma molécula de polímero através dos seus resíduos carboidrato. Isto pode ser realizado e.g. por oxidação moderada das cadeias carboidrato, tal como com NaIO_4 , formando uma função aldeído e subsequente acoplamento a um PEG, tal como PEG-hidrazida. Uma vantagem deste procedimento é baseada no facto de as laçadas A1 e A3 de VWF, que compreendem os locais de ligação de colagénio e por este motivo são regiões críticas para a actividade biológica de VWF, não conterem quaisquer resíduos carboidrato e não poderem ser modificadas por este procedimento como pode ser observado na Fig. 1B. Esta figura mostra um exemplo do resíduo GlcNAc N-ligado a asparagina e dos resíduos GalNAc O-ligados a treonina ou serina, que podem ser oxidados e subsequentemente ligados por pelo menos uma molécula de polímero. Devido ao facto de os carboidratos do VWF serem agregados em certos domínios, o VWF pode ser ligado de modo dirigido por pelo menos uma molécula de polímero por utilização deste procedimento de modificação. A ligação de polímero ao resíduo carboidrato é particularmente vantajosa quando é desejada a forma terapeuticamente activa do VWF. Isto pode ser reforçado por reacção selectiva do polímero a qualquer dos resíduos N-ligados ou O-ligados através de métodos conhecidos. Por exemplo, a enzima glucose-oxidase pode ser utilizada para oxidar resíduos carboidrato em VWF para gerar múltiplos grupos aldeído reactivos, que podem ser feitos reagir com PEG-hidrazida para produzir um ligação hidrazona ou com PEG-amina para produzir uma base de Schiff reversível (ver página 467 de Roberts *et al.*, acima). Sob certas condições, uma serina ou treonina N-terminal de VWF podem ser utilizadas para conjugação específica a certos locais por conversão da mesma num derivado de glioxililo por oxidação de periodato (ver página 467 de Roberts *et al.*, acima).

Outra concretização do presente invento é a ligação de pelo menos uma molécula de polímero a VWF através de grupos sulfidrílo. O VWF humano possui 177 grupos SH- livres que podem ser modificados, por exemplo, por PEG-maleimida

formando um sulfureto estável. Pode também ser realizada a PEGilação de resíduos cisteína utilizando, por exemplo, PEG-vinilsulfona, PEG-iodoacetamida ou PEG-ortopiridildissulfureto (ver página 466 de Roberts *et al.*, acima).

De acordo com as suas múltiplas funções a molécula de VWF possui vários locais de ligação para receptores ou ligandos específicos (Girma *et al.*, *Thromb Haemost.* 74:156-60, 1995). Um local de ligação importante é o domínio de ligação de FVIII, que está localizado no terminal N da subunidade madura (aminoácidos 1-272). Este epítipo pode ser protegido por incubação com FVIII livre e formação de um complexo FVIII/VWF. Subsequentemente o complexo é modificado quimicamente (e.g. PEGilado ou polissialilado) e o VWF conjugado com polímero com o local de ligação de FVIII livre é separado do FVIII (e.g. por cromatografia de exclusão de tamanhos com CaCl_2 0,3 M ou NaCl 2 M). Similarmente o VWF pode ser ligado a uma resina de afinidade com FVIII imobilizado. Subsequentemente o VWF é conjugado quimicamente com um polímero (e.g. um derivado de ácido polissialílico ou polietilenoglicol) e eluído a partir desta matriz (e.g. sob condições de elevada salinidade tais como CaCl_2 0,3 M ou NaCl 2 M) num modo descontínuo ou por utilização de uma coluna de cromatografia.

O epítipo de VWF de ligação a FVIII é quase idêntico ao local de ligação a heparina. Assim, o local de ligação a FVIII pode ser bloqueado e protegido por ligação de VWF a heparina ou a uma resina de afinidade com heparina imobilizada durante o procedimento de modificação química.

Como aqui utilizado, o termo "agente protector de local de ligação de Factor VIII" refere-se a qualquer agente que se liga ao domínio de ligação de FVIII ou epítipo na molécula de VWF. Um agente protector de local de ligação de Factor VIII pode ser seleccionado entre Factor VIII, derivados de FVIII, heparina e derivados de heparina.

O presente invento é dirigido a aumentar a meia-vida *in vivo* de FVIII aumentando a meia-vida *in vivo* de VWF ou seus derivados biologicamente activos em comparação com a meia-

vida *in vivo* de VWF não ligado a pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável. Numa concretização do presente invento, a meia-vida *in vivo* de VWF é prolongada pelo menos por um factor de dois, enquanto noutra concretização a meia-vida *in vivo* é aumentada pelo menos por um factor de três. Ainda noutra concretização a meia-vida *in vivo* é aumentada por um factor de cinco por ligação de pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável. O aumento ou prolongamento da meia-vida de VWF pode ser avaliado por medição da farmacocinética de VWF em ratinhos deficientes em FVIII, como descrito no Exemplo 7 abaixo. Resumidamente, ratinhos deficientes em FVIII são tratados com uma injeção bólus de VWF pré-misturado com FVIII através da veia caudal, e medem-se os níveis de antigénio VWF em amostras de plasma em vários instantes de tempo. O antigénio VWF, bem como o antigénio FVIII, podem ser medidos através de um ensaio ELISA.

Um aspecto adicional do presente invento refere-se a um complexo formado entre pelo menos um conjugado de polímero-VWF e pelo menos uma molécula de FVIII, onde a meia-vida *in vivo* do FVIII é prolongada no sangue de um mamífero pelo conjugado de polímero-VWF.

A ligação do conjugado de polímero-VWF com FVIII prolonga ou aumenta a meia-vida *in vivo* do referido FVIII em comparação com a meia-vida *in vivo* de um FVIII formando um complexo com VWF não ligado a pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável. Numa concretização do presente invento, a meia-vida *in vivo* de FVIII é prolongada por pelo menos um factor de 1,5, noutra concretização por pelo menos um factor de dois, noutra concretização por pelo menos um factor de três, e numa concretização adicional por pelo menos um factor de cinco.

Os conjugados de polímero-VWF para utilização de acordo com o presente invento podem ser utilizados para o tratamento de hemofilia A ou subtipos desta doença. Conjugados de polímero-VWF podem também ser utilizados como um tratamento adjuvante de profilaxia de hemofilia A. Sob estas circunstâncias de tratamento, conjugados de polímero-VWF serão administrados em intervalos de tempo e

independentemente serão administrados como usual concentrados de FVIII, quer derivado de plasma quer recombinante, os mesmos que são correntemente utilizados para tratamento regular de hemofilia A, no entanto, com intervalos de tratamento prolongados devidos às capacidades de prolongamento da meia-vida de conjugados de polímero-VWF.

Numa concretização do invento tanto para a profilaxia em hemofilia A como para o tratamento de hemorragias agudas em hemofilia A, um conjugado de polímero-VWF será administrado em conjunto com FVIII ou na forma de um complexo com FVIII a pacientes com hemofilia A. Nestes casos o estancar de hemorragias internas ou externas necessita de ser conseguido imediatamente elevando os níveis no plasma de FVIII de outro modo baixos para níveis terapeuticamente eficazes. Os conjugados de polímero-VWF podem também ser utilizados para terapia de imunotolerância para erradicar anticorpos inibidores, que se desenvolveram contra FVIII, uma situação clínica também conhecida como hemofilia de inibidor, ou contra VWF. Sob estas circunstâncias níveis supra-fisiológicos e supra-farmacológicos de FVIII são administrados a pacientes possuindo inibidores desenvolvidos contra FVIII ou VWF. Esta forma de terapia é facilitada por aplicação de conjugados de polímero-VWF possuindo usualmente recuperações mais elevadas e uma persistência mais longa na circulação de pacientes que recebem as referidas preparações do que VWF não conjugado.

De acordo com o estado da técnica em terapia e de acordo com linhas de orientação e regulamentação internacional, as farmacocinéticas de FVIII perfundido são reconhecidas e aceites como marcadores substitutos válidos para a eficácia. Isto é baseado na assunção validada de que um produto de FVIII perfundido, que tinha sido caracterizado por testes padrão para a actividade funcional, será encontrado na corrente sanguínea e actuará aí como esperado como um cofactor do complexo tenase, o complexo de activação de factor X, por ligação a FIXa e fosfolípidos. (Elödi et al., Thromb. Res. 21: 695-700, 1981). Por conseguinte qualquer análise farmacocinética em modelos animais será preditiva para eficácia esperada em pacientes tratados com produtos de FVIII.

Para a determinação da actividade de cofactor FIX uma amostra de FVIII ou FVIIIa (FVIII completamente activado com trombina) é adicionada a uma mistura preparada de FIXa, FX, fosfolípido e CaCl_2 . Incuba-se esta mistura reaccional a 37°C para permitir a formação de complexo e a subsequente geração de FXa. Retiram-se subamostras a intervalos de até 20 minutos e adicionam-se a um substrato cromogénico, que é selectivamente dividido por FXa. Após 15 minutos de incubação, a reacção é terminada pela adição de ácido acético. Os valores de absorvância (A_{405}), que são proporcionais às concentrações de FXa, são medidos num leitor ELISA e representados graficamente em função do tempo de incubação na mistura reaccional.

Um aspecto adicional do presente invento é proporcionar um método para prolongar a meia-vida *in vivo* de FVIII no sangue de um mamífero possuindo um distúrbio hemorrágico associado a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII e VWF, compreendendo os passos de:

- a) proporcionar pelo menos uma construção proteica como definida acima;
- b) proporcionar pelo menos um FVIII como definido acima; e
- c) formar um complexo entre a referida construção proteica e o referido FVIII.

Numa concretização do método acima o complexo do passo (c) é formado "extracorporal" (*i.e.* fora do corpo de um mamífero) *e.g.* por mistura da construção proteica e do referido FVIII, e depois administração do complexo assim formado numa quantidade eficaz ao mamífero possuindo o referido distúrbio hemorrágico.

Numa concretização adicional do método acima, o complexo do passo (c) é formado intracorporal (*i.e.* no interior do corpo de um mamífero) entre a construção proteica e FVIII endógeno presente no sangue de um mamífero possuindo o referido distúrbio hemorrágico por administração da construção proteica numa quantidade eficaz ao referido mamífero.

Ainda noutra concretização do método acima o complexo do passo (c) é formado "intracorporal" entre a construção proteica e FVIII exógeno presente no sangue de um mamífero possuindo o referido distúrbio hemorrágico por administração da construção proteica numa quantidade eficaz ao referido mamífero. Pode-se administrar FVIII exógeno simultaneamente numa quantidade eficaz com a referida construção proteica ou sequencialmente, *i.e.* antes ou após administração da referida construção proteica.

Como aqui utilizado, "FVIII endógeno" inclui FVIII que tem origem no referido mamífero. Inclui também FVIII transcrito a partir de um transgene ou de outro ADN estranho presente no referido mamífero. Como aqui utilizado, "FVIII exógeno" inclui FVIII que não tem origem no referido mamífero incluindo pdFVIII e rFVIII tal como referido acima, bem como pdFVIII que é readministrado ao mamífero a partir do qual este foi isolado após formar o complexo definido acima, e rFVIII que é administrado ao mamífero cujo ADN foi utilizado na produção do referido rFVIII.

Como aqui utilizado, "quantidade eficaz" inclui uma dose adequada para tratamento de um mamífero possuindo um distúrbio hemorrágico tal como referido acima, por exemplo, para humanos preferivelmente num intervalo de 5 a 1000 IU por perfusão e mais preferivelmente num intervalo de 10 a 250 IU por perfusão.

A via de administração não exhibe limitações particulares, e numa concretização a construção proteica ou o complexo do presente invento podem ser administrados por injeção, tal como injeção intravenosa, intramuscular ou intraperitoneal.

O presente invento é também dirigido ao tratamento de distúrbios hemorrágicos associados a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII e VWF como aqui utilizados, incluindo distúrbios hemorrágicos onde a causa do distúrbio hemorrágico pode ser seleccionada entre o grupo consistindo de uma meia-vida de FVIII encurtada *in vivo*, propriedades alteradas de ligação de FVIII, defeitos genéticos de FVIII e uma expressão reduzida de FVIII. Numa

concretização do presente invento, o distúrbio hemorrágico é seleccionado entre o grupo consistindo de hemofilia A ou outras doenças associadas com uma função VWF dificultada ou interacção dificultada de VWF com outras moléculas.

Adicionalmente, o presente invento refere-se à utilização de uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de uma construção proteica como definida acima ou uma quantidade eficaz de um complexo como definido acima. A composição farmacêutica pode compreender adicionalmente um transportador, diluente, sal, tampão ou excipiente farmacêuticamente aceitáveis. A composição farmacêutica pode ser utilizada para tratamento dos distúrbios hemorrágicos definidos acima. A composição farmacêutica do invento pode ser uma solução ou um produto liofilizado. Existem muitos métodos conhecidos para formar soluções estáveis de proteínas, e especificamente VWF e FVIII, por exemplo, Patentes dos E.U.A. N.^{os} 6 586 573, 5 565 427, 5 763 401, 5 733 873, 4 877 608, 5 605 884 e 5 328 694. Estas soluções podem ser submetidas a qualquer processo de liofilização adequado, por exemplo, o processo descrito na Patente dos E.U.A. N.º 6 586 573. O presente invento inclui outras formas adequadas do conjugado de polímero-VWF quer sozinho quer em combinação com FVIII.

As figuras mostram:

As Figuras 1A e 1B mostram a estrutura esquemática de VWF com exemplos para locais alvo para conjugação. Os pontos a cinzento na Fig. 1A indicam os resíduos lisina de VWF que podem ser ligados por pelo menos uma molécula de polímero, e a Fig. 1B mostra os resíduos carboidrato em VWF que podem ser ligados por pelo menos uma molécula de polímero.

A Figura 2 mostra a farmacocinética de um conjugado de polímero-VWF em comparação com VWF não conjugado em ratinhos com VWD.

A Figura 3 mostra a farmacocinética de um conjugado de polímero-VWF em comparação com VWF não conjugado em ratinhos hemofílicos.

A Figura 4 mostra a farmacocinética de FVIII em ratinhos VWD tratados com rVWF ou PEG-rVWF.

A Figura 5 mostra a recuperação de rFVIII em ratinhos hemofílicos após aplicação de rFVIII complexado com conjugado de polímero-VWF e rFVIII complexado com VWF.

A Figura 6 mostra a recuperação de VWF em ratinhos hemofílicos após aplicação de rFVIII complexado com conjugado de polímero-VWF e rFVIII complexado com VWF.

A Figura 7 mostra a farmacocinética de rFVIII e PEG-rVWF em ratinhos duplamente *knockout* FVIII x VWF.

A Figura 8 mostra a farmacocinética de rFVIII e PEG-rVWF em ratinhos cruzados.

A Figura 9 mostra o aumento de VWF:Ag em plasma de ratinho (acoplamento de lisina e carboidrato).

A Figura 10 mostra um estudo de interacção biomolecular (diagrama à esquerda) e comparação da capacidade de ligação de FVIII (diagrama à direita) de rVWF conjugado com PEG em comparação com rVWF não conjugado.

A Figura 11 mostra o aumento de massa de VWF após conjugação de polímero medido por SDS-PAGE.

A Figura 12 mostra o aumento de massa de VWF após conjugação de polímero medido por electroforese em agarose para analisar multímeros de VWF.

A Figura 13 mostra a farmacocinética de rFVIII em ratinhos K.O. em FVIII após aplicação de rFVIII complexado com conjugado de polímero-VWF (rVWF com resíduos lisina PEGilados) e rFVIII complexado com rVWF.

A Figura 14 mostra a farmacocinética de rVWF em ratinhos K.O. em FVIII após aplicação de rFVIII complexado com conjugado de polímero-VWF (rVWF com resíduos lisina PEGilados) e rFVIII complexado com rVWF.

A Figura 15 mostra a determinação da capacidade de ligação de FVIII de rVWF conjugado com PEG em comparação com rVWF não conjugado utilizando um ensaio ELISA e cromogénico combinado (ECA).

A Figura 16 mostra a determinação da capacidade de ligação de FVIII de rVWF conjugado com PEG utilizando a tecnologia de ressonância de plasmão de superfície.

A Figura 17 mostra o aumento de massa de VWF após conjugação de polímero medido por SDS-PAGE como descrito no Exemplo 13.

A Figura 18 mostra a determinação da capacidade de ligação de FVIII de rVWF maturado com furina em comparação com um pdVWF e rVWF não tratado utilizando um ensaio ELISA e cromogénico combinado (ECA).

A Figura 19 mostra a determinação da capacidade de ligação de FVIII de rVWF maturado com furina em comparação com um pdVWF e rVWF não tratado utilizando a tecnologia de ressonância de plasmão de superfície.

A Figura 20 mostra os padrões de focagem isoeléctrica de conjugado de rVWF-ácido polissialico e rVWF sob condições redutoras.

A Figura 21 mostra a farmacocinética de conjugado de rVWF-ácido polissialico e rVWF em ratinhos deficientes em VWF.

A Figura 22 mostra a evolução com o tempo da actividade de FVIII de ratinho após aplicação de conjugado de rVWF-ácido polissialico ou rVWF em ratinhos deficientes em VWF.

A Figura 23 mostra a farmacocinética de PEG-rVWF (PEG ramificado 20K SG) e rVWF em ratinhos deficientes em FVIII.

A Figura 24 mostra a farmacocinética de rFVIII, co-perfundido com PEG-rVWF (PEG ramificado 20K SG) ou rVWF em ratinhos deficientes em FVIII.

A Figura 25 mostra a farmacocinética de rFVIII, co-perfundido com várias quantidades de PEG-rVWF (PEG ramificado 20K SG) em ratinhos deficientes em FVIII.

A Figura 26 mostra a farmacocinética de PEG-rVWF #A (5 mg de PEG/mg de proteína), PEG-rVWF #B (20 mg de PEG/mg de proteína) e rVWF nativo em ratinhos deficientes em FVIII.

A Figura 27 mostra a farmacocinética de rFVIII, co-perfundido com PEG-rVWF #A (5 mg de PEG/mg de proteína), PEG-rVWF #B (20 mg de PEG/mg de proteína) ou rVWF nativo.

O presente invento será adicionalmente ilustrado nos exemplos seguintes, sem qualquer limitação do mesmo.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Preparação de conjugado de polímero-VWF por modificação de resíduos carboidrato

Para preparação de conjugado de polímero-VWF através de resíduos carboidrato (Fig. 1B) preparou-se uma solução de rVWF (concentração final: 500 µg/ml) em tampão de acetato de sódio 20 mM, pH 6,0 e adicionou-se NaIO₄ (concentração final 5 mM) para a oxidação de resíduos carboidrato. A oxidação foi realizada durante 20 min a 4°C, depois adicionou-se bissulfito de sódio (concentração final 5 mM) para parar a reacção. Subsequentemente adicionou-se mPEG-hidrazida (comprimento de cadeia: 3 kD) (concentração final 10 mM) e realizou-se a PEGilação do VWF durante 1 h à temperatura ambiente. Depois purificou-se o VWF PEGilado por cromatografia de exclusão de tamanhos. A mistura reaccional foi aplicada sobre uma coluna cromatográfica (dimensões: 26 mm x 840 mm) cheia com Sephacryl S-300 HR (Amersham) e o VWF PEGilado foi separado dos reagentes utilizando tampão HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 contendo 5% de trealose. O VWF modificado foi eluído no volume vazio como indicado por medições dos níveis de antigénio VWF e da DO a 280 nm. As fracções contendo VWF foram aplicadas directamente a uma coluna de permuta de aniões (dimensões: 10 mm x 108 mm) cheia com EMD TMAE 650 M (Merck) para purificação adicional. Depois

o VWF PEGilado foi eluído com tampão HEPES 20 mM, contendo 5% de trealose e NaCl 1000 mM.

