



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

(21) **PI 0712008-7 A2**

(22) Data de Depósito: 24/05/2007
(43) Data da Publicação: 10/01/2012
(RPI 2140)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 9/64
A61K 38/48
A61P 7/04

(54) **Título:** DERIVADOS E ANÁLOGOS DE FIX PROLONGADOS

(30) **Prioridade Unionista:** 24/05/2006 EP 06 114492.9

(73) **Titular(es):** Novo Nordisk Health Care Ag

(72) **Inventor(es):** Henning Ralf Stennicke, Henrik Ostergaard, Ole Hvilsted Olsen, Thomas Dock Steenstrup

(74) **Procurador(es):** Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2007055031 de 24/05/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/135182de 29/11/2007

(57) **Resumo:** DERIVADOS E ANÁLOGOS DE FIX PROLONGADOS. A presente invenção refere-se a análogos de FIX que têm um tempo de circulação aumentado na corrente sanguínea antes da ativação em comparação com aquele de FIX nativo (e uma semana depois da injeção para um paciente retém pelo menos cerca de 5% da atividade de FIX em comparação com o valor de pico de atividade inicial alcançado depois da injeção). Os análogos de FIX reivindicados compreendem um resíduo de cisteína inserido que foi ulteriormente modificado por conjugação com um grupo químico que aumenta o peso molecular do análogo de FIX.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"DERIVADOS E ANÁLOGOS DE FIX PROLONGADOS"**.

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a certos derivados e análogos de
5 FIX de coagulação de sangue com um tempo de circulação prolongado na corrente sanguínea comparado com FIX nativo.

Fundamentos da Invenção

Fator IXa (FIXa) é uma protease de serina de tipo tripsina que serve como um papel chave na hemostasia por geração, como parte do
10 complexo de Xase, maior parte do fator Xa exigido para suportar formação de trombina adequada durante a coagulação (reveista em (Hoffman e Monroe, III 2001)). Deficiência congênita de atividade de fator IXa é a causa da desordem de sangramento ligado a X hemofilia B que afeta cerca de
15 1:100.000 macos. Esses pacientes com hemofilia são atualmente tratados por terapia de substituição ou com FIX de coagulação derivado de plasma ou de recombinante. No entanto, recomendações agora estão se movendo a partir do tratamento conforme a necessidade tradicional em relação a profilaxia. Terapia de profilaxia atual necessita múltiplas administração dosada por semana, mas para ótimos níveis e eficácia no plasma, injeções uma vez
20 diariamente seriam superiores. Devido às limitações práticas e econômicas associadas a administrações diárias, isso não é atualmente uma opção para os pacientes. Assim, há uma necessidade clara de um produto de fator IX recombinante de ação prolongada.

A WO 2006005058 refere-se a conjugados de uma porção de
25 fator IX e um ou mais polímeros solúveis em água com um tamanho de 5-150 kDa. WO 2006018204 refere-se a polipeptídeos dependentes de vitamina K modificados compreendendo um peptídeo de ativação modificado. WO 2004101740 refere-se a uma proteína quimérica compreendendo pelo menos um fator de coagulação e pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina. WO 2005001025 refere-se a uma proteína híbrida
30 de monômero-dímero quimérica em que a dita proteína compreende uma primeira cadeia polipeptídeo compreendendo uma porção de uma região

constante de imunoglobulina e uma molécula biologicamente ativa e uma segunda cadeia polipeptídeo compreendendo uma porção de uma região constante de imunoglobulina sem a molécula biologicamente ativa. US 2006040856 refere-se a conjugados entre fator IX e porções de PEG ligados
 5 via um grupo de ligação de glicosila intacto interposto entre e covalentemente ligado ao peptídeo e o grupo de modificação.

SE 9501285A revela um processo para a produção in vitro de cerca de proteínas reticuladas por dissulfeto biologicamente ativo, dobradas usando-se uma mistura de uma oxirredutase de dissulfeto de proteína (por
 10 exemplo, isomerase de dissulfeto de proteína (PDI)), uma glutaredoxina e um tampão de redox. A referência é focalizada em cisteínas envolvidas nas ligações de dissulfeto intramoleculares.

WO 2006/134173 refere-se um método para derivatização e redução seletiva de proteínas engenheiradas recombinantemente preparadas
 15 compreendendo pelo menos uma cisteína não nativa incluindo polipeptídeos de fator IX.

É um objetivo da invenção prover derivados ou análogos de FIX modificados com um tempo de circulação prolongado na corrente sanguínea em comparação com FIX nativo enquanto retendo atividade biológica suficiente
 20 para suportar coagulação de sangue.

Sumário da invenção

Em um aspecto a presente invenção refere-se a um análogo de FIX com uma semi-vida circulatório prolongada, em que pelo menos um dos resíduos de amino naturais na posição 44, 46, 47, 50, 53, 57, 66, 67, 68, 70,
 25 72, 74, 80, 84, 87, 89, 90, 91, 94, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 113, 116, 119, 120, 121, 123, 125, 129, 138, 140, 141, 142, 146-180, 185, 186, 188, 189, 201, 202, 203, 224, 225, 228, 239, 240, 241, 243, 247, 249, 252, 257, 260, 261, 262, 263, 265, 277, 280, 314, 316, 318, 321, 341, 372, 374, 391, 392, 406, 410, 413 ou 415 é usado como substituto de um resíduo
 30 de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

Em uma concretização preferida o análogo de FIX tem pelo me-

nos um dos resíduos de amino naturais na posição 44, 46, 47, 50, 53, 57, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 80 ou 84 é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

5 Em uma outra concretização preferida o análogo de FIX tem pelo menos um dos resíduos de amino naturais na posição 87, 89, 90, 91, 94, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 113, 116, 119, 120, 121, 123, 125, 129, 138, 140, 141 ou 142, é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

10 Em uma outra concretização preferida o análogo de FIX tem pelo menos um dos resíduos de amino naturais na posição 185, 186, 188, 189, 201, 202, 203, 224, 225, 228, 239, 240, 241, 243, 247, 249, 252, 257, 260, 261, 262, 263, 265, 277, 280, 314, 316, 318, 321, 341, 372, 374, 391, 392, 15 406, 410, 413 ou 415, é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX

20 Em uma outra concretização preferida o análogo de FIX tem pelo menos um dos resíduos de amino naturais na posição 146-180, usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

25 Deve ser entendido que uma vez que a posição 146-180 corresponde ao peptídeo de ativação de FIX, que é removido na ativação, um análogo de FIX, em que pelo menos um dos resíduos de amino naturais é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína em uma posição selecionada de 146-180, que cisteína is conjugada com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX, esse grupo químico não estará presente no análogo após a ativação.

30 Em uma outra concretização preferida o análogo de FIX tem pelo menos um dos resíduos de amino naturais selecionado das posições 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176 177, é usado como substituto de um resíduo de aminoá-

cido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

Em uma outra concretização preferida o análogo de FIX tem pelo menos um dos resíduos de amino naturais selecionado das posições 160, 161, 162, 163, 164, 165 e 166, é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

Em uma outra concretização preferida o análogo de FIX tem resíduo de aminoácido E162 usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

Um outro aspecto da presente invenção refere-se a um análogo de FIX com uma semi-vida circulatória prolongada, que tem pelo menos um resíduo de cisteína anexada ao T415 C-terminal, a dita cisteína sendo conjugada com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

Em concretizações preferidas da presente invenção, o grupo químico conjugado aos polietileno glicóis de resíduo de cisteína não nativa (PEG). Em uma outra concretização preferida o polietilenoglicol tem um peso molecular médio na faixa de 500-100.000, tais como de 1000-75.000, ou de 2.000-60.000.

Em análogos de FIX preferidos tem uma semi-vida circulatória de pelo menos 1,5 vezes que de FIX de tipo selvagem.

Em análogos de FIX preferidos da presente invenção o análogo, quando medido em um ensaio de coagulação, tem uma atividade biológica de pelo menos 20% de FIX de tipo selvagem.

Um outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para a preparação de um análogo de FIX, compreendendo as etapas de a) redução seletiva de um polipeptídeo de FIX engenheirado compreendendo pelo menos uma cisteína não nativa em uma posição selecionada do grupo da posição 44, 46, 47, 50, 53, 57, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 80, 84, 87, 89, 90, 91, 94, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 113, 116, 119, 120, 121, 123,

125, 129, 138, 140, 141, 142, 146-180, 185, 186, 188, 189, 201, 202, 203, 224, 225, 228, 239, 240, 241, 243, 247, 249, 252, 257, 260, 261, 262, 263, 265, 277, 280, 314, 316, 318, 321, 341, 372, 374, 391, 392, 406, 410, 413 ou 415, conjugada através de uma ponte de dissulfeto a um tiol de baixo peso molecular (RS-CYS), por permissão de que o FIX conjugado com tiol de baixo peso molecular reaja com uma mistura compreendendo um tampão de redox e b) uma etapa simultânea ou subsequente de conjugação de pelo menos um das porções de cisteína seletivamente reduzidas (HS-Cys) com um grupo químico.

10 Em uma concretização preferida o método compreende um tampão de redox compreendendo uma mistura compreendendo glutathione reduzida ou oxidada. Em uma outra concretização preferida o tampão de redox ulteriormente compreende uma glutaredoxina.

15 Um outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para preparação de um análogo de FIX, compreendendo as etapas de a) redução seletiva um polipeptídeo de FIX engenheirado compreendendo pelo menos uma cisteína não nativa em uma posição selecionada do grupo da posição 44, 46, 47, 50, 53, 57, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 80, 84, 87, 89, 90, 91, 94, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 113, 116, 119, 120, 121, 123, 20 125, 129, 138, 140, 141, 142, 146-180, 185, 186, 188, 189, 201, 202, 203, 224, 225, 228, 239, 240, 241, 243, 247, 249, 252, 257, 260, 261, 262, 263, 265, 277, 280, 314, 316, 318, 321, 341, 372, 374, 391, 392, 406, 410, 413 ou 415, conjugada através de uma ponte de dissulfeto a um tiol de baixo peso molecular (RS-CYS), por permissão de que o FIX conjugado com tiol de baixo peso molecular reaja com uma mistura compreendendo um composto de 25 ácido triarilfosfina-3,3',3''-trissulfônico e b) uma etapa simultânea ou subsequente de conjugação de pelo menos uma das porções de cisteína seletivamente reduzidas (HS-Cys) com um grupo químico.