Exemplo 2: PEGilação de resíduos lisina em VWF com mPEG-sucinato de succinimidilo

Para PEGilação de VWF através de resíduos lisina (Fig. 1A) preparou-se uma solução de rVWF (concentração final: 500 µg/ml) em tampão HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, contendo 5% de sacarose) e adicionou-se mPEG-sucinato de succinimidilo (comprimento de cadeia: 5 kD) (concentração final 10 mM). O VWF foi PEGilado durante 1 h à temperatura ambiente. Subsequentemente purificou-se o VWF PEGilado por cromatografia de exclusão de tamanhos. A mistura reaccional foi aplicada sobre uma coluna cromatográfica cheia com Sephacryl S-300 HR (Amersham) e o VWF PEGilado foi separado pelo mesmo sistema tampão utilizado para a reacção de PEGilação. O VWF foi eluído no volume vazio como indicado por medições dos níveis de antigénio VWF e da DO a 280 nm. As fracções contendo VWF foram aplicadas directamente a uma coluna de permuta de aniões (dimensões: 26 mm x 840 mm) cheia com EMD TMAE 650 M (Merck) para purificação adicional. Depois o VWF PEGilado foi eluído com tampão HEPES 20 mM, contendo 5% de sacarose e NaCl 1000 mM.

Exemplo 3: PEGilação de resíduos lisina em VWF com mPEG-carbonato de p-nitrofenilo

Para PEGilação de VWF com mPEG-carbonato de p-nitrofenilo preparou-se uma solução de VWF derivado de plasma (concentração final: 500 µg/ml) em tampão HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6 contendo 5% de sacarose) e adicionou-se mPEG-carbonato de p-nitrofenilo (comprimento de cadeia: 2 kD) (concentração final 10 mM). O VWF foi PEGilado durante 2 h à temperatura ambiente. Subsequentemente purificou-se o VWF PEGilado por cromatografia de exclusão de tamanhos. A mistura reaccional foi aplicada sobre uma coluna cromatográfica cheia com Sephacryl S-300 HR (Amersham) e o VWF PEGilado foi separado pelo mesmo sistema tampão utilizado para a reacção de PEGilação. O VWF foi eluído no volume vazio como indicado por medições dos níveis de antigénio VWF e da DO a 280 nm.

Exemplo 4: PEGilação de resíduos sulfidrílo em VWF com mPEG-maleimida

Para PEGilação de VWF através de resíduos SH livres com mPEG-maleimida preparou-se uma solução de rVWF (concentração final: 500 µg/ml) em tampão HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6 contendo 4% de manose e 1% de trealose) e adicionou-se mPEG-maleimida (comprimento de cadeia: 10 kD) (concentração final 10 mM). O VWF foi PEGilado durante 2 h à temperatura ambiente. Subsequentemente purificou-se o VWF PEGilado por cromatografia de exclusão de tamanhos. A mistura reaccional foi aplicada sobre uma coluna cromatográfica cheia com Sephacryl S-300 HR (Amersham) e o VWF PEGilado foi separado pelo mesmo sistema tampão utilizado para a reacção de PEGilação. O VWF modificado foi eluído no volume vazio como indicado por medições dos níveis de antigénio VWF e da DO a 280 nm.

Exemplo 5: Acoplamento de dextrano a VWF

Preparou-se uma solução de dextrano (MW 40 kD) de 6 mg/ml em tampão de acetato de sódio 20 mM, pH 6,0 e adicionou-se NaIO₄ (concentração final 10 mM) para gerar grupos aldeído livres. A oxidação foi realizada durante 1 h a 4°C no escuro, depois adicionou-se bissulfito de sódio (concentração final 5 mM) para parar a reacção. O dextrano activado foi dialisado contra tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, contendo NaCl 0,15 M (tampão PBS). Depois adicionaram-se 2,4 ml desta solução de dextrano activado a 10 ml de uma solução de rVWF (concentração: 0,6 mg/ml em tampão PBS). A esta mistura adicionaram-se 5 ml de uma solução de cianoboro-hidreto de sódio (64 mg/ml em tampão PBS) e incubou-se à temperatura ambiente de um dia para o outro no escuro. Depois adicionaram-se 3 ml de uma solução de TRIS-HCl 1,0 M, pH 7,2, para bloquear os grupos aldeído restantes e incubou-se durante 1 h à temperatura ambiente e dialisou-se contra tampão HEPES 20 mM, pH 7,4, contendo 5% de sacarose. Depois o derivado de rVWF acoplado a dextrano foi adicionalmente purificado por cromatografia de exclusão de tamanhos por aplicação da mistura sobre uma coluna de cromatografia (dimensões: 50 mm x 860 mm) cheia com Sephacryl S-300 HR (tampão: HEPES 20 mM, 5% de sacarose, pH 7,4). O

derivado de rVWF foi eluído no volume vazio como indicado por medições dos níveis de antigénio VWF e da DO a 280 nm. Recolheram-se estas fracções e concentraram-se por ultrafiltração utilizando uma membrana de celulose regenerada de 100 kD (Millipore).

Exemplo 6: Farmacocinética em ratinhos VWD

Ratinhos deficientes em VWF descritos em detalhe por Denis *et al.* (PNAS 95: 9524-9529, 1998) foram utilizados como modelo de VWD de tipo III severa semelhante a VWD de humano. Grupos de 5 ratinhos receberam uma injeção bólus através da veia caudal quer com PEG-rVWF (comprimento de cadeia 3 kD, PEGilação de rVWF de acordo com o Exemplo 1) ou rVWF nativo como controlo numa dose de 40 U de VWF:Ag/kg de peso corporal, com base em VWF detectável (ELISA) após PEGilação. Os grupos de PEG-rVWF foram anestesiados 5 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 10 h e 24 h após injeção (5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 10 h e 24 h para os grupos de controlo) e preparou-se plasma de citrato a partir de punção cardíaca. Os níveis de antigénio VWF foram seguidos no plasma. Os resultados desta experiência estão sumarizados na Fig. 2. O rVWF nativo é eliminado da circulação de um modo tipicamente bifásico, como descrito na literatura (Lenting *et al.*, J. Biol. Chem. 279: 12102-12109, 2004) e cai para valores abaixo do limite de detecção entre 600 min e 1440 min, equivalentes a 10 e 24 h. Em contraste, após um aumento inicial de 0 no momento da injeção para aproximadamente 0,6 U per ml de plasma 10 h após injeção, o rVWF PEGilado estava ainda presente num nível substancialmente mais elevado de aproximadamente 0,4 U por ml mesmo 24 h após injeção com um declínio suave entre as 10 h e as 24 h indicando uma persistência muito mais longa de rVWF PEGilado. O aumento gradual em VWF mensurável ao longo do tempo indica a reversibilidade da conjugação do polímero PEG conjugado com VWF que, após libertação do polímero, se torna acessível para medição. O tempo longo de PEG-VWF na circulação neste modelo demonstra que esta preparação pode ser utilizada para o tratamento profiláctico de VWD.

Exemplo 7: Farmacocinética de ratinhos K.O. em FVIII

Ratinhos deficientes em FVIII descritos em detalhe por Bi *et al.* (Nat. Genet. 10: 119-121, 1995) foram utilizados como modelo de hemofilia A humana severa. Grupos de 5 ratinhos receberam uma injeção bólus (13 ml/kg) através da veia caudal quer com PEG-rVWF (comprimento de cadeia 3 kD, a PEGilação de rVWF foi realizada de acordo com o Exemplo 1), quer com rVWF nativo, cada um pré-misturado com rFVIII para conseguir 3 U de FVIII/ml e 3 U de VWF:Ag/ml. Após anestesia, preparou-se plasma de citrato por punção cardíaca a partir dos grupos respectivos, 5 min e 6 h após injeção de produto. Um grupo de controlo recebeu tampão e foi sangrado 5 min após injeção. Os níveis de antigénio VWF foram medidos em amostras de plasma. Os resultados desta experiência estão sumarizados na Fig. 3. As curvas mostram uma eliminação típica para rVWF caindo para próximo do nível de base de VWF, presente em ratinhos deficientes em FVIII, enquanto após aplicação de rVWF PEGilado, os níveis aumentaram dentro do período de observação de 6 h. Isto mostra mais uma vez a reversibilidade da conjugação do polímero PEG conjugado com VWF que, após libertação do polímero, se torna acessível para medição e continua a aumentar mesmo após 360 min (6 h) após aplicação.

Exemplo 8: Aumento de FVIII em ratinhos VWD

Ratinhos deficientes em Von Willebrand descritos em detalhe por Denis *et al.* (PNAS 95: 9524-9529, 1998) foram utilizados como um modelo de VWD de tipo III severa semelhante a VWD de humano. Grupos de 4-5 ratinhos foram tratados intravenosamente através da veia caudal com PEG-rVWF (comprimento de cadeia 5 kD, a PEGilação de rVWF foi realizada de acordo com o Exemplo 2) em HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 5% de sacarose, pH 7,4, ou com rVWF nativo. Um grupo de controlo foi tratado com tampão. (Dose de PEG-rVWF 18 U de VWF:Ag/kg com base em ELISA, 2700 µg/kg, dose de rVWF nativo: 2400 µg/kg).

Cada ratinho recebeu uma dose em volume de 10 ml/kg. Em instantes de tempo após injeção de PEG-rVWF (5 min, 1 h, 3 h, 6 h, 10 h, 24 h e 48 h) ou de rVWF nativo (5 min, 15 min,

30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 24 h e 32 h), grupos de 4-5 ratinhos foram anestesiados, preparou-se plasma de citrato a partir de punção cardíaca e seguiu-se o nível de actividade de FVIII (ensaio cromogénico interno) no plasma. O grupo de controlo foi sangrado 15 minutos após injeção. Os resultados desta experiência estão sumarizados na Fig. 4.

O nível de FVIII endógeno em ratinhos aumenta como um resultado da perfusão de rVWF. A área sob a curva (AUC) após aplicação de rVWF PEGilado foi 8,0 U*h/ml em comparação com apenas 3,3 U*h/ml após aplicação de rVWF. Isto mostra um tempo na circulação substancialmente mais longo para rVWF PEGilado. Os resultados mostram que o VWF PEGilado pode ser utilizado para o tratamento profiláctico de deficiência secundária de FVIII em VWD.

Exemplo 9: Recuperação de rFVIII e VWF em ratinhos K.O. em FVIII

Ratinhos deficientes em FVIII descritos em detalhe por Bi *et al.* (Nat Genet. 10: 119-121, 1995) foram utilizados como modelo de hemofilia A humana severa. Grupos de 5 ratinhos receberam uma injeção bólus (13 ml/kg) através da veia caudal quer com PEG-rVWF (HZ-PEG, 3K, acoplado através de carboidratos), quer com rVWF nativo, cada um pré-misturado com rFVIII para conseguir 3 U de FVIII/ml. Preparou-se plasma de citrato por punção cardíaca após anestesia a partir dos grupos respectivos, 5 min e 6 h após injeção. Mediram-se a recuperação de antigénio VWF e os níveis de actividade de FVIII em amostras de plasma. Os resultados desta experiência estão sumarizados nas Figs. 5 e 6.

O rVWF PEGilado para ambas as preparações induziu uma recuperação mais elevada de rFVIII co-injectado, em comparação com rVWF não tratado. Os níveis de VWF aumentaram para rVWF PEGilado ao longo do tempo, enquanto o rVWF normal foi eliminado quase completamente em 360 min. Os resultados mostram que o VWF PEGilado complexado com FVIII pode ser utilizado para tratamento agudo de hemofilia A com o benefício de um tempo de FVIII na circulação aumentado.

Exemplo 10: Aumento da meia-vida de FVIII em ratinhos duplamente knockout FVIII x VWF

Ratinhos duplamente *knockout* FVIII x VWF foram obtidos por cruzamento de ratinhos deficientes em FVIII e de ratinhos deficientes em VWF. Esses ratinhos padecem de deficiência em FVIII bem como de deficiência em VWF, proporcionando assim um modelo ideal para estudo de interações FVIII - VWF num modelo animal.

Grupos de 5 ratinhos duplamente *knockout* FVIII x VWF (ratinhos deficientes em FVIII foram cruzados com ratinhos deficientes em VWF) receberam uma injeção bólus (11 ml/kg) através da veia caudal quer com PEG-rVWF (comprimento de cadeia 5 kD, a PEGilação de rVWF foi realizada de acordo com o Exemplo 2 por modificação de resíduos lisina com mPEG-sucinato de sucinimidilo) em HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 5% de sacarose pH 7,4 ou com rVWF nativo SS-PEG, ou rVWF nativo, cada um pré-misturado com rFVIII para conseguir 9 U de FVIII/ml e 9 U de antigénio VWF/ml e 0,67 U de VWF:RCo/ml. Os valores de antigénio VWF foram medidos por utilização de um método ELISA como publicado (Ingerslev, Scand. J. Clin. Invest. 47: 143-149, 1987). A actividade de VWF:RCo funcional reflectindo as propriedades de ligação de plaquetas do VWF no processo de hemóstase primária foi medida de acordo com Macfarlane *et al.* (Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 306-308, 1975). Cinco min, 3 h, 6 h, 10 h e 24 h após injeção, preparou-se plasma de citrato por punção cardíaca após anestesia a partir dos grupos respectivos. Mediram-se a actividade de FVIII e os níveis de antigénio VWF em amostras de plasma.

A meia-vida de FVIII e VWF foi calculada utilizando o programa MicroMath Scientist (Micromath Research, Saint Louis, MO, E.U.A.) utilizando o modelo de um compartimento a partir da biblioteca farmacocinética. A meia-vida para FVIII, co-perfundido quer com rVWF quer com rVWF PEGilado aumentou de 1,88 h para 2,58 h, a área sob a curva (AUC) aumentou de 4,3 para 7,3 U*h/ml. A meia-vida de VWF aumentou de 3,1 para 10,4, a área sob a curva aumentou de 5,7 para 22,8. Os resultados são sumarizados nas Figs. 7 e 8. Os dados mostram que o PEG-VWF pode ser utilizado para o tratamento agudo e

profiláctico de hemofilia A e VWD com o benefício de tempos de circulação longos de VWD e FVIII.

Exemplo 11: Demonstração de reversibilidade de PEGilação em plasma de ratinho

A reversibilidade de PEGilação foi demonstrada por experiências *in vitro* com plasma deficiente em VWF. Obteve-se plasma citrado a partir de ratinhos deficientes em VWF (Denis *et al.* PNAS 95: 9524-9529, 1998) por centrifugação a 1100 x g durante 15 min a 4°C. Misturaram-se 4 volumes de plasma de ratinho com 1 volume de rVWF PEGilado preparado de acordo com o Exemplo 1 (acoplamento com PEG através de carboidratos) ou Exemplo 2 (acoplamento com PEG através de resíduos lisina) e mantiveram-se a 37°C durante 48 h. Utilizou-se rVWF não PEGilado como controlo em ambas as experiências. Retiraram-se subamostras imediatamente após mistura e 1 h, 5,5 h, 24 h e 48 h mais tarde e ensaiou-se o teor de antigénio VWF a partir de amostras congeladas por utilização de um sistema ELISA de sanduíche. Utilizou-se um anticorpo policlonal anti-VWF (DAKO) para revestimento de placas ELISA de 96 poços e ensaiou-se um conjugado de HRP-IgG anti-coelho de cabra (AXELL) para a detecção de factor VWF ligado. Ao longo do tempo, mediram-se quantidades crescentes de antigénio VWF demonstrando a reversibilidade de conjugação de polietilenoglicol com VWF também em amostras de plasma *ex vivo* (Fig. 9).

Exemplo 12: Determinação de capacidade de ligação de FVIII de preparações de VWF PEGilado

Comparou-se a capacidade de ligação de FVIII de diferentes preparações de rVWF PEGilado por experiências de ressonância de plasmão de superfície (Karlsson e Fält, J. Immunol. Methods 200: 121-33, 1997) utilizando um instrumento BIACORE® 3000 (BIACORE, Uppsala, Suécia). Em geral, ligandos são imobilizados num *chip* sensor e a ligação de outros componentes ao ligando é determinada por ressonância de plasmão de superfície. Por utilização desta técnica mede-se a alteração do índice de refacção da solução próximo da superfície do *chip*. Uma alteração na concentração de um componente ligado na superfície do *chip* é detectada como um

sinal, que é expresso em unidades de ressonância arbitrárias (RU). Existe uma relação linear entre a massa de proteína ligada ao ligando imobilizado e a RU observada. As preparações de VWF PEGilado foram imobilizados a 25°C à superfície de dextrano do *chip* sensor BIACORE™ utilizando química de NHS/EDC a 7000 - 9000 RU e 25°C. Utilizou-se um tampão HEPES 10 mM pH 7,4, contendo NaCl 150 mM, EDTA 3 mM e 0,005% de surfactante P20 (tampão HBS, BIACORE), a um caudal de 15 µl/min. Mediu-se a ligação de quantidades diferentes de um produto de FVIII disponível comercialmente (ADVATE, Baxter AG, Viena, Áustria) como ilustrado na Fig. 10. Esta figura demonstra a capacidade de ligação de FVIII de uma preparação de rVWF PEGilado, modificado com mPEG-maleimida 5000, preparado de acordo com o Exemplo 4. Na Tabela 1 sumarizam-se os resultados das experiências BIACORE com diferentes preparações de rVWF PEGilado. Nesta tabela as diferentes capacidades de ligação de FVIII das preparações de rVWF PEGilado são apresentadas em percentagem dos valores de RU da preparação de referência não PEGilada ao nível máximo da referência no intervalo de 10 - 20 IU de FVIII/ml (ensaio cromogénico).

TABELA 1

Capacidades de ligação de FVIII de preparações de rVWF PEGilado (rVWF não PEGilado = 100%)					
Reagente	Concentração de reagente				
	0 mM	1mM	5mM	10mM	20mM
mPEG SS 5000	100%	30-40%	20-30%	0-20%	0%
mPEG MAL 5000	100%	70-90%	40-60%	30-50%	20-40%
mPEG Hz 3000 (a)	100%	60-80%	30-50%	10-20%	0-5%
(a) Oxidado com NaIO ₄ 5 mM					

Exemplo 13: Aumento de massa de VWF após conjugação de polímero

O rVWF foi PEGilado de acordo com o Exemplo 2 utilizando mPEG-sucinato de succinimidilo (comprimento de cadeia: 5 kD) em várias concentrações (1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM e 10 mM). As espécies de VWF PEGilado foram analisadas com dois métodos diferentes: electroforese em gel de SDS-poliacrilamida e análise de multímero de VWF. A electroforese em gel de SDS

foi realizada sob condições redutoras utilizando um gel em gradiente de 3 - 8% (gel Tris-acetato/Bio-Rad). A análise de multímero de VWF foi realizada de acordo com Ruggeri et Zimmerman (Blood 57: 1140-43, 1981) utilizando um gel agarose a 1,6%. A visualização dos multímeros de VWF foi realizada de acordo com Aihara et al. (Thromb. Haemost. 55: 263-67, 1986).