30 Em concretizações preferidas do método da presente invenção o grupo químico é selecionado polietileno glicóis (PEG), em particular um tendo um peso molecular médio de na faixa de 500-100.000, tais como 1000-75.000, ou de 2.000-60.000.

Um outro aspecto da invenção refere-se a uma formulação farmacêutica para o tratamento de um paciente com hemofilia compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um análogo de FIX de acordo com a invenção juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável.

5 Um outro aspecto da presente invenção refere-se a um método de tratamento de um paciente com hemofilia compreendendo administração ao paciente uma quantidade terapêuticamente eficaz de um análogo de FIX de acordo com a invenção juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável.

10 Em uma concretização preferida o método conseqüentemente compreende pelo menos um tratamento uma vez por semana. Em uma outra concretização preferida o tratamento compreende apenas tratamento uma vez por semana.

Descrição Detalhada da Invenção

15 FIX é um fator de coagulação dependente de vitamina K com similaridades estruturais ao fator VII, protrombina, fator X, e proteína C. A forma de zimogênio circulante, que tem uma semi-vida no plasma de cerca de 18-30 horas, consiste de 415 aminoácidos divididos em quatro domínios distintos compreendendo um domínio rico de ácido γ -carboxiglutâmico N-terminal (Gla), dois domínios de EGF, e um domínio de protease de serina de tipo tripsina C-terminal. Ativação de FIX ocorre por proteólise limitada a liberação de Arg¹⁴⁵-Ala¹⁴⁶ e Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹ de um frag-
20 mento de 35-aa, o assim chamado peptídeo de ativação (Schmidt e Bajaj 2003). O peptídeo de ativação é fortemente glicosilado contendo dois glicanos N-ligados e até quanto O-ligados.
25

Modificação covalente, por exemplo, por PEGilação ou ligação de peptídeo, foi aplicada com sucesso em vários produtos farmacêuticos à base de proteína para aperfeiçoar seus perfis farmacocinético ou farmacodinâmico. Conjugação via cisteínas nativas ou engenheiradas provê um meio
30 atraente de modificação específica de sítio devido à raridade desse aminoácido sobre a superfície de proteínas bem como a alta seletividade fornecida pela química de acoplamento de tiol. Na prática, no entanto, essa aborda-

gem é freqüentemente complicada pelo fato de que as cisteínas introduzidas são encontradas como dissulfetos mistos com tióis de baixo peso molecular (LMW) tais como cisteína e glutathione que previnem modificação subsequente.

5 Assim, há uma necessidade de métodos em que dissulfetos mistos de tais cisteínas e tióis de baixo peso molecular podem ser quimicamente reduzidos com a prevenção das ligações de dissulfeto nativo.

O gene de fator IX humano foi isolado e foi expresso em células de mamífero (K. Kurachi e E. W. Davie). Isolamento e caracterização de um
10 cDNA que codifica fator IX humano. PNAS. 79 (21 I):6461-6464, 1982; K. H. Coo, K. G. Gould, D. J. Rees, e G. G. Brownlee. Clonagem molecular do gene para fator IX de anti-hemofílico humano. Nature 299 (5879):178-180, 1982; R. J. Kaufman, L. C. Wasley, B. C. Furie, B. Furie, e C. B. Shoemaker. Expressão, purificação e caracterização de fator IX gama-carboxilado re-
15 combinante sintetizado em células de ovário chinês. J.Biol.Chem. 261 (21):9622-9628, 1986.) e a seqüência aminoácidos foi deduzida de cDNA.

O presente tratamento de hemofilia B com FIX normalmente inclui por volta de duas injeções semanalmente suplementadas com injeções em uma base necessária, por exemplo, antes da extrações de dentes ou
20 cirurgia. FIX circula uma proforma inativa e é apenas convertida da forma ativa FIXa quando um sangramento deve ser interrompido. Assim um meio de realizar um tratamento com FIX profilático com base em, por exemplo, uma injeção semanal deve aumentar o tempo de circulação de FIX na corrente sanguínea do paciente. Desse modo sempre terá um certo nível de FIX
25 de zimogênio pronto para ser ativado para assegurar condições de coagulação de sangue normais no paciente em qualquer tempo.

Os análogos de FIX de acordo com a presente invenção são modificados por substituição de um ou mais do resíduo natural de aminoácidos em FIX com um resíduo de Cys.

30 Identificação de posições em FIX adequada para a introdução de resíduos de cisteína:

As posições de aminoácido sendo modificadas de preferência

serão tomadas da combinação de resíduos tendo uma acessibilidade de superfície de cadeia lateral reativa >50%. Acessibilidade de superfície para a cadeia pesada e domínio de EGF2 foram calculadas a partir de dados cristalográficos publicados (1RFN, Hopfner e outros, 1999), enquanto cálculos do domínio de EGF1 eram baseados em uma construção de modelo de homologia a partir da estrutura de cristal de FIXa de suíno (1PFX, Brandstetter e outros, 1995). Além disso, resíduos selecionados (resíduos 155-177) no peptídeo de ativação, para o qual nenhuma informação estrutural está disponível, foram considerados importantes. Em uma publicação recente foi mostrado que esse segmento do peptídeo de ativação pode ser deletado sem comprometer a atividade biológica de FIX (Begbie e outros, 2005). Todas as posições relevantes em FIX humano são listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Posições relevantes para modificação específica de sítio de FIX. 'ASA1' é a acessibilidade (em Å²) do resíduo de aminoácido total, 'ASA2' é a acessibilidade (em Å²) da cadeia lateral, e 'Rel. ASA' é a acessibilidade da cadeia lateral fracional. A numeração de sequência segue quimiotripsina e é idêntica à numeração na estrutura de cristal de FIXa de suíno (1PFX.pdb). Cadeias laterais marcadas com asterisco (*) ou um menos (-) levanta-se a hipótese de que seja importante para a ligação ao complexo de FVIIa/TF (Chen, C.W. e outros, Thromb Haemost. 2002; 88:74-82.) ou to FVIIIa (Autin, L. e outros, J. Thromb. Haem. 2005, 3: 2044-56), respectivamente.

EGF1 de FIX					
Res. No.	Resíduo	ASA1	ASA2	liberação de ASA	Marca
44	GLN	98,9	89,62	0,65	
45	TYR	127,61	102,77	0,56	
46	VAL	92,03	79,54	0,73	
47	ASP	120,51	105,86	0,91	
50	GLN	94,29	81,75	0,56	
52	GLU	137,29	121,94	0,85	

53	SER	110,6	71,75	0,89	
54	ASN	78,81	62,97	0,54	*
57	LEU	94,46	85,04	0,57	
59	GLY	64,16	47,95	0,89	*
61	SER	57,29	47,74	0,58	*
66	ILE	128,4	117,58	0,77	
67	ASN	116,62	99,47	0,86	
68	SER	65,52	63,95	0,84	
70	GLU	104,08	98,67	0,71	
72	TRP	143,49	135,57	0,63	
74	PRO	109,62	91,25	0,73	*
80	LYS	191,42	178,01	0,99	
84	LEU	103,29	98,38	0,65	

EGF2 de FIX					
Res. No.	Residuo	ASA1	ASA2	Liberacao de ASA	Marca
87	THR	83,57	76,41	0,66	
89	ASN	122,26	99,36	0,8	
90	ILE	84	79,82	0,53	
91	LYS	128,1	96,73	0,58	
94	ARG	151,51	138,14	0,69	
100	LYS	118,47	114,68	0,67	
101	ASN	78,92	63,6	0,56	
102	SER	83	53,18	0,63	
103	ALA	88,66	47,67	0,7	
104	ASP	88,46	74,73	0,62	
105	ASN	108,19	99,74	0,86	
106	LYS	131,06	126,34	0,68	

108	VAL	75,49	69,94	0,59	
113	GLU	101,37	87,96	0,58	
116	ARG	136,07	129,02	0,64	
119	GLU	137,93	126,99	0,82	
120	ASN	113,58	86,88	0,72	
121	GLN	84,29	83	0,57	
123	SER	52,41	52,41	0,57	
125	GLU	76,19	76,19	0,55	
129	PRO	127,15	91,63	0,8	
138	SER	99,87	72,52	0,79	
140	THR	78,22	62,84	0,6	
141	SER	124,17	90,36	1,02	
142	LYS	243,38	231,32	0,95	

cadeia pesada de FIX					
Res. No.	Resíduo	ASA1	ASA2	liberação de ASA	Marca
185	GLU	104,18	102,68	0,73	
186	ASP	93,02	81,46	0,74	
188	LYS	124,37	123,07	0,67	
189	PRO	62,18	58,27	0,51	
201	LYS	174,2	136,05	0,73	
202	VAL	73,97	68,06	0,63	
203	ASP	103,23	96,57	0,79	
224	GLU	110,06	99,47	0,71	
225	THR	136,54	115,79	1,02	
228	LYS	158,34	146,18	0,82	

239	GLU	111,9	87,55	0,58	
240	GLU	105,36	95,43	0,66	
241	THR	93,62	82,06	0,72	
243	HIS	160,28	127,85	0,82	
247	LYS	147,15	133,67	0,73	
249	ASN	62,4	62,4	0,54	
252	ARG	120,71	108,77	0,57	
257	HIS	134,87	98,77	0,65	
260	ASN	71,4	63,12	0,56	
261	ALA	62,45	44,52	0,68	
262	ALA	94,53	49,72	0,76	
263	ILE	141,89	110,3	0,74	
265	LYS	100,02	99,84	0,54	
277	GLU	104,36	104,36	0,73	
280	VAL	102,37	98,01	0,82	
292	ASP	72,62	59,01	0,52	-
293	LYS	115,6	115,56	0,67	-
294	GLU	107,3	101,01	0,68	-
301	LYS	146,99	124,63	0,65	-
314	PHE	120,75	120,08	0,72	
316	LYS	165,63	138,79	0,76	
318	ARG	170,14	155,69	0,8	
321	LEU	98,82	95,81	0,61	
327	ARG	120,09	116,48	0,55	*