A electroforese em gel de SDS (Fig. 11) mostra uma preparação de rVWF consistindo do VWF maduro (banda inferior) e de pró-VWF (banda superior) e o aumento do peso molecular após PEGilação por utilização de diferentes concentrações de reagente. Além disso o desvio do peso molecular de uma preparação de albumina de soro de humano (HSA) após PEGilação (a PEGilação foi realizada de acordo com o Exemplo 2) é mostrado como uma preparação de referência. É demonstrado que o peso molecular de HSA está a desviar-se de 66000 Da para 190000 Da mostrando a eficácia do procedimento de PEGilação.

A Fig. 12 mostra o padrão multimérico de rVWF antes e após PEGilação com diferentes concentrações de reagente. É claramente demonstrado um alargamento e um desvio para um peso molecular mais elevado dos diferentes multímeros com concentração crescente de reagente.

Exemplo 14: PEGilação de resíduos lisina em VWF com mPEG-glutarato de succinimidilo

Para PEGilação de VWF através de resíduos lisina (Fig. 1A) preparou-se uma solução de rVWF (concentração final: 500 µg/ml) em tampão HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, 5% de sacarose) e adicionou-se mPEG-glutarato de succinimidilo (comprimento de cadeia: 5 kD) (concentração final: 200 mg de PEG-glutarato de succinimidilo/mg de proteína). Depois ajustou-se o valor de pH a 7,4 com NaOH 0,1 M. O VWF foi PEGilado durante 1 h à temperatura ambiente e purificado como descrito no Exemplo 2.

Exemplo 15: Aumento da meia-vida de FVIII em ratinhos K.O. em FVIII

Ratinhos deficientes em FVIII descritos em detalhe por Bi *et al.* (Nat. Genet. 10: 119-121, 1995) foram utilizados como modelo de hemofilia A humana severa. Grupos de 5 ratinhos receberam uma injeção bólus (10 ml/kg) através da veia caudal quer com PEG-rVWF (SS-PEG, 5K) preparado de acordo com o Exemplo 2 quer com rVWF nativo, cada um pré-misturado com FVIII recombinante para conseguir 10 U de FVIII/ml e 10 U de VWF/ml. Preparou-se plasma de citrato por punção cardíaca após anestesia a partir dos grupos respectivos, 5 min, 3, 9 e 24 h após injeção. Mediram-se a actividade de FVIII e os níveis de recuperação de antigénio VWF em amostras de plasma. Os resultados desta experiência estão sumarizados nas Figs. 13 e 14.

A meia-vida para FVIII aumentou de 1,8 h (na presença de rVWF nativo) para 3,9 h (quando aplicado em conjunto com PEG-rVWF), a área sob a curva (AUC) aumentou de 4,1 para 7,8 U*h. A meia-vida de VWF aumentou de 3,2 para 13,6 h, a AUC para VWF foi aproximadamente quadruplicada de 7,7 para 32,1 U*h.

Exemplo 16: Determinação de capacidade de ligação de FVIII de preparações VWF SS-PEGilado por diferentes métodos

A capacidade de ligação de FVIII de diferentes preparações de rVWF PEGilado foi medida por um sistema de ensaio ELISA e cromogénico combinado (ECA) utilizando uma modificação do método descrito por Bendetowicz *et al.* (Blood 92: 529-538, 1998). Placas de microtitulação foram revestidas com 200 µl de anticorpo policlonal anti-VWF 2,6 µg/mL em Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mmol/l, pH 9,6. As placas foram subsequentemente lavadas após cada passo com tampão PBS-Tween (Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6 e 0,05% de Tween 20). Bloquearam-se as placas durante 1 h a 37°C em 0,1% de leite em pó/benzamidina 2 mM em PBS-Tween. Quantidades crescentes de VWF foram pré-incubadas durante 25 min a 37°C com 0,2 U/ml de rFVIII (ADVATE, Baxter AG, Viena, Áustria), e adicionaram-se às placas 100 µl destas misturas. Após incubação, mediu-se a quantidade de FVIII ligado ao VWF capturado por ensaio cromogénico de FVIII (Technoclone,

Viena, Áustria). A capacidade de ligação de FVIII foi expressa como as alterações na absorvância medidas a 405 nm (dA405) em 1 min. A Fig. 15 mostra a ligação de FVIII dependente da dose de VWF de duas preparações de VWF PEGilado, ambos modificados com mPEG-sucinato succinimidilo. A capacidade de ligação de FVIII das preparações VWF modificado foi calculada como % das preparações VWF não modificado de partida e constatou-se que era 20% para PEG-SS-rVWF-1 e 50% para PEG-SS-rVWF-2.

A Fig. 16 mostra a capacidade de ligação de FVIII das duas preparações de PEG-SS-rVWF, conforme medida pelo método de ressonância de plasmão de superfície como descrito no Exemplo 12. A capacidade de ligação calculada foi 25 e 45%, respectivamente.

Os aumentos apropriados na massa molecular da molécula de rVWF após a conjugação de PEG-SS medidos por SDS-PAGE são demonstrados na Fig. 17.

Exemplo 17: PEGilação de grupos sulfidrilo em VWF com PEG ramificado-maleimida

Para PEGilação de VWF através de resíduos SH livres com um PEG ramificado-maleimida, prepara-se uma solução de VWF recombinante (concentração final: 500 µg/ml) em tampão HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6 contendo 3% de trealose). Depois adiciona-se um mPEG ramificado-maleimida (comprimento de cadeia: 20 kD) fornecido pela NOF Corporation (NOF Europe, Grobbendonk, Bélgica) (concentração final 10 mM). O VWF é PEGilado durante 2 h à temperatura ambiente sob agitação suave. Subsequentemente o rVWF PEGilado é separado dos reagentes por ultrafiltração/diafiltração (UF/DF) utilizando uma membrana de 100 kD consistindo de celulose regenerada (Millipore).

Exemplo 18: PEGilação de grupos carboxilo em VWF com mPEG-hidrazida/EDC

Um rVWF maturado com furina é preparado e purificado de acordo com o Exemplo 23. A preparação é dialisada contra tampão fosfato 50 mM, pH 6,2, e diluída até uma concentração

de 400 µg/ml. Depois adiciona-se mPEG-hidrazida (mPEG-Hz) com um comprimento de cadeia de 5 kD (concentração: 60 mg de mPEG-Hz/mg de VWF). Adicionam-se 30 µl de uma solução preparada de fresco de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodi-imida (EDC) 500 mM a 1 ml da mistura contendo VWF e incuba-se à temperatura ambiente sob agitação suave durante 5 h. Os reagentes são separados do rVWF PEGilado por UF/DF contra tampão HEPES 20 mM (NaCl 150 mM, pH 7,4) utilizando uma membrana de 100 kD (celulose regenerada/Millipore).

Exemplo 19: Modificação de resíduos lisina em VWF com ácido polissialílico

A modificação de resíduos lisina com ácido polissialílico (ácido colomínico, CA) foi realizada como descrito por Fernandes e Gregoriadis (Biochim. Biophys. Acta 1341: 26-34, 1997) e Jennings e Lugowski (J. Immunol. 127: 1011-1018, 1981). Agitou-se uma solução de ácido colomínico (concentração: 20 mg/ml) contendo NaIO₄ 0,1 M durante 15 min no escuro à temperatura ambiente para oxidar o CA. Adicionaram-se 2 ml de etilenoglicol por ml da solução de CA activado e agitou-se durante mais 30 min no escuro à temperatura ambiente. A solução foi dialisada de um dia para o outro contra tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,2, no escuro. Subsequentemente adicionou-se uma alíquota desta solução a uma solução de rVWF (400 µg/ml) em fosfato de sódio 0,05 M para dar uma concentração final de 50 mg de CA activado por mg de VWF. Agitou-se esta mistura durante 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Adicionou-se NaCNBH₃ (1 mg/mg de rVWF) e incubou-se a mistura durante 18 h à temperatura ambiente no escuro sob agitação suave. Adicionou-se uma solução aquosa de TRIS 1 M, pH 7,2 (50 µl por mg de NaCNBH₃) e agitou-se durante 1 h para terminar a reacção. Os reagentes livres foram separados do conjugado rVWF-ácido polissialílico por UF/DF utilizando uma membrana de 100 kD (celulose regenerada/Millipore).

A capacidade de ligação de FVIII desta preparação foi determinada como descrito no Exemplo 16.

A conjugação de rVWF com ácido polissialílico foi demonstrada pelo desvio do ponto isoelétrico (PI) detectado por focagem isoelétrica (IEF) sob condições redutoras. A Fig. 20 mostra uma comparação de uma preparação de VWF antes e após conjugação com ácido polissialílico de acordo com este exemplo. Utilizou-se o sistema Ampholine PAGplate (pH 3,5 - 9,5) de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Bioscience). A introdução de grupos ácidos pela conjugação com ácido polissialílico conduziu a uma única banda ácida para o rVWF modificado.

Determinou-se uma capacidade de ligação de FVIII de 54% como descrito no Exemplo 16 por utilização do teste ECA. Determinou-se uma capacidade de ligação de FVIII de 70% utilizando o método de ressonância de plasmão de superfície (Exemplo 12).

Exemplo 20: PEGilação sob condições de tensão de cisalhamento

Uma câmara de perfusão foi fabricada como descrito por Sakariassen et al. (J. Lab. Clin. Med. 102: 522-535, 1983) e utilizada para a PEGilação de rVWF sob condições de tensão de cisalhamento. Preparou-se uma solução de rVWF (500 µg/ml) em HEPES 20 mM, pH 7,4, contendo 3% de trealose. Depois adicionou-se mPEG-sucinato de succinimidilo (concentração final: 5 mM), ajustou-se o valor de pH com NaOH 0,1 M a 7,4 e utilizou-se de imediato para enchimento do sistema de perfusão. Depois realiza-se a PEGilação à temperatura ambiente a uma taxa de cisalhamento de 2500 s⁻¹ por utilização de uma bomba peristáltica sob as condições de perfusão descritas por Sakariassen et al. (J. Lab. Clin. Med. 102: 522-535, 1983).

Exemplo 21: Preparação de pdVWF

A preparação de pdVWF foi realizada de acordo com Thorell e Blombäck (Thromb. Res. 35: 431-450, 1984) com modificações. Para preparação de pdVWF, dissolveram-se 1,5 kg de crioprecipitado a 20-30°C em 6 litros de água. Após agitação durante 1 h, removeu-se o precipitado de fibronectina por centrifugação. Adicionaram-se 8 g de NaCl por litro de sobrenadante, aqueceu-se a solução até à

temperatura ambiente e adicionou-se reagente de reserva SD (1% de Tween 80 + 0,18% de trietilcitrate de acetilo concentração final) para inactivação do vírus.

A solução foi adicionalmente purificada numa coluna EMD-TMAE Fractogel 650 M (XK50/180) pré-equilibrada com NaCl 0,2 M, acetato de sódio 0,02 M, pH 6,5 (tampão de lavagem). Após lavagem com 20 volumes de coluna de tampão de lavagem, o VWF foi eluído com NaCl 0,5 M, Na-citrato 0,02 M, pH 6,9. Para precipitação de VWF adicionaram-se glicina (concentração final 1 M) e NaCl (concentração final 3 M). Dissolveu-se o precipitado em tampão e aplicou-se sobre uma coluna Sephacryl S-400 HR (Amersham) equilibrada em CaCl_2 0,3 M, NaCl 0,15 M, HEPES 20 mM, pH 7,4, para purificação final.

TABELA 2

Purificação de pdVWF				
Amostra	Actividade Especifica [IU de VWF:Ag/mg de proteína]	VWF:CB/VWF:Ag [IU/IU]	VWF:RCo/VWF:Ag [IU/IU]	VWF:RCo/FVIII Ag [IU/IU]
Material de partida (n=2) (Crioprecipitado suspenso de novo)	1,3	0,35	0,17	0,33
Sobrenadante de centrifugação (n=2)	2,3	0,34	0,19	0,39
Fractogel EMD-TMAE 650 M (n=2)	191	0,72	0,47	0,77
Sephacryl S-400 HR (n=2)	192	0,91	0,56	40

Exemplo 22: PEGilação de resíduos lisina em pdVWF com PEG-SS

O PdVWF foi preparado de acordo com o Exemplo 21 e diluído com tampão HEPES 20 mM pH 7,4 (contendo NaCl 150 mM e 3% de sacarose) até uma concentração final de 400 µg/ml. Depois adicionou-se mPEG-sucinato de succinimidilo (comprimento de cadeia: 5 kD) (concentração: 10 mg PEG-SS

5000/mg VWF) e o pdVWF foi PEGilado durante 1 h à temperatura ambiente. Depois o reagente foi separado do PEGilado VWF por UF/DF utilizando uma membrana de 100 kD consistindo de celulose regenerada (Millipore).

Exemplo 23: Maturação com furina e purificação do rVWF maturado com furina

Trataram-se 143 kg da fracção não retida de uma coluna de anticorpo anti-FVIII, derivada de um processo de fermentação e purificação de rFVIII, com furina para remoção do pró-peptido como descrito por Schlokot *et al.* (Biotechnol. Appl. Biochem. 24: 257-267, 1996) e submeteu-se a filtração asséptica. O processo foi baseado em trabalho anterior (Fischer *et al.*, FEBS Lett. 375: 259-262, 1995; Fischer *et al.* PCT/AT98/00034[WO 98/38219], 1-33, 1998, 18-2-1998 e Kaersgaard e Barington, J. Chromatogr. B 715: 357-367, 1998).

Após diluição 1 para 4 com água a 16 mS/cm, 633 kg de solução diluída foram aplicados sobre uma coluna XK50/15 EMD-TMAE-Fraktogel 650M (300 ml de gel; Merck; #K14540281) equilibrada com Tris 10 mM, NaAc 100 mM, NaCl 86 mM, pH 6,5, mS/cm (tampão de equilíbrio). A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio e eluída com NaAc 100 mM, NaCl 250 mM, glicina 100 mM, CaCl₂ 3 mM.

Filtraram-se 4506 g de eluato de TMAE sobre Sartoclean GF (0,8 & 0,65 µm) e Sartobran P (0,45 & 0,2 µm), diluiu-se de 1 para 1,5 até 29 mS/cm e bombeou-se através de um filtro Mustang Q (#IH18770932) para remoção de ADN. Após tratamento de SD durante 60 min a 22+/-2°C e diluição de 1 para 2 com água até 16 mS/cm, e aplicou-se a solução a uma coluna Amicon 70/29 UNOsphere S (600 ml de gel; Bio-Rad, #78960C) equilibrada com tampão de equilíbrio do passo de TMAE. Lavou-se a coluna com tampão de equilíbrio e eluiu-se com tampão de eluição do passo de TMAE.

Concentraram-se 3223 g de eluato de UNO-S 15 vezes por ultrafiltração utilizando uma membrana de 0,1 m² de 30 kDa (Hydrosart #01080217, Sartorius) consistindo de celulose regenerada. Finalmente 201 g do concentrado foram purificados por cromatografia de exclusão de tamanhos numa coluna

XK50/86.5 Superose 6 Prep Grade equilibrada com NaAc 100 mM, NaCl 500 mM, pH 7,0 (1698 ml de gel; GE Healthcare #17-0489-01).

TABELA 3
Purificação de rVWF processado com furina

Amostra	Actividade específica [IU de VWF:Ag/mg de proteína]	VWF:CB/VWF:Ag [IU/IU]	CHO/VWF:Ag [ng/IU]	Factor de purificação (CHO)	Factor de purificação por passo (CHO)	VWF:RCo/FVIII Ag [IU/IU]
Material de partida (n=4)	1	0,75	23678	1,0	1	0,69
1. Eluato de TMAE (n=5)	34	0,84	2766	8,6	8,6	0,62
Mustang Q (n=4)	44	0,70	2405	10	1,1	0,47
Eluato UNO-S (n=4)	121	0,71	329	72	7,3	0,40
Superose 6 PG (n=2)	160	0,99	4	6150	85	0,39

Exemplo 24: PEGilação de rVWF maturado com furina

O VWF maturado com furina foi preparado de acordo com o Exemplo 23 e dialisado contra tampão HEPES 20 mM pH 7,4 (contendo NaCl 150 mM e 3% de sacarose). Depois diluiu-se a solução até uma concentração final de 300 µg/ml com tampão HEPES 20 mM pH 7,4 (contendo NaCl 150 mM e 3% de sacarose). Subsequentemente adicionou-se mPEG-sucinato de succinimidilo (comprimento de cadeia: 5 kD) (concentração: 25 mg de PEG-SS 5000/mg de VWF) e o VWF maturado com furina foi PEGilado durante 1 h à temperatura ambiente. Depois o reagente foi separado do VWF PEGilado por UF/DF utilizando uma membrana de 100 kD consistindo de celulose regenerada (Millipore).

Exemplo 25: Caracterização in vitro do rVWF maturado com furina

A capacidade de ligação de FVIII do rVWF maturado com furina foi determinada por tecnologia de ressonância de plasmão de superfície e por ECA, como descrito no Exemplo 12 e Fig. 15, respectivamente. Os resultados foram comparados com preparações de VWF derivados de plasma isentas de albumina preparadas de acordo com o Exemplo 21.

Como demonstrado nas Figs. 18 e 19, a capacidade de ligação de FVIII do rVWF maturado com furina era comparável à de uma preparação de referência derivada de plasma.

Exemplo 26: Conjugação de VWF com ácido polissialílico por ligação cruzada com glutaraldeído

Para a conjugação de rVWF com ácido polissialílico (ácido colomínico) utilizando glutaraldeído como reagente de ligação cruzada (Migneault *et al.*, *Biotechniques* 37: 790-796, 2004), preparam-se 4 ml de uma solução de ácido colomínico (concentração: 20 mg/ml) em tampão HEPES 20 mM (NaCl 150 mM, pH 7,4) e ajusta-se o pH a 7,4 por adição de NaOH 0,1 M. Adiciona-se glutaraldeído para dar uma concentração final de 0,01%. Subsequentemente adiciona-se 1 ml de uma solução de rVWF (400 µg/ml) em tampão HEPES 20 mM (NaCl 150 mM, pH 7,4) em alíquotas de 100 µl e incuba-se a mistura durante 1 h sob agitação suave. Depois dialisa-se a mistura, adiciona-se trealose (concentração final: 3%) e concentra-se o conjugado de rVWF-ácido polissialílico por ultrafiltração.