332	ASP	79,51	60,87	0,55	-
333	ARG	148,18	139,33	0,67	-
338	ARG	188,9	160,87	0,76	-
341	LYS	220,48	183,47	0,99	
342	PHE	118,35	106	0,59	-
343	THR	92,32	77,52	0,68	-
346	ASN	61,25	59,08	0,51	-
354	HIS	106,42	105,15	0,63	*
355	GLU	100,57	89,47	0,69	*
372	GLU	93,79	75,65	0,53	
374	GLU	140,35	102,57	0,72	
391	MET	108,83	100,48	0,67	
392	LYS	160,88	145,95	0,81	
406	ASN	104,27	98,78	0,79	
410	GLU	117,19	97,59	0,68	
413	LYS	153,75	134,03	0,75	
415	THR	201,09	182,54	0,95	

Peptídeo de ativação de FIX					
Res. No.	Resíduo				
155	Tyr				
156	Val				
157	Asn				
158	Ser				
159	Thr				
160	Glu				

161	Ala				
162	Glu				
163	Thr				
164	Ile				
165	Leu				
166	Asp				
167	Asn				
168	Ile				
169	Thr				
170	Gln				
171	Ser				
172	Thr				
173	Gln				
174	Ser				
175	Phe				
176	Asn				
177	Asp				

Os análogos de FIX da presente invenção têm uma semi-vida circulatória prolongada quando em comparação com FIX de tipo selvagem. A semi-vida circulatória pode ser medida por métodos conhecidos pela pessoa versada, tal como, por exemplo, descritos em McCarthy e outros Thromb Haemost. 2002 May;87(5):824-30.

Em concretizações preferidas a semi-vida circulatória dos análogos de FIX da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes do que o FIX de tipo selvagem, tais como pelo menos 1,6, por exemplo, pelo menos 1,7, tais como pelo menos 1,8, por exemplo, pelo menos 1,9, tais como pelo menos 2,0, por exemplo, pelo menos 2,2, tais como pelo menos 2,4 vezes do que o FIX de tipo selvagem quando medida no mesmo ensaio ou modelo.

Os análogos de FIX da presente invenção, além do mais, retêm atividade biológica suficiente para suportar a formação de coagulo in vivo. A

atividade biológica pode ser medida por métodos conhecidos pela pessoa versada tal como, por exemplo, descritos em McCarthy e outros Thromb Haemost. em maio de 2002; 87(5):824-30.

5 Em concretizações preferidas a atividade de coagulação dos análogos de FIX da presente invenção é pelo menos 15%, tais como pelo menos 20%, por exemplo, pelo menos 25%, tais como pelo menos 30%, por exemplo, pelo menos 35%, tais como pelo menos 40%, por exemplo, pelo menos 50%, tais como pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 70% da atividade de coagulação de FIX de tipo selvagem quando medida no mesmo
10 ensaio.

Mutação, expresseção & purificação

Os análogos de FIX podem ser produzidos por meio de técnicas de ácido nucléico recombinantes. Em general, uma seqüência de ácidos nucléicos humana clonada é modificada para codificar o análogo de FIX dese-
15 jado e é então inserida para dentro de um vetor de expressão, que é por sua vez transformado ou transfectado para dentro de células hospedeiras. Células eucarióticas superiores, em particular células mamíferos cultivadas, são preferidas as células hospedeiras.

As alterações de seqüência de aminoácidos podem ser realiza-
20 das por uma variedade de técnicas. Modificação da seqüência de ácidos nucléicos pode ser por mutagênes específica de sítio. Técnicas para mutagênes específica de sítio são bem conhecidas na técnica e são descritas em, por exemplo, Zoller e Smith (DNA 3:479-488, 1984) ou "Splicing by extension overlap", Horton e outros., Gene 77, 1989, pp. 61-68. Assim, usando-se
25 as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de FIX, pode-se introduzir a(s) alteração(ões) de escolha. Do mesmo modo, procedimentos para a preparação de um construto de DNA usando-se reação de cadeia de polímeroase usando-se iniciadores específicos são bem conhecidos por aquelas pessoas versadas na técnica (cf. PCR Protocols, 1990, Academic Press,
30 San Diego, California, USA).

O contruto de ácido nucléico que codifica o análogo de FIX da invenção pode ser de origem de origem genômica ou cDNA, por exemplo,

obtido pela preparação de uma biblioteca genômica ou de cDNA e triagem quanto a seqüências de DNA que codificam a totalidade ou parte de FIX por hibridização usando-se sondas de oligonucleotídeo sintéticas de acordo com técnicas padrão (cf. Sambrook e outros., Clonagem molecular: A Laboratory
5 Manual, 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

O construto de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo de análogo de FIX pode também ser preparado sinteticamente por métodos padrão estabelecidos, por exemplo, o método de fosfoamidita descrito por
10 Beaucage e Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, ou o método described by Matthes e outros., EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. De acordo com o método de fosfoamidita, oligonucleotídeos são sintetizados, por exemplo, em uma sintetizador de DNA automático, são purificados, são anelados, são ligados e são clonados em vetores adequados. As se-
15 qüências de DNA que codificam os polipeptídeos de FIX de ser humano podem também ser preparados por reação de cadeia de polímeroase usando-se iniciadores específicos, por exemplo, como descritos na patente U.S. no. 4.683.202, Saiki e outros., Science 239 (1988), 487 - 491, ou Sambrook e outros., supra.

20 Além do mais, o construto de ácido nucléico pode ser de origem genômica e sintética mista e cDNA ou de cDNA e genômica mista preparado por ligação de fragmentos de origem sintética, genômica ou de cDNA (quando apropriado), os fragmentos que correspondem a várias partes do construto de ácido nucléico inteiro, de acordo com técnicas padrão.