Exemplo 27: Aumento da meia-vida de VWF em ratinhos deficientes em VWF

Ratinhos deficientes em VWF descritos por Denis *et al.* (PNAS 95: 9524-9529, 1998) foram utilizados como um modelo animal de VWD de humano. Grupos de 5 ratinhos receberam uma injeção bólus (10 ml/kg) através da veia caudal quer com conjugado de rVWF-ácido polissialílico preparado de acordo com o Exemplo 19 quer com rVWF nativo para conseguir 100 U de VWF:Ag/kg. Preparou-se plasma de citrato por punção cardíaca após anestesia a partir dos grupos respectivos, 5 min, 1, 3, 6, 9 e 21 h após injeção. Mediram-se a recuperação de antígeno VWF e os níveis de actividade de FVIII endógeno de ratinho nas amostras de plasma. Os resultados desta experiência estão sumarizados nas Figs. 21 e 22.

A meia-vida de VWF foi calculada utilizando o programa MicroMath Scientist (Micromath Research, Saint Louis, MO, E.U.A.) utilizando o modelo de um compartimento a partir da biblioteca farmacocinética. A área sob a curva para a

actividade de FVIII foi calculada por um modelo trapezoidal com subtração da linha de base.

A meia-vida de VWF aumentou de 1,3 h (rVWF nativo) para 2,4 h (conjugado de rVWF-ácido polissialico), a AUC para FVIII aumentou de 3,3 U*h/ml para 5,3 U*h/ml respectivamente.

Exemplo 28: Acoplamento de mPEG-propionaldeído a grupos lisina por aminação reductiva

Prepara-se uma solução de rVWF (400 µg/ml) em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,2 e adiciona-se mPEG-propionaldeído (comprimento de cadeia 5 kDa) para dar uma concentração final de 10 mg de mPEG-propionaldeído por mg de VWF. Agita-se esta mistura durante 30 minutos. Depois adiciona-se NaCNBH₃ (1 mg/mg de rVWF) e incuba-se a mistura durante 15 h à temperatura ambiente sob agitação suave. Adiciona-se uma solução aquosa de TRIS 1 M pH 7,2 (50 µl per mg NaCNBH₃) e agita-se durante 1 h para terminar a reacção. Subsequentemente, o rVWF PEGilado é separado dos reagentes por ultrafiltração/diafiltração utilizando uma membrana de 100 kD (celulose regenerada/ Millipore).

Exemplo 29: PEGilação N-terminal de VWF

A PEGilação N-terminal de rVWF é realizada como descrito por Lee et al. (Pharm. Res. 20: 818-825, 2003). Prepara-se uma solução de rVWF (concentração final: 500 µg/ml) em tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, e adiciona-se mPEG-propionaldeído (comprimento de cadeia: 5kD) (concentração: 10 mg de mPEG-propionaldeído/mg de VWF). A PEGilação é realizada durante 24 h à temperatura ambiente na presença de NaCNBH₃ 2 mM como agente redutor. Subsequentemente, o rVWF PEGilado é separado dos reagentes por ultrafiltração/diafiltração utilizando uma membrana de 100 kD (celulose regenerada/ Millipore).

Exemplo 30: PEGilação sequencial de resíduos lisina e resíduos SH de rVWF

O rVWF é PEGilado através de resíduos lisina com mPEG-sucinato de succinimidilo (comprimento de cadeia: 5 kD) de

acordo com o Exemplo 2. A PEGilação é realizada à temperatura ambiente durante 1 h e os reagentes livres são separados do conjugado rVWF-PEG por UF/DF contra tampão HEPES 20 mM, pH 7,4, contendo 5% de sacarose utilizando uma membrana de 100 kD (celulose regenerada/Millipore). Depois ajusta-se o valor de pH da solução a 7,6 com NaOH 0,1 M e adiciona-se mPEG-maleimida (comprimento de cadeia 5 kD/concentração final 10 mM) para PEGilação de grupos SH livres. A PEGilação é realizada durante 2 h à temperatura ambiente sob agitação suave. Depois os reagentes são de novo separados da mistura reaccional utilizando uma membrana de 100 kD (celulose regenerada/ Millipore).

Exemplo 31: Oxidação enzimática de resíduos carboidrato e PEGilação subsequente com PEG-Hz

A oxidação enzimática de resíduos carboidrato (Wilchek e Bayer, Meth. Enzymol. 138; 429-442, 1987) em rVWF para criar grupos aldeído é realizada como descrito por Avigad et al. (J. Biol. Chem. 237: 2736-43, 1962) por utilização de galactose-oxidase de *Dactylium dendroides* (Sigma). A solução obtida é dialisada contra tampão fosfato 50 mM, pH 7,2, e diluída até uma concentração de VWF de 400 µg/ml. Depois adiciona-se mPEG-hidrazida (mPEG-Hz) com um comprimento de cadeia de 5 kD (concentração final: 40 mg de mPEG-Hz/mg de VWF). Incuba-se a mistura à temperatura ambiente sob agitação suave durante 3 h. Os reagentes são separados do rVWF PEGilado por UF/DF contra tampão HEPES 20 mM (150 mM NaCl, pH 7,4) contendo 5% de sacarose utilizando uma membrana de 100 kD (celulose regenerada/Millipore).

Exemplo 32: PEGilação de rVWF com bloqueio do local de ligação de FVIII por rFVIII

Para preparação de rVWF PEGilado com local de ligação de FVIII não modificado, preparam-se 3 ml de uma solução contendo rFVIII (200 U/ml) e rVWF (40 U de VWF:Ag/ml) em tampão HEPES 50 mM (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, 2% de trealose, pH 7,4) e incubou-se durante 1 h a 37°C. Arrefece-se a mistura até à temperatura ambiente e adiciona-se PEG-sucinato de sucinimidilo (PEG-SS/comprimento de cadeia: 5 kD) (concentração final: 1 mg de PEG-SS/U de VWF:Ag) e incuba-se

durante 1 h sob agitação suave. Depois adiciona-se CaCl_2 sob agitação suave para dar uma concentração final de 400 mM. Esta solução é aplicada sobre uma coluna cromatográfica (2,6 x 80 cm) cheia com Sephacryl S-400 HR (Amersham) e o rVWF PEGilado com um local de ligação para FVIII livre é separado do rFVIII por cromatografia de exclusão de tamanhos (tampão de eluição: tampão HEPES 50 mM, CaCl_2 400 mM, pH 7,4).

Exemplo 33: PEGilação de rVWF com bloqueio do local de ligação de FVIII por heparina

Preparam-se de 5 ml de uma solução de rVWF (300 µg/ml) em tampão HEPES 50 mM, pH 7,4, e adicionam-se a 2 ml de uma suspensão de heparina-Sepharose CL-6B (Amersham Bioscience) no mesmo tampão. Incuba-se esta mistura durante 2 h sob agitação suave e o VWF é ligado ao gel (de Romeuf de Mazurier, Thromb. Hamost. 69: 436-440, 1993). Subsequentemente adiciona-se mPEG-sucinato de succinimidilo (200 mg/mg de VWF) à mistura e a PEGilação é realizada à temperatura ambiente sob agitação suave durante 1 h. Dilui-se a mistura com um volume igual de tampão HEPES, pH 7,4, contendo NaCl 2 M. Separa-se o gel do sobrenadante por filtração. Depois lava-se o gel 3x com 2 ml de tampão HEPES, pH 7,4 (HEPES 20 mM, NaCl 1 M) e combinam-se o sobrenadante e as soluções de lavagem. Subsequentemente a solução contendo o VWF PEGilado é concentrada por ultrafiltração e diafiltração contra tampão HEPES 20 mM, pH 7,4 (NaCl 150 mM, 3% de sacarose) utilizando uma membrana de 100 kD consistindo de celulose regenerada (Millipore). O derivado obtido mostra plena capacidade de ligação de FVIII utilizando a tecnologia Biacore ou o teste ECA (os sistemas de teste estão descritos no Pedido de Patente Provisório dos E.U.A. N.º de Série 60/668 378 depositado em 4 de Abril de 2005).

Exemplo 34: Conjugação de VWF com ácido hialurónico

A modificação de resíduos lisina com ácido hialurónico (HA) foi realizada por aminação redutiva utilizando ácido hialurónico da Sigma (C 53747). Dissolveu-se HA numa solução preparada de fresco de NaIO_4 0,1 M para dar uma concentração final de 5 mg de HA/ml. Depois realizou-se a oxidação durante 15 min no escuro sob agitação suave. Parou-se a reacção pela

adição de 2 ml de etilenoglicol por ml de solução de HA oxidado e agitação adicional durante 30 min no escuro à temperatura ambiente. A solução foi dialisada de um dia para o outro contra tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,2 no escuro a 4°C. Subsequentemente adicionou-se uma alíquota desta solução a uma solução de rVWF (40 U de VWF:Ag/ml) em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,2 para dar uma concentração final de 50 mg de HA activado por mg de proteína. Agitou-se esta mistura durante 120 min à temperatura ambiente no escuro. Adicionou-se NaCNBH₃ (1 mg/mg de proteína) e incubou-se a mistura durante 18 h à temperatura ambiente no escuro sob agitação suave. Depois adicionaram-se 100 µl de tampão Tris 1 M, pH 7,2, per ml desta mistura e agitou-se durante 1 h para terminar a reacção. Os reagentes livres foram separados do conjugado de rVWF-HA por UF/DF utilizando uma membrana de 100 kD (celulose regenerada/Millipore).

Exemplo 35: Caracterização bioquímica in vitro de VWF conjugado com PSA

O rVWF foi polissialilado de acordo com o Exemplo 19. Para além dos parâmetros descritos neste exemplo, tais como focagem isoeléctrica (Fig. 20), determinou-se a capacidade de ligação de FVIII pelo teste ECA (54%) de acordo com o Exemplo 16 e por ressonância de plasmão de superfície (70%) de acordo com o Exemplo 12 e calculou-se a razão VWF:RCo/VWF:Ag. O nível de antigénio de VWF foi determinado pela utilização de um sistema de ensaio disponível comercialmente (Asserachrom vWF, Roche, Basel, Suíça). A actividade funcional da preparação foi determinada pelo ensaio de cofactor de ristocetina como descrito por Macfarlane *et al.* (Thromb. Diath. Haemorrh 34: 306-308, 1975). A razão de 0,39 calculada para o material de partida rVWF diminui para 0,13 após polissialilação.

Exemplo 36: Conjugação de rVWF com PEG ramificado através de resíduos lisina

Preparou-se uma solução de um rVWF maduro (35 U de VWF:Ag/ml) em tampão HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, contendo 0,5% de sacarose de acordo com o Exemplo 23. Depois

adicionou-se mPEG ramificado-glutarato de succinimidilo (PEG-SG / comprimento de cadeia: 20 kD) fornecido pela NOF Corporation (NOF Europe, Grobbendonk, Bélgica) a esta solução sob agitação suave (5 mg de PEG-SG/mg de proteína) e ajustou-se o valor de pH a 7,4 por adição gota-a-gota de NaOH 0,5 M. Depois a PEGilação foi realizada sob agitação suave durante 1 h à temperatura ambiente. Subsequentemente a mistura reaccional foi aplicada sobre uma resina de cromatografia de permuta iónica equilibrada (Fractogel EMD TMAE 650 M) em tampão HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, contendo 0,5% de sacarose. Depois lavou-se a coluna com 20 CV (volumes de coluna) de tampão de equilíbrio para remover reagente em excesso e o rVWF PEGilado foi eluído com tampão de eluição (HEPES 20 mM, NaCl 0,5 M, 0,5% de sacarose, pH 7,4). O eluato foi concentrado por ultrafiltração/diafiltração com uma membrana consistindo de celulose regenerada e com um corte de peso molecular de 100 kD utilizando um sistema tampão consistindo de HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5% de sacarose, pH 7,4. O derivado PEGilado obtido mostrou uma razão VWF:RCo/VWF:Ag ligeiramente diminuída de 0,79 em comparação com o material de partida rVWF (razão VWF:RCo/VWF:Ag: 0,89). Além disso, o material de partida de rVWF PEGilado tinha uma capacidade de ligação de FVIII de 83% conforme medida pelo teste ECA (Exemplo 16).

Exemplo 37: Farmacocinética de VWF conjugado com PEGs ramificados em ratinhos K.O. em FVIII

Ratinhos deficientes em FVIII (Bi et al., Nat. Genet.10: 119-121, 1995) foram utilizados como modelo de hemofilia A humana severa. Grupos de 5 ratinhos receberam uma injeção bólus (10 ml/kg) através da veia caudal quer com uma mistura de PEG-rVWF (PEG ramificado, SG) e rFVIII quer com uma mistura de rVWF nativo e rFVIII para conseguir 30 U de FVIII/ml e 25 U de VWF/ml. Cinco min, 3, 9, 24 e 32 h após injeção preparou-se plasma de citrato a partir dos grupos respectivos por punção cardíaca após anestesia. Mediram-se a recuperação de antigénio VWF e os níveis de actividade de FVIII em amostras de plasma. As curvas de eliminação para VWF e FVIII são apresentadas na Fig. 23 e na Fig. 24. A meia-vida de VWF aumentou de 1,4 para 9,7 h, a AUC para VWF aumentou de 11,8 para 49,2 U*h/ml. A meia vida para FVIII aumentou de 1,2

h (na presença de rVWF nativo) para 4,4 h (quando aplicado em conjunto com PEG-rVWF), a área sob a curva (AUC) aumentou de 12,1 para 30,5 U*h/ml.

Exemplo 38: Farmacocinética comparativa de FVIII misturado com diferentes quantidades de PEG-VWF em ratinhos K.O. em FVIII

Grupos de 5 ratinhos K.O. deficientes em FVIII receberam uma injeção bólus (10 ml/kg) através da veia caudal com várias misturas de PEG-rVWF (PEGilação de resíduos lisina com 25 mg de PEG ramificado-SG 20000/mg de proteína) e rFVIII (A: 20 IU de PEG-rVWF/ml + 20 IU de FVIII/ml; B: 10 IU de PEG-rVWF/ml + 20 IU de FVIII/ml; C: 3 IU de PEG-rVWF/ml + 20 IU de FVIII/ml). Para o rVWF PEGilado calculou-se uma razão de 3 mole de PEG/mole de lisina. Comparando as mesmas quantidades (com base nas unidades) de PEG-rVWF e rFVIII nas diferentes misturas de PEG-rVWF/rFVIII puderam ser calculadas as razões PEG/FVIII seguintes: 3:1 (A); 1,5:1 (B); 0,45:1 (C). Após anestesia preparou-se plasma de citrato por punção cardíaca a partir dos grupos respectivos 5 min, 1, 3, 9 e 24 h após injeção. Não foi identificada qualquer diferença relevante na meia-vida (A: 2,1 h, B: 2,0 h, C: 2,5 h) e na AUC (A: 18,9, B: 14,5 e C: 13,2 U*h/ml) de FVIII. As curvas de eliminação para FVIII são apresentadas na Fig. 25.

Exemplo 39: Farmacocinética comparativa utilizando preparações de PEG-VWF com diferentes graus de PEGilação

Ratinhos duplamente *knockout* FVIII x VWF foram obtidos por cruzamento de ratinhos deficientes em FVIII e ratinhos deficientes em VWF. Esses ratinhos padecem de deficiência em FVIII bem como de deficiência em VWF. Grupos de 5 ratinhos duplamente *knockout* FVIII x VWF foram perfundidos através da veia caudal com uma mistura de rVWF nativo/rFVIII (100/150 IU/kg) ou com rVWF PEGilado #A misturado com rFVIII (100/150 IU/kg) ou com rVWF PEGilado #B misturado com rFVIII (150/150 IU/kg). O PEG-rVWF #A (5 mg de PEG-SS 5000/mg de proteína) e o PEG-rVWF #B (20 mg de PEG-SS 5000/mg de proteína) foram preparados de acordo com o Exemplo 24. Para a preparação #A foi calculada uma razão de 2,5 mole de PEG/mole de lisina e para a preparação #B foi calculada uma razão de 10 mole de

PEG/mole de lisina. Para isto prepararam-se amostras de plasma de citrato 5 min, 1, 3, 9 e 24 h após aplicação da amostra. Mediram-se os níveis no plasma de VWF:Ag e a actividade de FVIII e exprimiram-se como percentagem do nível máximo no plasma, geralmente atingido 5 min após injeção. As curvas de eliminação para VWF e FVIII são apresentadas na Fig. 26 e na Fig. 27, respectivamente. A meia-vida foi 6,3 h e 8,1 h para PEG-rVWF #A e #B respectivamente. Para o rVWF nativo foi calculada uma meia-vida de 2,0 h. A AUC normalizada (% do máximo x h) para ambos os rVWF PEGilados aumentou de 360%*h (rVWF nativo) para 901%*h (#A) e 1064 %*h (#B). O tempo na circulação para rFVIII co-perfundido foi melhorado por rVWF PEGilado em comparação com VWF nativo. A meia-vida de FVIII era 0,8 h na presença de rVWF nativo e aumentou para 1,5 e 1,8 h quando perfundido com rVWF PEGilado #A e #B respectivamente. A AUC para FVIII foi 214, 370 e 358 %*h.

Exemplo 40: PEGilação de dímero de VWF

Preparou-se uma solução de um dímero de VWF (58 IU de VWF:Ag/ml), que foi purificado a partir do meio condicionado de uma linha de células CHO recombinante (Baxter BioScience), em tampão HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, contendo 0,5% de sacarose. Depois adicionou-se mPEG ramificado-glutarato de succinimidilo (PE-SG/comprimento de cadeia: 20 kD) fornecido pela NOF Corporation a esta solução sob agitação suave (5 mg de PEG-SG/mg de proteína) e ajustou-se o valor de pH a 7,4 por adição gota-a-gota de NaOH 0,5 M. A PEGilação foi realizada sob agitação suave durante 1 h à temperatura ambiente. Subsequentemente a mistura reaccional foi aplicada sobre uma resina de cromatografia de permuta iónica (Fractogel EMD TMAE 650 M) equilibrada em tampão HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, contendo 0,5% de sacarose. Depois lavou-se a coluna com 20 CV (volumes de coluna) de tampão de equilíbrio para remover reagente em excesso e o dímero de rVWF PEGilado foi eluído com tampão de eluição (HEPES 20 mM, NaCl 0,5 M, 0,5% de sacarose, pH 7,4). O eluato foi concentrado por ultrafiltração/diafiltração com uma membrana consistindo de celulose regenerada (Millipore) e com um corte de peso molecular de 100 kD utilizando um sistema tampão

consistindo de HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5% de sacarose, pH 7,4.

Exemplo 41: PEGilação e caracterização in vitro de multímero de rVWF de número baixo

Purificou-se rVWF maduro de acordo com o Exemplo 23. O procedimento de purificação incluiu passos de cromatografia de permuta iónica bem como um passo final de filtração em gel em Superose 6, realizado em HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, onde o multímero de rVWF de número elevado (multímero de 17) foi eluído no volume vazio. A análise do multímero de VWF foi realizada de acordo com Ruggeri e Zimmerman (Blood 57: 1140-43, 1981) utilizando um gel de agarose a 1,0%. Uma preparação de multímero de rVWF de número baixo (multímero de 6) foi obtida a partir de uma fracção secundária, com eluição para tempos de retenção mais elevados. Esta fracção foi estabilizada por adição de 0,5% de sacarose, pH 7,4. Depois o multímero de rVWF de número baixo foi PEGilado utilizando mPEG-sucinato de sucinimidilo (PEG-SS). Adicionou-se o PEG-SS a esta solução sob agitação suave (5 mg de PEG-SS/mg de proteína) e ajustou-se o valor de pH a 7,4 por adição gota-a-gota de NaOH 0,5 M. A PEGilação foi realizada sob agitação suave durante 1 h à temperatura ambiente. Subsequentemente o reagente em excesso foi removido por ultrafiltração/diafiltração com uma membrana consistindo de celulose regenerada e com um corte de peso molecular de 100 kD utilizando um sistema tampão consistindo de HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5% de sacarose, pH 7,4. A capacidade de ligação de FVIII determinada pelo ensaio ECA de acordo com o Exemplo 16 diminuiu ligeiramente de 49% para o material de partida para 34% para a preparação de PEGilado. A razão VWF:RCo/VWF:Ag de 0,02 medida para o multímero de rVWF de número baixo não foi afectada pelo procedimento de PEGilação.

Exemplo 42: Derivatização de VWF com epítomos de ligação de FVIII bloqueados reversivelmente (bloqueio com FVIII e heparina)

Encheu-se uma coluna cromatográfica (15 mm x 148 mm) com Heparin HyperD (Bio-Septra) e equilibrou-se com um tampão de equilíbrio consistindo de HEPES 20 mM, NaCl 68 mM, 0,5% de

sacarose, pH 7,4. Depois uma solução de rVWF madura (48 IU de VWF:Ag/ml) em HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5% de sacarose foi diluída com H₂O para dar uma condutividade de 7-8 mS/cm e aplicada sobre esta coluna utilizando um caudal linear de 1,5 cm/min. Subsequentemente mPEG ramificado-glutarato de succinimidilo (comprimento de cadeia: 20 kD) fornecido pela NOF Corporation (NOF Europe, Grobbendonk, Bélgica) foi dissolvido de fresco em 15 ml de tampão de equilíbrio para dar uma concentração final de 5 mg de PEG-SG/mg de proteína ligada. Depois bombeou-se esta solução de reagente sobre a coluna e a PEGilação foi realizada durante 2 horas sob condições estáticas. Depois lavou-se a coluna com 10 CV (volumes de coluna) de tampão de equilíbrio contendo 0,05% de lisina. Depois o rVWF PEGilado com o epítipo de ligação de FVIII protegido foi eluído com um tampão consistindo de HEPES 20 mM, NaCl 1 M, 0,5% de sacarose, pH 7,4. Finalmente esta solução foi concentrada por ultrafiltração/diafiltração contra tampão HEPES 20 mM, pH 7,4 (NaCl 150 mM, 0,5% de sacarose) utilizando uma membrana de 100 kD consistindo de celulose regenerada (Millipore). O derivado obtido mostrou uma razão VWF:RCo/VWF:Ag de 0,48, que era idêntica à do material de partida de rVWF (razão 0,47). Em contraste com o procedimento de PEGilação de rVWF com PEG ramificado-SG 20000 como descrito no Exemplo 36, a capacidade de ligação de FVIII não foi afectada por este procedimento de PEGilação com protecção do epítipo de FVIII conforme medida pelo teste ECA (Exemplo 16).

Exemplo 43: Conjugação de VWF com PEG degradável através de resíduos lisina

Um rVWF maduro é purificado de acordo com o Exemplo 23. Depois prepara-se uma solução deste rVWF (40 U de VWF:Ag/ml) em tampão HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, contendo 0,5% de sacarose. Subsequentemente a PEGilação é realizada por adição de mPEG-éster de N-hidroxissuccinimida de ácido (carboximetil)-3-hidroxi-butanóico (comprimento de cadeia: 5 kD) a esta solução sob agitação suave (5 mg de PEG-reagente/mg de proteína) e ajusta-se o valor de pH a 7,4 por adição gota-a-gota de NaOH 0,5 M. Depois a reacção de PEGilação é realizada sob agitação suave durante 1 h à temperatura ambiente. Subsequentemente separa-se o reagente

em excesso do rVWF PEGilado por ultrafiltração/diafiltração com uma membrana consistindo de celulose regenerada e com um corte de peso molecular de 100 kD utilizando um sistema tampão consistindo de HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5% de sacarose, pH 7,4.

Lisboa, 2013-10-30

REIVINDICAÇÕES

1. Construção proteica que não está ligada a Factor VIII (FVIII) para utilização no tratamento de um distúrbio hemorrágico associado a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII e VWF num mamífero por prolongamento da meia-vida *in vivo* de FVIII endógeno no sangue do mamífero;

onde a construção proteica compreende

- (a) uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um precursor, subunidade ou fragmento de VWF possuindo uma actividade biológica de VWF conforme determinado num ensaio de cofactor de ristocetina ou num ensaio de ligação de colagénio, e seus dímeros e multímeros; e
- (b) pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável ligada à referida molécula de VWF;

a referida construção possuindo a capacidade de ligação da molécula de FVIII endógena do mamífero, onde quando administrada ao mamífero a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de VWF e a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII endógeno ligada à referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII ligada a VWF não ligado a pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável.

2. Construção proteica que não está ligada a Factor VIII (FVIII) para utilização no tratamento de um distúrbio hemorrágico associado a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII e VWF num mamífero por prolongamento da meia-vida *in vivo* de FVIII ou um precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII no sangue do mamífero;

onde a construção proteica compreende

- (a) uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um precursor, subunidade ou fragmento de VWF possuindo uma

actividade biológica de VWF conforme determinado num ensaio de cofactor de ristocetina ou num ensaio de ligação de colagénio, e seus dímeros e multímeros; e

- (b) pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável ligada à referida molécula de VWF;

onde é administrada ao mamífero uma primeira dose de pelo menos uma molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII;

onde a referida construção tem a capacidade de ligação à molécula de FVIII administrada ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII, onde quando administrada ao mamífero a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de VWF e a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII administrada ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII ligados à referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento ligados a VWF não ligado a pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável.

3. Molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII para utilização no tratamento de um distúrbio hemorrágico associado a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII e VWF num mamífero por prolongamento da meia-vida *in vivo* de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII no sangue do mamífero;

onde é administrada ao mamífero uma primeira dose de pelo menos uma construção proteica que não está ligada a FVIII e que compreende:

- (a) uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um precursor, subunidade ou fragmento de VWF possuindo uma actividade biológica de VWF conforme determinado num ensaio de cofactor de ristocetina ou num ensaio de ligação de colagénio, e seus dímeros e multímeros; e

- (b) pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável ligada à referida molécula de VWF;

onde a referida construção tem a capacidade de ligação à molécula de FVIII administrada ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII, onde quando administrada ao mamífero a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de VWF e a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII administrada ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII ligados à referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento ligados a VWF não ligado a pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável.

4. Complexo para utilização no tratamento de um distúrbio hemorrágico associado a defeitos funcionais ou deficiências de pelo menos um de FVIII e VWF num mamífero por prolongamento da meia-vida *in vivo* de FVIII ou um precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII no sangue de um mamífero;

onde o complexo compreende:

uma construção proteica compreendendo

- (a) uma molécula de VWF seleccionada entre o grupo consistindo de factor de von Willebrand (VWF) plasmático, VWF recombinante, um precursor, subunidade ou fragmento de VWF possuindo uma actividade biológica de VWF conforme determinado num ensaio de cofactor de ristocetina ou num ensaio de ligação de colagénio, e seus dímeros e multímeros; e
- (b) pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável ligada à referida molécula de VWF; e

uma molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII ligada à construção proteica;

onde quando administrada ao mamífero a meia-vida *in vivo* da referida construção é aumentada em comparação com a meia-vida *in vivo* da molécula de VWF e a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII ligados à referida construção é aumentada em comparação

com a meia-vida *in vivo* da molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento ligados a VWF não ligado a pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável.

5. Construção proteica para utilização de acordo com a reivindicação 2 ou a molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII para utilização de acordo com a reivindicação 3, onde a molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII é administrada ou para administração simultaneamente com a referida construção proteica.

6. Construção proteica para utilização de acordo com a reivindicação 2 ou a molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII para utilização de acordo com a reivindicação 3, onde a molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII é administrada ou para administração sequencialmente antes ou após a administração da referida construção proteica.

7. Construção proteica para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou a molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII para utilização de acordo com a reivindicação 3, ou o complexo para utilização de acordo com a reivindicação 4, onde a referida pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável está ligada a um resíduo de carboidrato do referido VWF ou referido precursor, subunidade ou fragmento de VWF.

8. Construção proteica para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou a molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII para utilização de acordo com a reivindicação 3, ou o complexo para utilização de acordo com a reivindicação 4, onde a referida pelo menos uma molécula de polímero fisiologicamente aceitável está ligada a um resíduo lisina do referido VWF ou referido precursor, subunidade ou fragmento de VWF.

9. Construção proteica para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou a molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII para utilização de acordo com a reivindicação 3, ou o complexo para utilização de acordo com a reivindicação 4, onde a referida molécula de polímero fisiologicamente aceitável é seleccionada entre o grupo consistindo de poli(alquilenoglicol), poli(propilenoglicol), copolímeros de etilenoglicol e propilenoglicol, poli(poliol oxietilado), poli(álcool olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmetacrilamida), poli(hidroxiálquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(álcool vinílico), polifosfazeno, polioxazolina e poli(N-acrilóilmorfolina).

10. Construção proteica para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou a molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII para utilização de acordo com a reivindicação 3, ou o complexo para utilização de acordo com a reivindicação 4, onde a referida molécula de polímero fisiologicamente aceitável é polietilenoglicol (PEG) ou um seu derivado.

11. Construção proteica para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou a molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII para utilização de acordo com a reivindicação 3, ou o complexo para utilização de acordo com a reivindicação 4, onde a referida molécula de polímero fisiologicamente aceitável é ácido polissialico (PSA) ou um ser derivado.

12. Construção proteica para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou a molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII para utilização de acordo com a reivindicação 3, ou o complexo para utilização de acordo com a reivindicação 4, onde o referido VWF compreendido na referida construção mantém a actividade biológica de VWF

conforme determinado num ensaio de cofactor de ristocetina ou num ensaio de ligação de colagénio.

13. Construção proteica para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou a molécula de FVIII ou precursor, subunidade ou fragmento de FVIII possuindo a actividade biológica de FVIII para utilização de acordo com a reivindicação 3, ou o complexo para utilização de acordo com a reivindicação 4, onde o referido VWF ou referido precursor, subunidade ou fragmento de VWF é um produto recombinante.