25 As seqüências de DNA que codificam os polipeptídeos de FIX são usualmente inseridos para dentro de um vetor recombinante que pode ser qualquer vetor, que pode convenientemente ser submetidos a procedimentos de DNA recombinantes, e a escolha do vetor freqüentemente dependerá da célula hospedeira em que ela deva ser introduzida. Assim, o ve-
30 tor pode ser um vetor de replicação autônomo, isto é, um vetor, que existe como uma entidade extracromossomal, cuja replicação é independente de replicação cromossomal, por exemplo, uma plasmídio. Alternativamente, o

vetor pode ser um que, quando introduzido para dentro de uma célula hospedeira, é integrado para dentro do genoma da célula hospedeira e replicado juntamente com o cromossoma(s) para dentro do qual ele foi integrado.

O vetor é de preferência um vetor de expressão em que a sequência de DNA que codifica o análogo de FIX é operavelmente ligado a segmentos adicionais exigidos para a transcrição do DNA. Em geral, o vetor de expressão é derivado de DNA viral ou plasmídio, ou pode conter elementos de ambos. O termo, "operavelmente ligado" indica que os segmentos são dispostos de modo que eles funcionem de comum acordo para as suas finalidades pretendidas, por exemplo, transcrição inicia em um promotor e prossegue através da sequência de DNA que codifica o polipeptídeo.

Vetores de expressão para o uso na expressão de análogos de FIX compreenderão um promotor capaz de dirigir transcrição de um cDNA ou de gene clonado. O promotor pode ser qualquer sequência de DNA, que mostra atividade transcritiva na célula hospedeira de escolha e pode ser derivado de genes que codificam proteínas ou homólogas ou heterólogas à célula hospedeira.

Exemplos de promotores adequados para a direção da transcrição do DNA que codifica os análogos de FIX em células de mamífero são o promotor de SV40 (Subramani e outros., *Mol. Cell Biol.* 1 (1981), 854 -864), o promotor de MT-1 (gene de metalotioneína) (Palmiter e outros., *Science* 222 (1983), 809 - 814), o promotor de CMV (Boshart e outros., *Cell* 41:521-530, 1985) ou o promotor tardio principal de adenovírus 2 (Kaufman e Sharp, *Mol. Cell. Biol.* 2:1304-1319, 1982).

As sequências de DNA que codificam o análogo de FIX podem também, se necessário, serem operavelmente ligadas a um terminador adequado, tal como o terminador de hormônio de crescimento humano (Palmiter e outros., *Science* 222, 1983, pp. 809-814) ou os terminadores de TPI1 (Alber e Kawasaki, *J. Mol. Appl. Gen.* 1, 1982, pp. 419-434) ou de ADH3 (McKnight e outros., *The EMBO J.* 4, 1985, pp. 2093-2099). Vetores de expressão podem também conter um conjunto de sítios de união localizados a jusante

do promotor e a motante do sítio de inserção para a própria seqüência de FIX. Sítios de união de RNA preferidos podem ser obtidos a partir de adenovírus e/ou genes de imunoglobulina. Também contida nos vetores de expressão é um sinal de poliadenilação localizado a jusante do sítio de inserção. Sinais de poliadenilação particularmente preferidos incluem o sinal de poliadenilação precoce ou tardio oriundo de SV40 (Kaufman e Sharp, *ibid.*), o sinal de poliadenilação oriundo da região Elb do adenovírus 5, o terminador de gene de hormônio de crescimento humano (DeNoto e outros. *Nucl. Acids Res.* 9:3719-3730, 1981) ou o sinal de poliadenilação oriundo do gene de FIX humano. Os vetores de expressão podem também incluir uma seqüência líder viral de não codificação, tal como o líder tripartido de adenovírus 2, localizado entre o promotor e os sítios de união de RNA; e seqüências aumentadoras, tal como o aumentador de SV40.

Para dirigir o análogo de FIX da presente invenção na trajetória secretória das células hospedeiras, uma seqüência de sinal secretória (também conhecida como uma seqüência líder, pré-pró-seqüência ou pré-seqüência) pode ser provida no vetor recombinante. A seqüência de sinal secretória é unida às seqüências de DNA que codificam os análogos de FIX no quadro de leitura correto. Seqüência de sinal secretória estão comumente posicionadas 5' em relação a seqüência de DNA que codifica o peptídeo. A seqüência de sinal secretória pode ser aquela, normalmente associada à proteína ou pode ser oriunda de um gene que codifica uma outra proteína secretada.

Os procedimentos usados para ligar as seqüências de DNA que codificam os análogos de FIX, o promotor e opcionalmente o terminador e/ou seqüência de sinal secretória, respectivamente, e para inseri-los para dentro dos vetores adequados contendo a informação necessária para a replicação, são bem conhecidos pelas pessoas versadas na técnica (cf., por exemplo,, Sambrook e outros., *Clonagem molecular: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Métodos de transfecção de células de mamífero e expressão de seqüências de DNA introduzidas nas células são descritos em, por exemplo,

Kaufman e Sharp, J. Mol. Biol. 159 (1982), 601 - 621; Southern e Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 327 - 341; Loyter e outros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982), 422 - 426; Wigler e outros., Cell 14 (1978), 725; Corsaro e Pearson, Somatic Cell Genetics 7 (1981), 603, Graham e van der Eb, Virology 52 (1973), 456; e Neumann e outros., EMBO J. 1 (1982), 841 - 845.

Sequências de DNA clonados são introduzidos para dentro de células de mamífero cultivadas por, por exemplo, transfecção mediada por fosfato (Wigler e outros., Cell 14:725-732, 1978; Corsaro e Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603-616, 1981; Graham e Van der Eb, Virology 52d:456-467, 1973) ou eletroporação (Neumann e outros., EMBO J. 1:841-845, 1982). Para identificar e selecionar células que expressam o DNA exógeno, um gene que confere um fenótipo selecionável (um marcador selecionável) é em geral introduzido para dentro das células juntamente com o gene ou cDNA de interesse. Marcadores selecionáveis preferidos incluem genes que conferem resistência a fármacos tais como neomicina, higromicina e metotrexato. O marcador selecionável pode ser um marcador selecionável ampliável. Um marcador selecionável ampliável preferido é uma sequência de redutase de diidrofolato (DHFR). Marcadores selecionáveis são revistos por Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA, incorporados aqui por referência). A pessoa versada na técnica facilmente será capaz de escolher The person skilled in the art will easily be able to choose marcadores selecionáveis adequados.

Marcadores selecionáveis podem ser introduzidos para dentro da célula em um plasmídio separado ao mesmo tempo que o gene de interesse, ou eles podem ser introduzidos no mesmo plasmídio. Construtos desse tipo são conhecidos na técnica (por exemplo, Levinson e Simonsen, a patente U.S. no. 4.713.339). Pode também ser vantajoso adicionar DNA adicional, conhecido como "DNA de veículo" à mistura que é introduzida para dentro das células.

Depois que as células foram colocadas no DNA, elas são desenvolvidas em um meio de crescimento apropriado, tipicamente 1-2 dias, para começar a expressão do gene de interesse. Como usado aqui o termo

"meio de crescimento apropriado" significa um meio contendo nutrientes e outros componentes exigidos para o crescimento de células e a expressão dos análogos de FIX. Meios em geral incluem uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, aminoácidos essenciais, açúcares essenciais, vitaminas, sais, fosfolipídios, proteína e fatores de crescimento. Seleção de fármaco é então aplicada para selecionar para o crescimento das células que estão exprimindo o marcador selecionável em uma forma adequada. Para as células que foram transfectadas com um marcador selecionável ampliável a concentração de fármaco pode ser aumentada para selecionar para um número de cópias aumentado das seqüências clonadas, desse modo, aumentando níveis de expressão. Clones de células transfectadas estáveis são então triadas quanto a expressão do análogo de FIX.

Exemplos de linhas de células de mamífero para o uso na presente invenção são linhas de célula de COS-1 (ATCC CRL 1650), de rim de hamster bebê (BHK) e de 293 (ATCC CRL 1573; Graham e outros., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Uma linha de célula de BHK preferida é a linha de célula de tk- ts13 BHK (Waechter e Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982, incorporadas aqui por referência), aqui em seguida chamadas de células de BHK 570. A linha de célula de BHK 570 foi depositada com a American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852, sob o número de acesso ATCC CRL 10314. Uma linha de célula de tk- ts13 BHK está também disponível do ATCC sob o número de acesso CRL 1632. Além disso, numerosas outras linhas de célula podem ser usadas dentro da presente invenção, incluindo células de Hep I de rato (hepatoma de Rato; ATCC CRL 1600), de Hep II rato (hepatoma de rato; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), de pulmão humano (ATCC HB 8065), de NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), de CO (ATCC CCL 61) e de CO-DUKX (Ur- laub e Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980).

Análogos de FIX da invenção são recuperados a partir do meio de cultura e podem então ser purificados por uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica incluindo, mas não limitados a, cromatografia (por exemplo, troca de íons, afinidade, hidrofóbica, cromatofocalização e exclu-

são por tamanho), procedimentos eletroforéticos (por exemplo, focalização isoeletrica preparativa (IEF), solubilidade diferencial (por exemplo, precipitação de sulfato de amônio), ou extração (vide, por exemplo, Protein Purification, J.-C. Janson e Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989).

- 5 De preferência, eles podem ser purificados por cromatografia por afinidade sobre uma coluna de anticorpo de anti-FIX. Purificação adicional pode ser alcançada por meio de purificação química convencional, tal como cromatografia líquida de alto desempenho. Outros métodos de purificação são conhecidos na técnica, e podem ser aplicados à purificação dos novos polipeptídeos de FIX descritos aqui (vide, por exemplo, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982).

Para finalidades terapêuticas é preferido que o análogo de FIX seja purificado para pelo menos cerca de 90 a 95% de homogeneidade, de preferência para pelo menos cerca de 98% de homogeneidade. Pureza pode ser avaliada por, por exemplo, eletroforese de gel e seqüenciação de aminoácido amino-terminal.