Lisboa, 2013-10-30

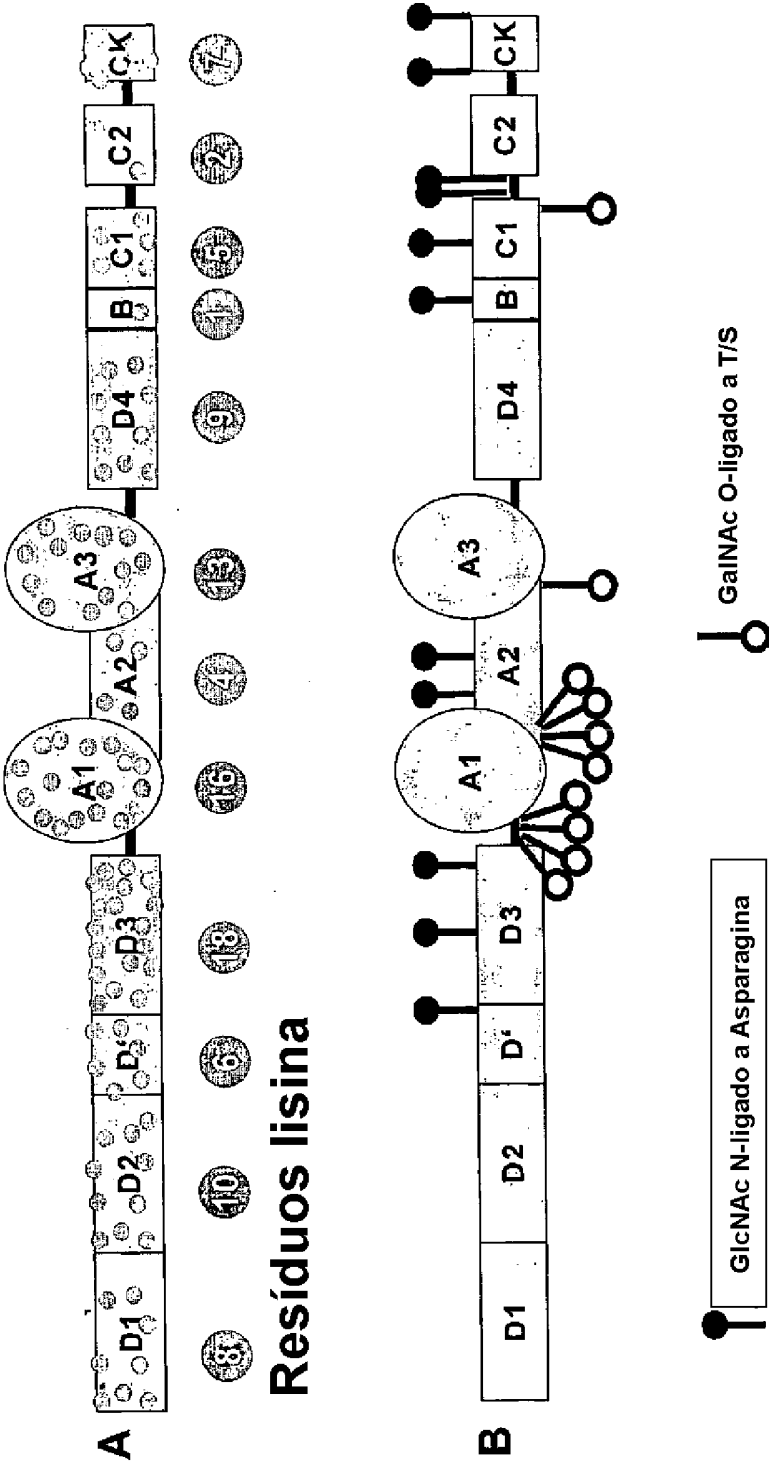


Figura 1

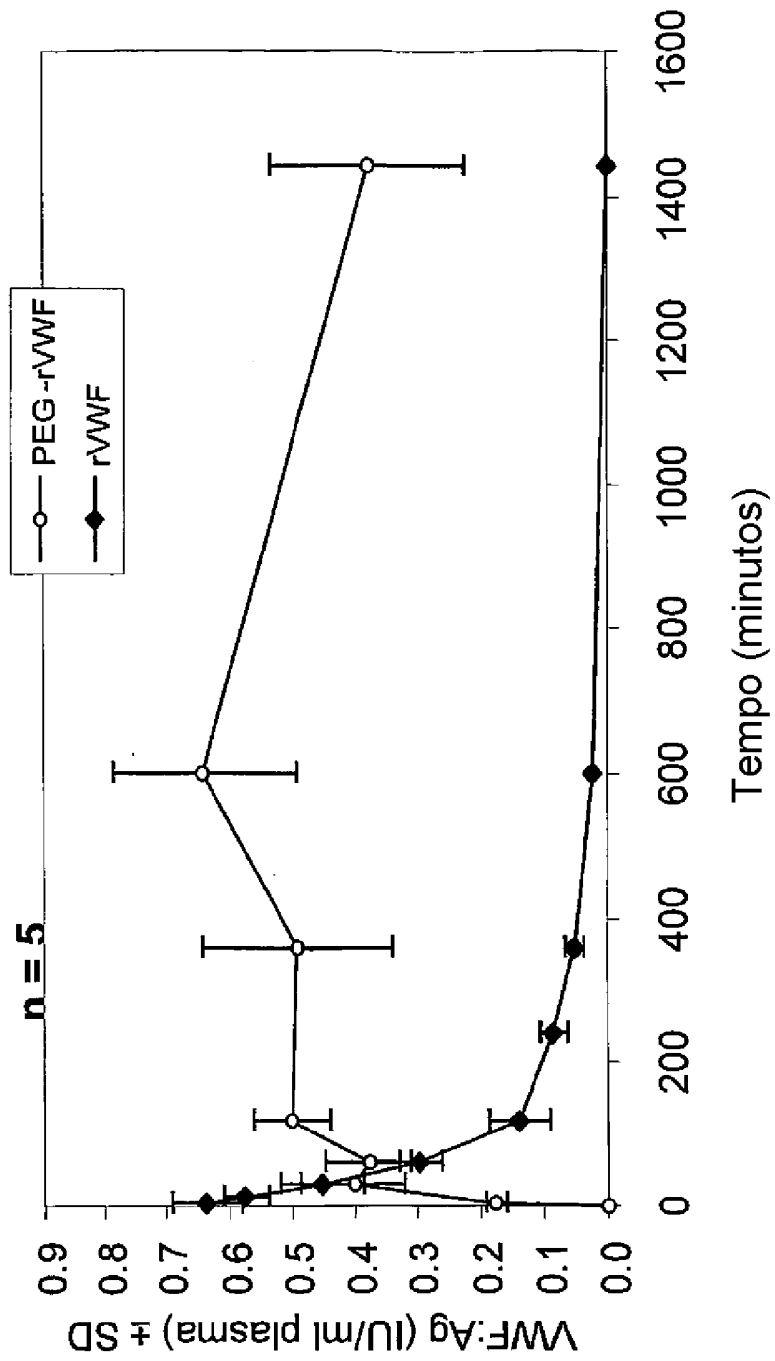


Figura 2

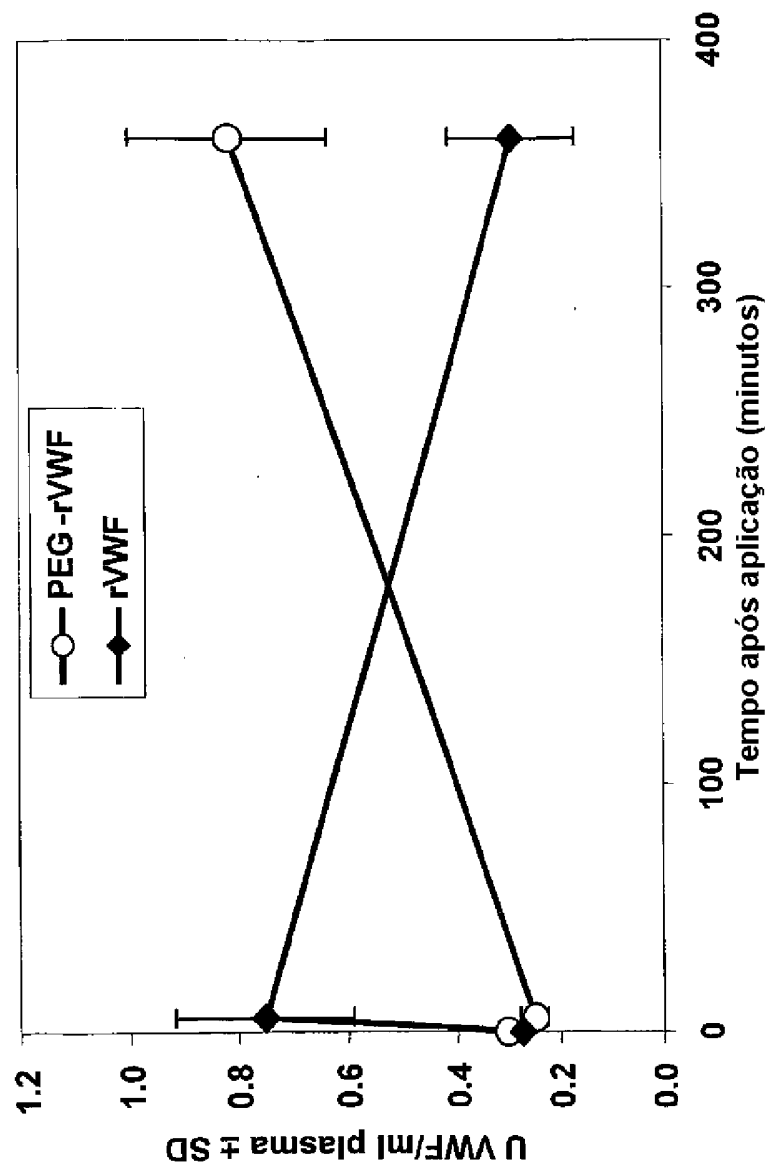


Figura 3

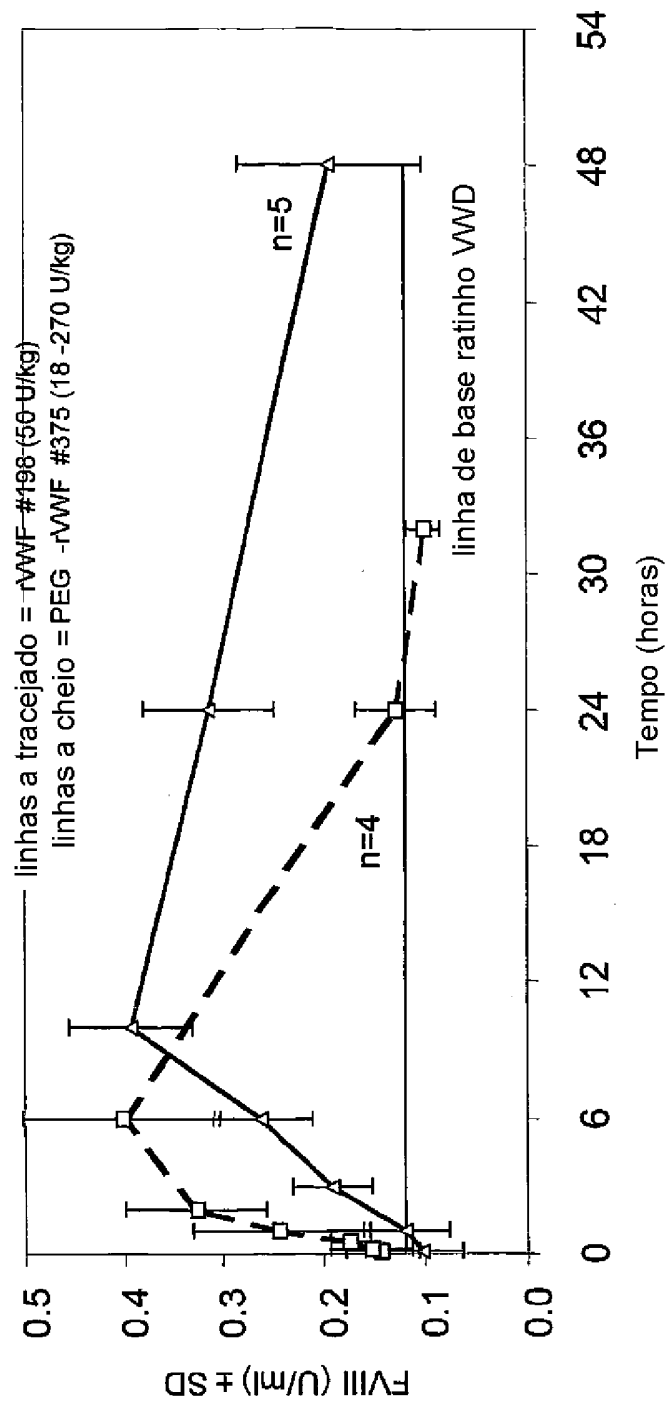


Figura 4

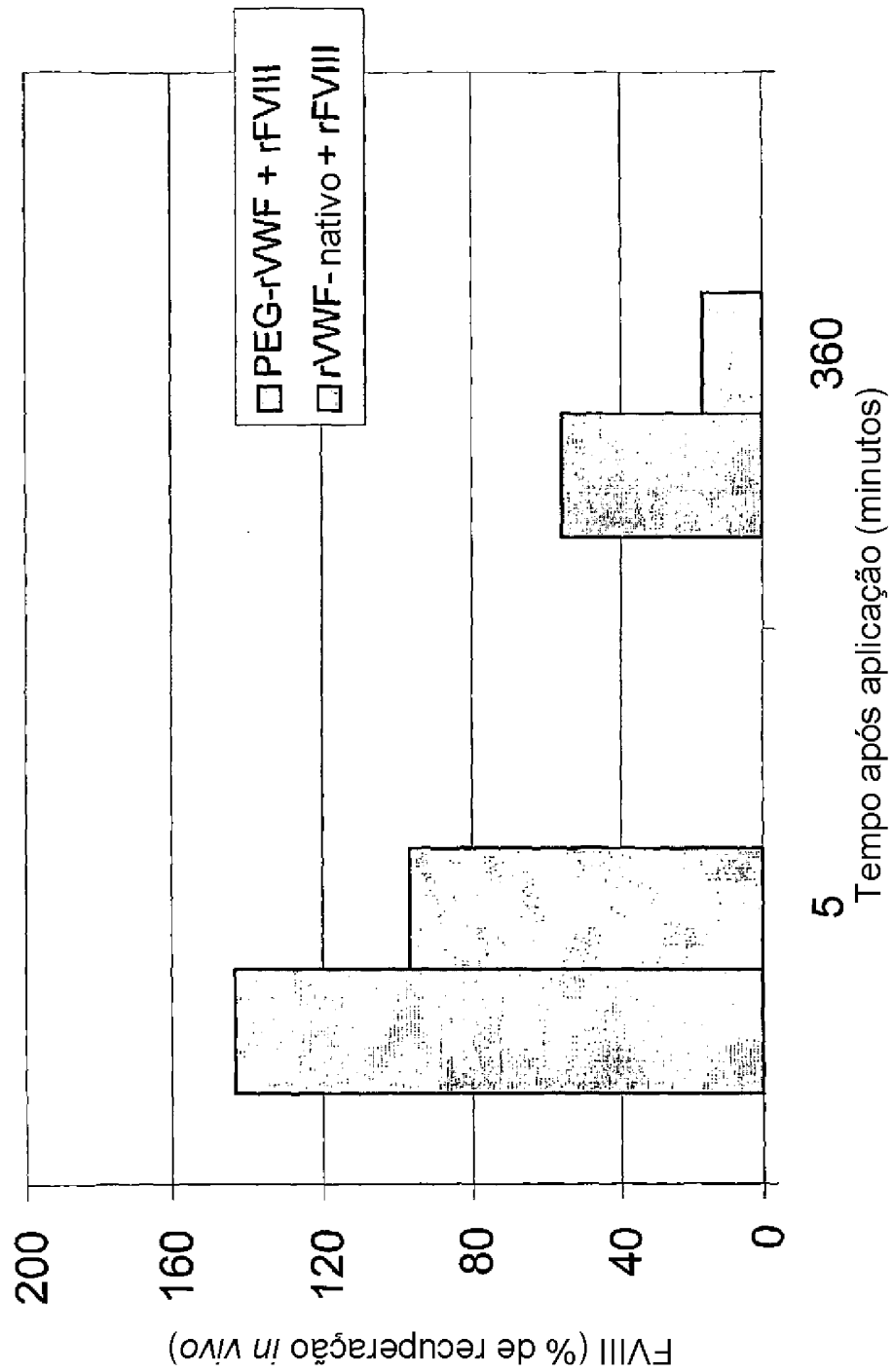
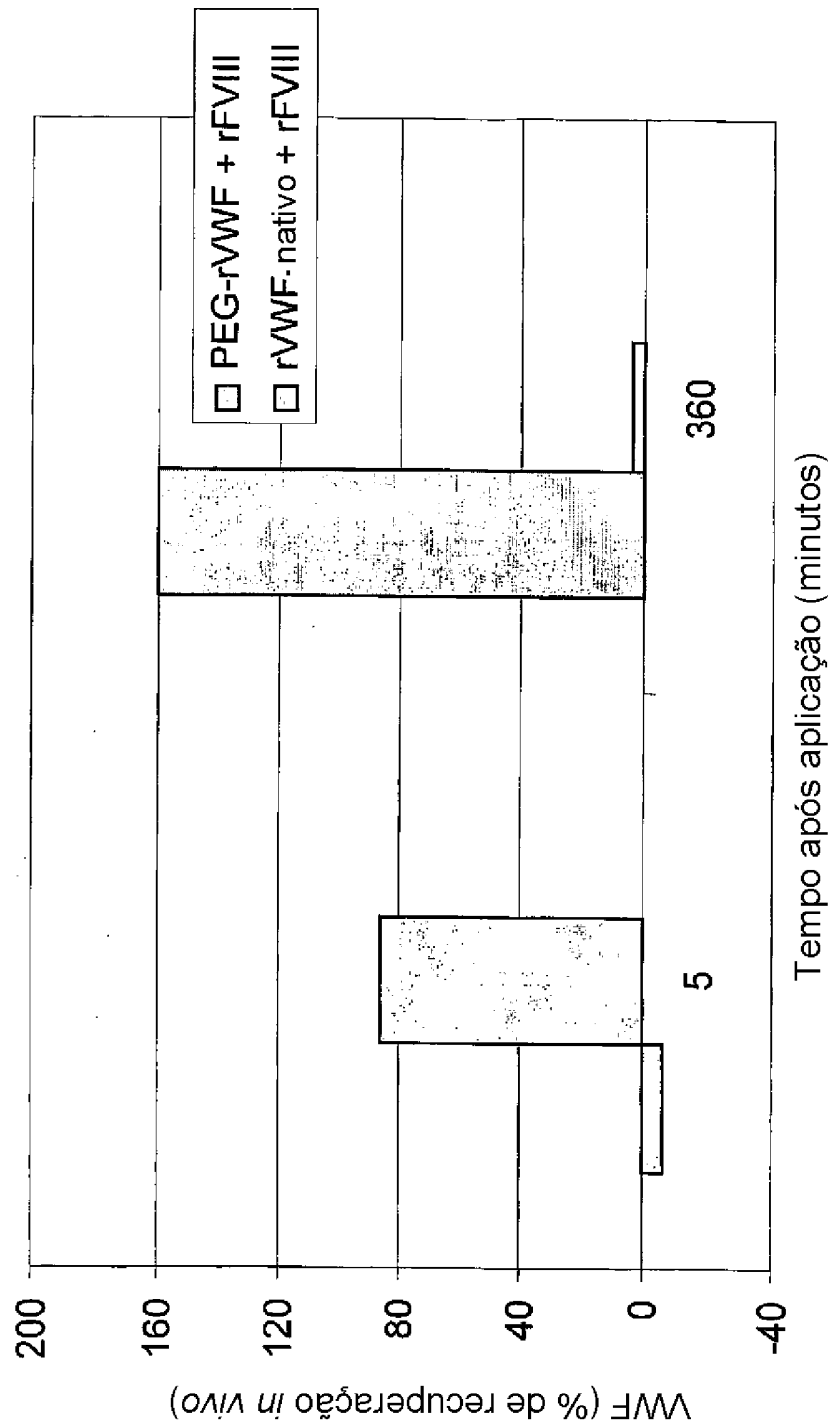


Figura 5

**Figura 6**

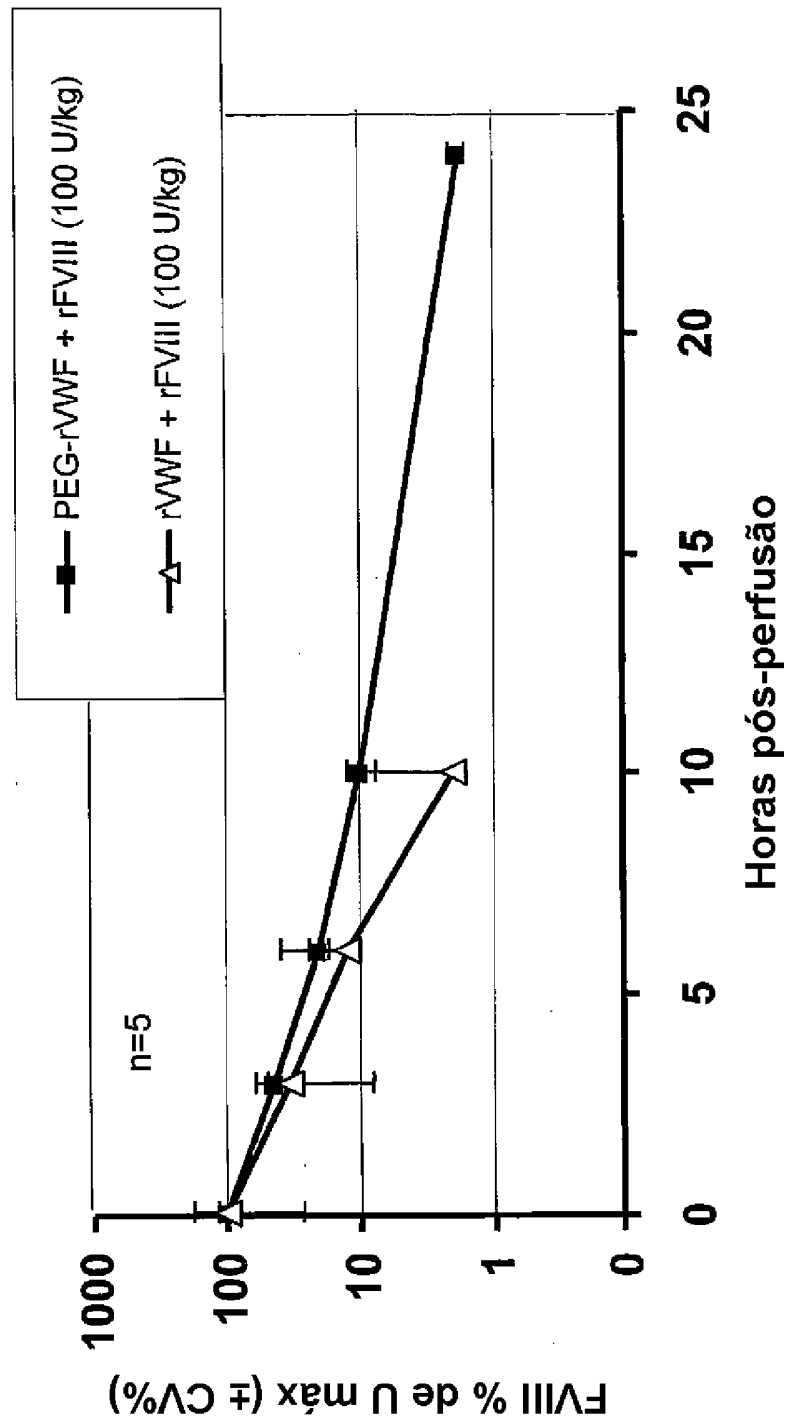


Figura 7

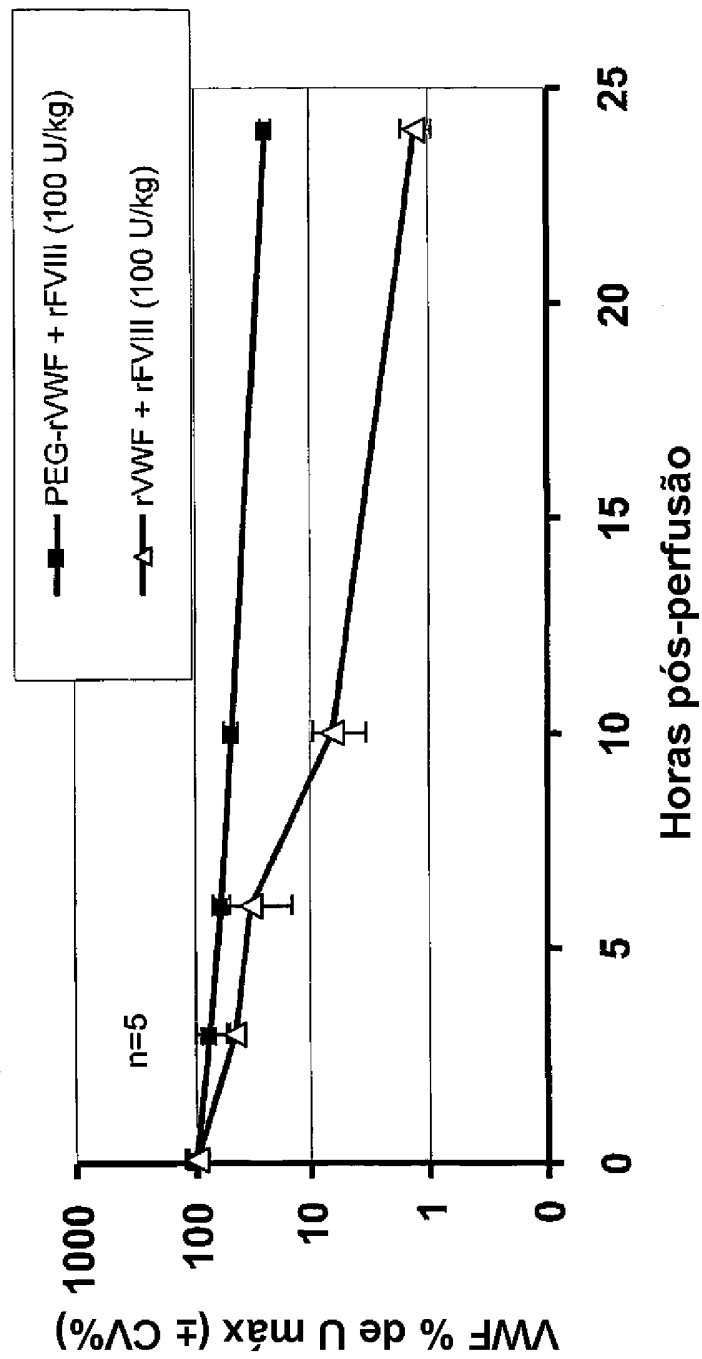


Figura 8

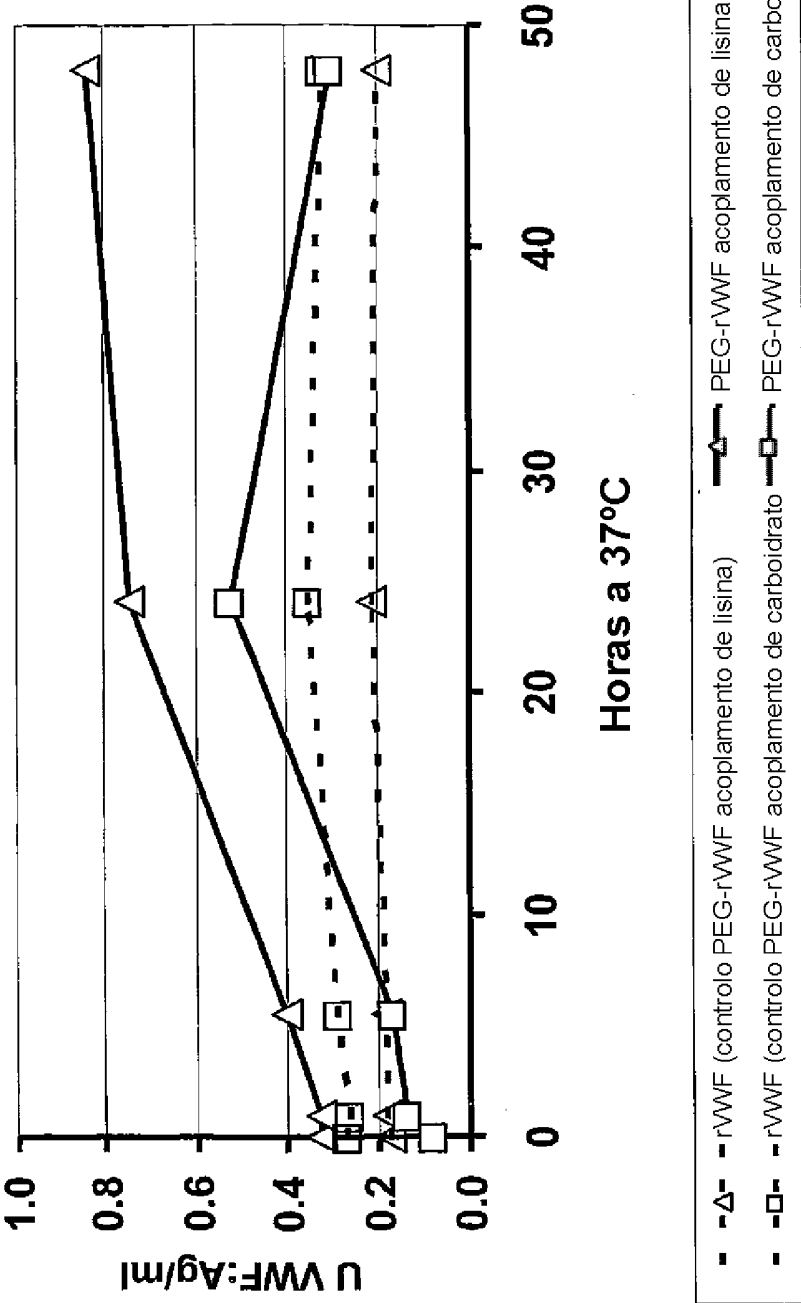


Figura 9

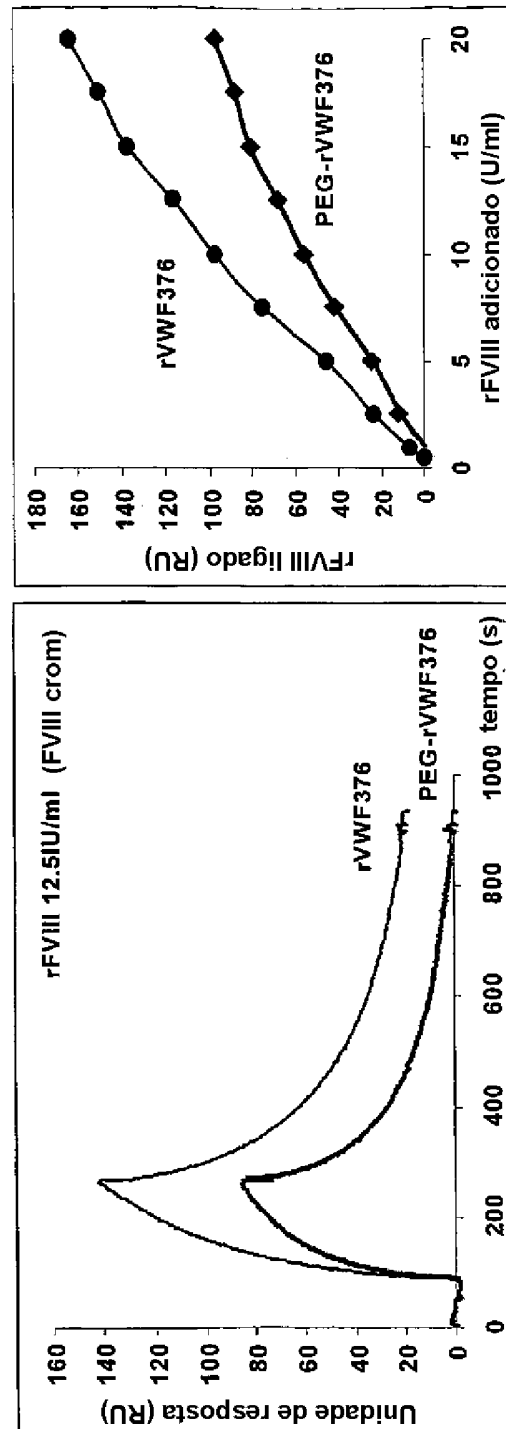
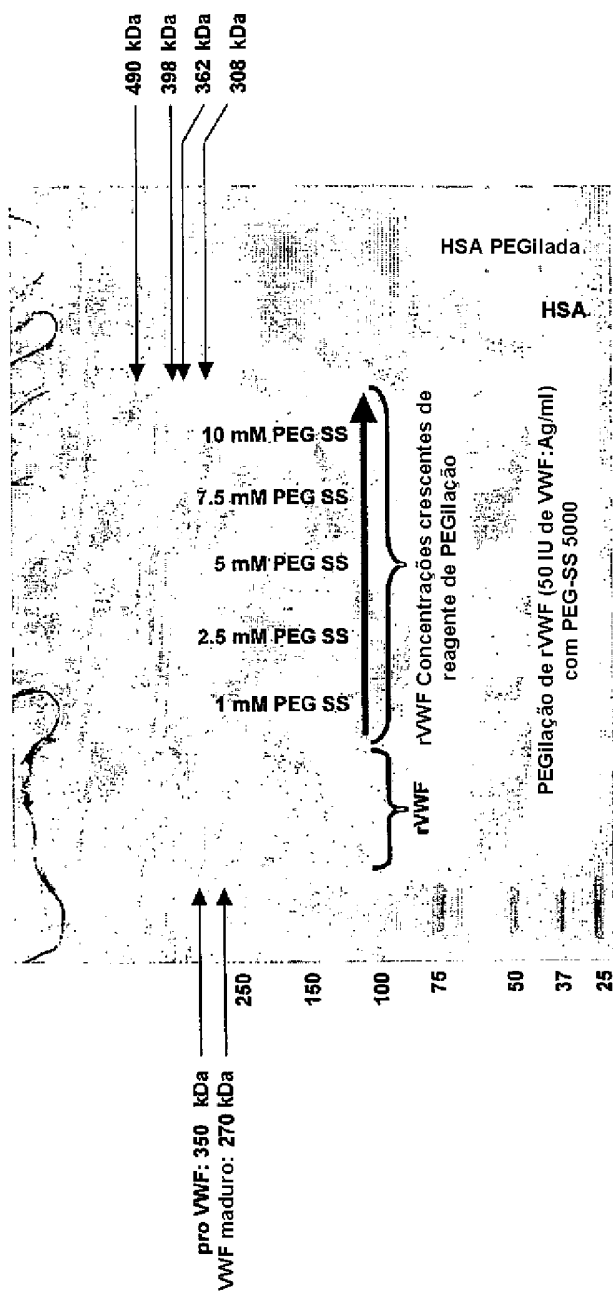


Figura 10



Mecanismo de PEGilação:

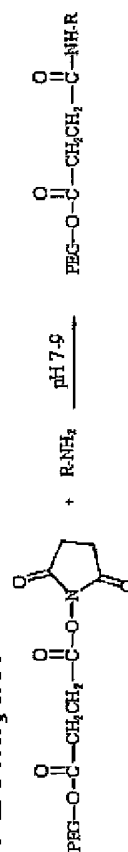


Figura 11

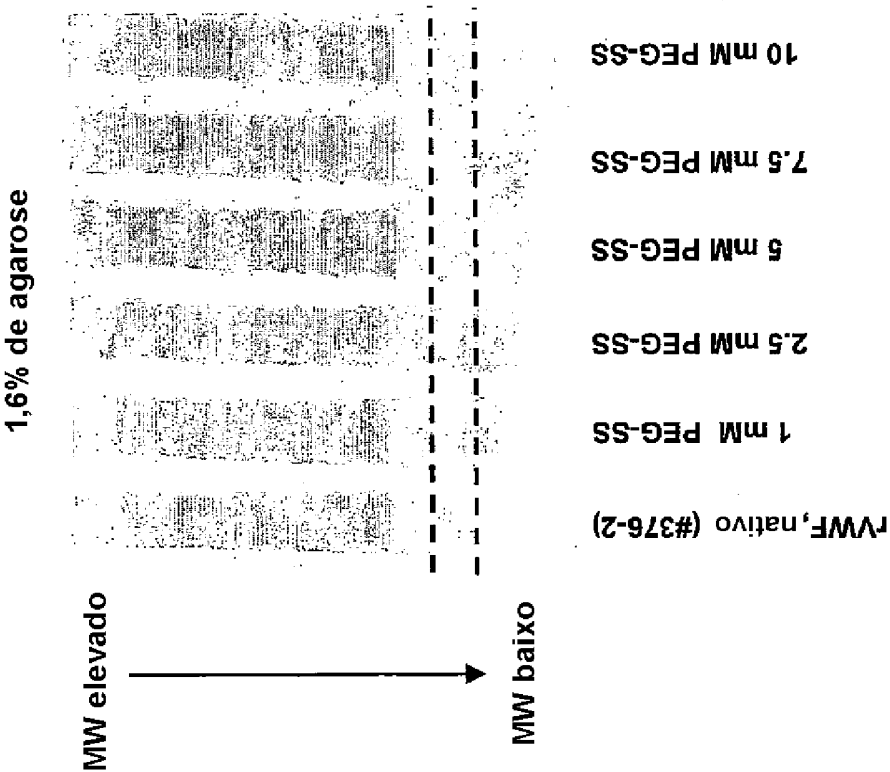


Figura 12

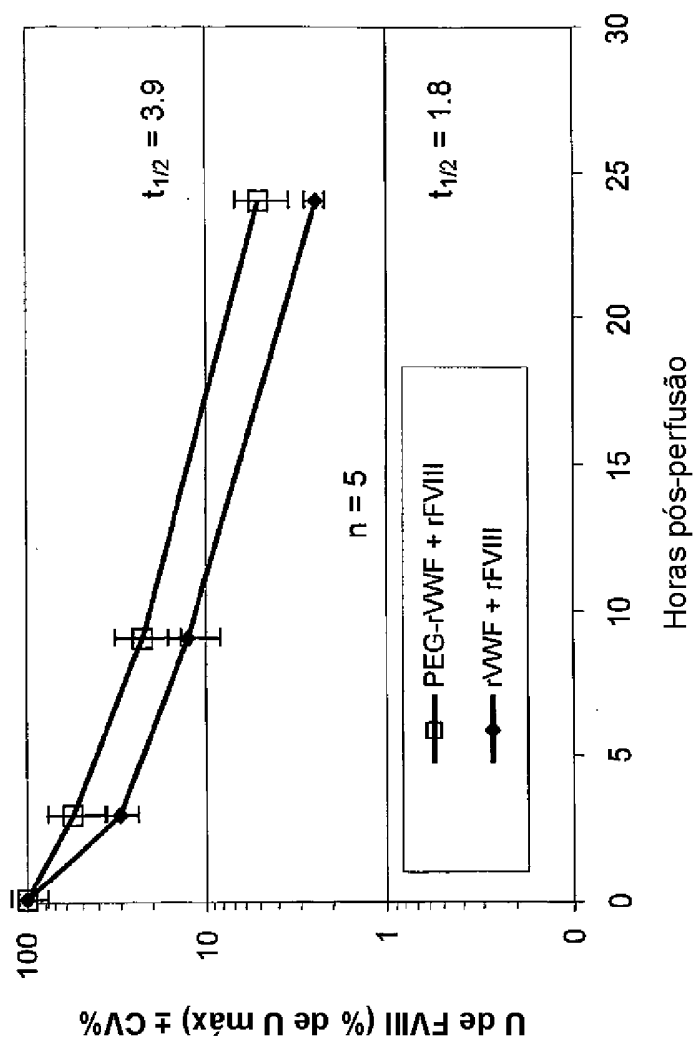


Figura 13

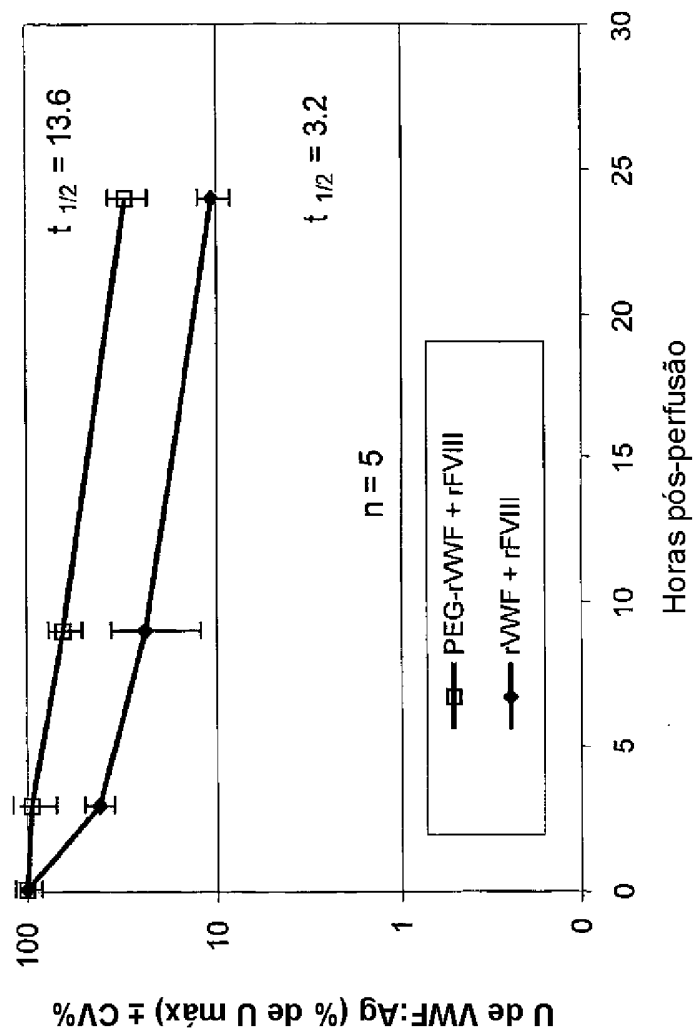


Figura 14

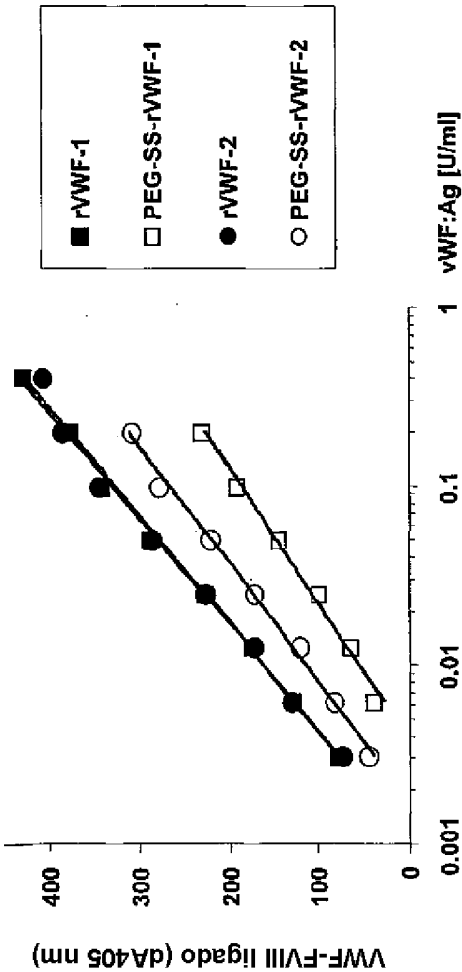


Figura 15

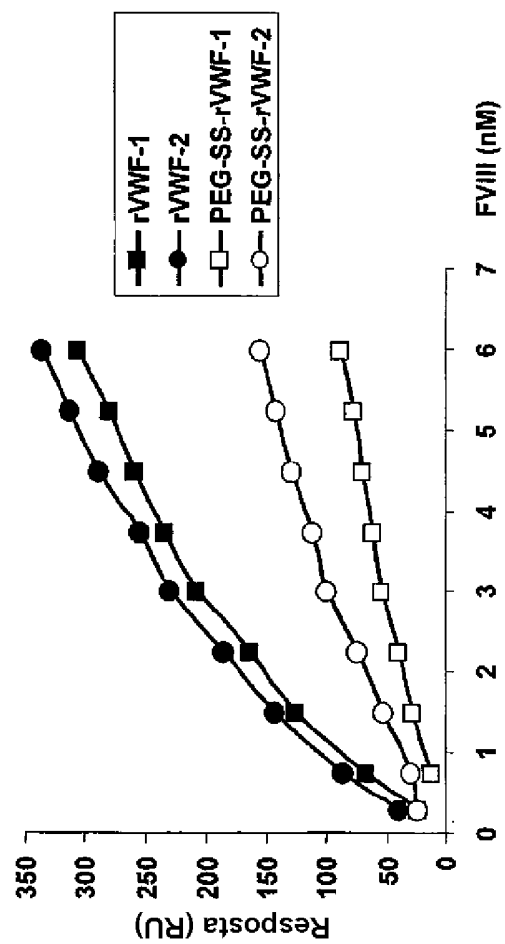


Figura 16

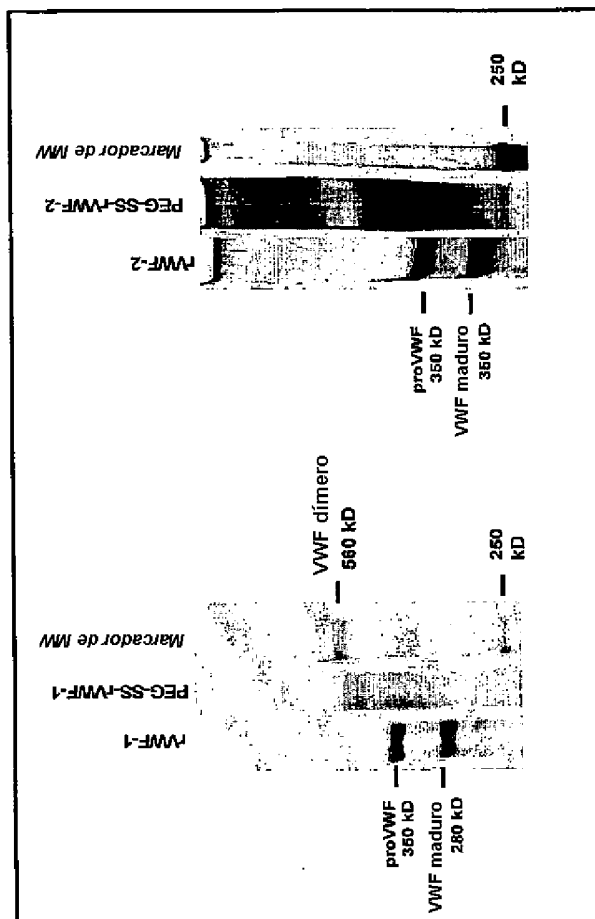


Figura 17

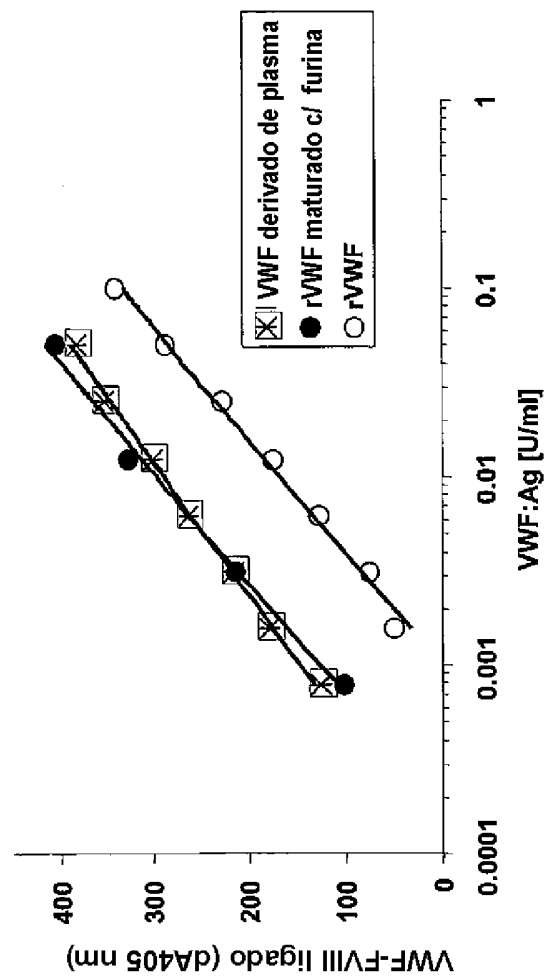


Figura 18

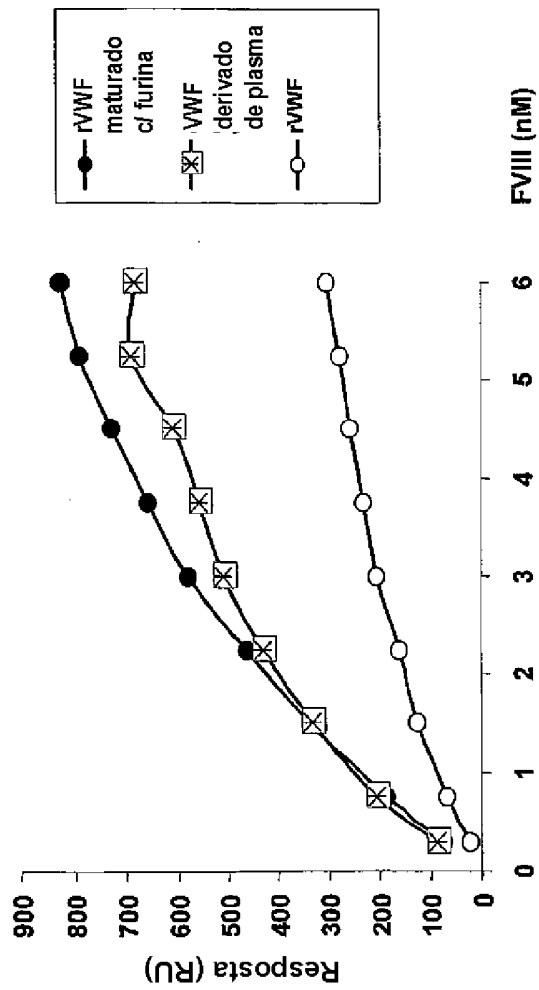


Figura 19

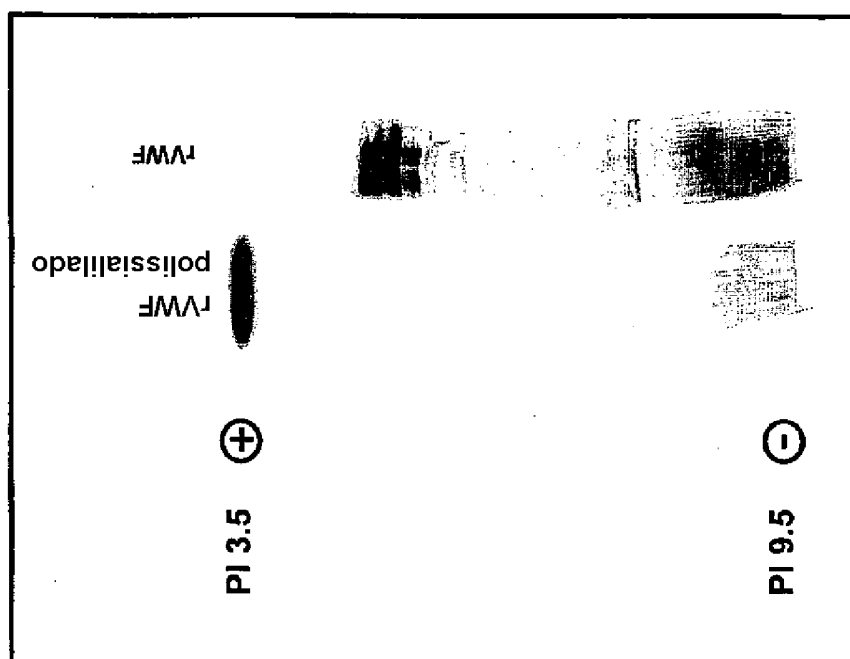


Figura 20

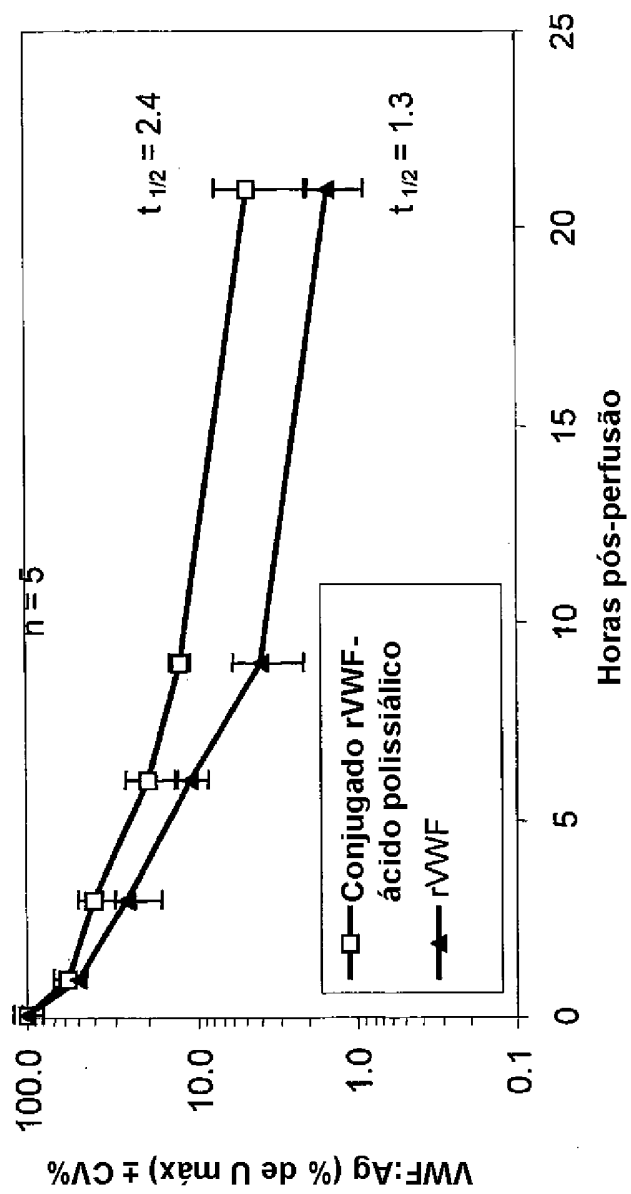


Figura 21

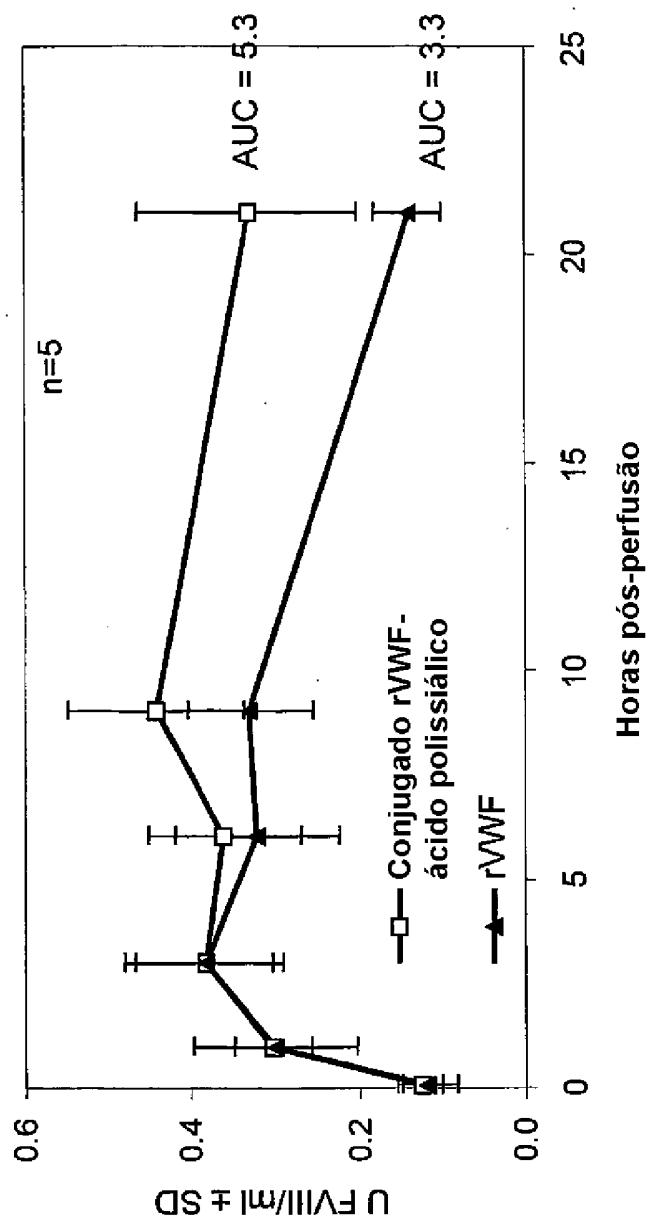


Figura 22

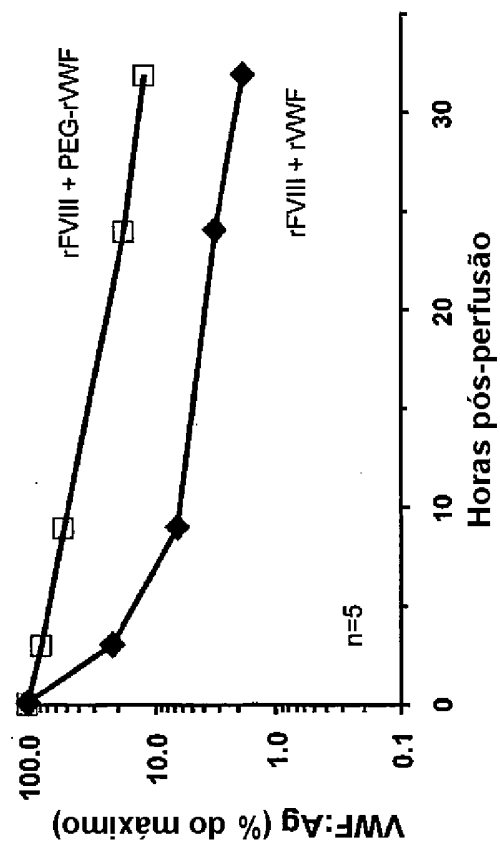


Figura 23

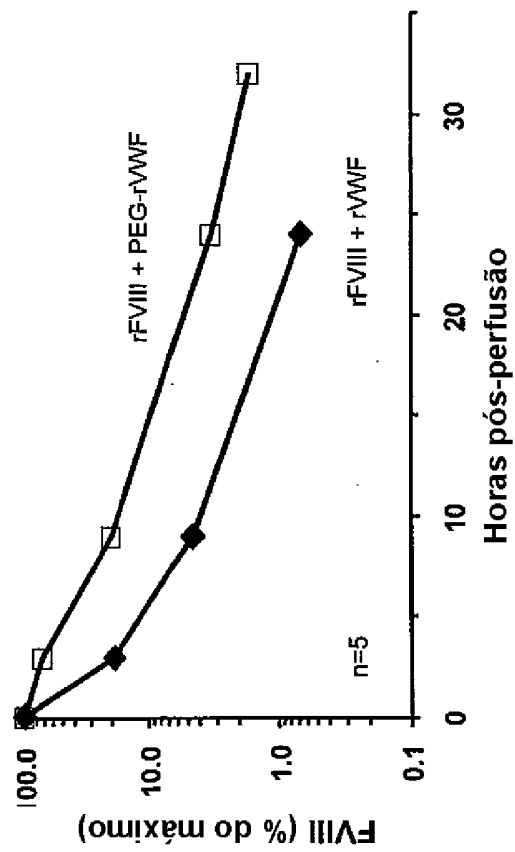


Figura 24

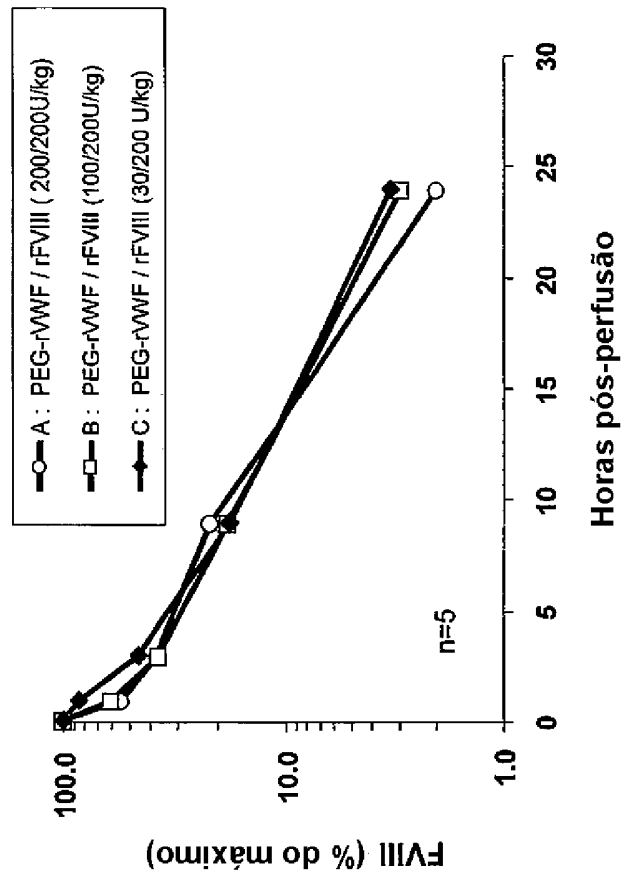


Figura 25

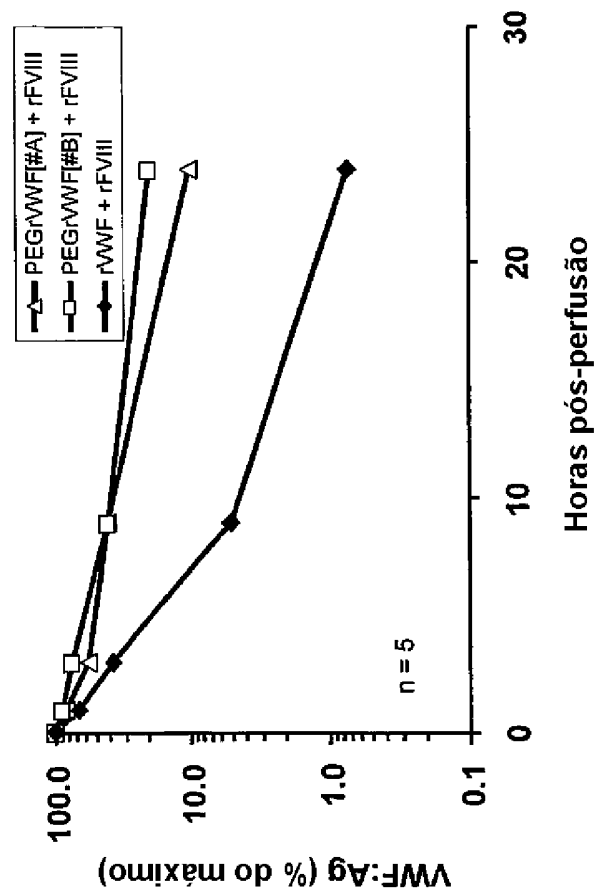


Figura 26

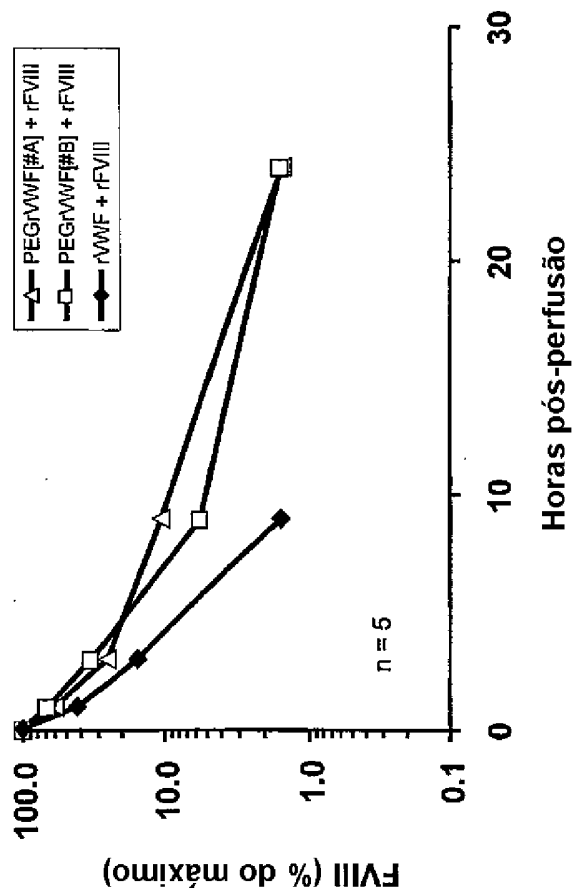


Figura 27