Redução seletiva

Em virtude dos obstáculos acima mencionados com relação a conjugação química via grupos tiol de cisteínas não envolvidas em ligações de dissulfeto intramoleculares de proteínas preparadas por técnicas recombinantes, a presente invenção provê o uso de uma mistura de tampão de redox definida (por exemplo, em combinação com um catalisador de redox de tiol-dissulfeto) ou uma triarilfosfina para seletivamente reduzir a ligação de dissulfeto mista entre tióis de baixo peso molecular e uma proteína engenheirada compreendendo pelo menos uma cisteína não nativa, por exemplo, um fator de coagulação ou uma proteína da família de tripsina de proteases de serina, com tais cisteínas engenheiradas ou nativas. A seguir redução seletiva do dissulfeto misto, a cisteína livre pode então ser modificada por conjugação usando-se a química de acoplamento de tiol na proteína como conhecida por pessoas versadas na técnica.

Conjugação química via cisteínas engenheiradas ou nativas oferece a escolha de modificação direcionada de proteínas que fornece um úni-

co produto homogêneo. No entanto, em casos onde a cisteína é conjugada a um tiol de baixo peso molecular e a proteína contém ligações de dissulfeto intramoleculares instáveis essa estratégia não é viável. A presente invenção permite remoção seletiva de preparação da porção de tiol de baixo peso molecular da cisteína liberada para modificação química subsequente.

Portanto, um aspecto da presente invenção refere-se a um método para redução seletiva de um FIX engenheirado, isto é, compreendendo pelo menos uma cisteína não nativa, o dito FIX compreendendo um ou mais porções de cisteína conjugadas através de uma ponte de dissulfeto a um tiol de baixo peso molecular (RS-Cys), a(s) dita(s) porção/porções não estando envolvida(s) nas pontes S-S intramoleculares (Cys-S-S-Cys) quando a proteína está em sua forma nativa, o método compreendendo a etapa de permitir que a proteína conjugada com tiol de baixo peso molecular reaja com uma mistura compreendendo um tampão de redox.

Um outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para redução seletiva de um FIX engenheirado, isto é, compreendendo pelo menos uma cisteína não nativa, a dita proteína compreendendo uma ou mais porções de cisteína conjugadas através de uma ponte de dissulfeto a um tiol de baixo peso molecular (RS-Cys), a(s) dita(s) porção/porções não estando envolvida(s) nas pontes S-S intramoleculares (Cys-S-S-Cys) quando a proteína está em sua forma ativa, o método compreendendo a etapa de permitir que a proteína conjugada com tiol de baixo peso molecular reaja com uma mistura compreendendo um agente de redução de triarilfosfina.

O termo "seletivamente reduzido" refere-se ao fato de que uma porção predominante, por exemplo, uma fração de 60% ou mais, ou 80% ou mais, tais como 90% ou mais, das porções de cisteína conjugada através de uma ponte de dissulfeto a um tiol de baixo peso molecular são reduzidas para liberar uma porção de cisteína com um grupo tiol que está pronta para a conjugação com outros grupos, enquanto que porção predominante, por exemplo, 60% ou mais, ou 80% ou mais, such as 90% ou mais, de outras ligações de dissulfeto (tipicamente ligações de dissulfeto intramoleculares) são preservadas de modo que a atividade biológica da proteína engenheira-

da seja substancialmente preservada.

(A) Tampão de redox

Como mencionado acima, a presente invenção i.a. provê um método para redução seletiva de uma proteína engenheirada compreendendo pelo menos uma cisteína não nativa, por exemplo, um fator de coagulação ou uma proteína da família de tripsina de proteases de serina. A proteína em questão compreende um ou mais porções de cisteína conjugada através de uma ponte de dissulfeto a um tiol de baixo peso molecular (RS-Cys), a(s) dita(s) porção/porções não estando envolvidas nas pontes S-S intramoleculares (Cys-S-S-Cys) quando a proteína está em sua forma ativa, o método compreendendo a etapa de permitir que a proteína conjugado com tiol de baixo peso molecular reaja com uma mistura compreendendo um tampão de redox.

Quando usado aqui, o termo "tampão de redox" destina-se a significar um par de redox de dissulfeto/tiol em uma razão que seja redução suficiente para romper um dissulfeto(s) mistos de tiol de proteína de baixo peso molecular (RS-Cys) e ao mesmo tempo oxidação suficiente para preservar a integridade das ligações de dissulfeto nativo na proteína.

De preferência, o tampão de redox compreende um par de redox de dissulfeto/tio de baixo peso molecular. Pelo termo "baixo peso molecular" quer se dizer que a forma de tiol do par de redox tem um peso molecular de no máximo 500 g/mol. Exemplos ilustrativos de tais pares de redox são aqueles selecionados da (i) glutathione reduzida ou oxidada e (ii) γ -glutamylcisteína reduzida e oxidada, (iii) cistenyglycine reduzida ou oxidada, (iv) cisteína reduzida e oxidada, (v) N-acetylcysteína reduzida e oxidada, (vi) cisteamina, e (vii) dihydrolipoamide/lipoamide, de preferência de (i) glutathione reduzida ou oxidada.

As ótimas condições de redox podem ser determinadas por realização de uma titulação de redox da proteína como conhecida pela pessoa versada na técnica. Vide Gilbert (1995).

Em uma concretização, o tampão de redox é um par de redox de glutathione reduzida ou oxidada, e a concentração da glutathione reduzida está

na faixa de 0-100 mM, e a razão entre glutathione reduzida e glutathione oxidada está na faixa de 2-200.

Em uma outra concretização, o tampão de redox é um par de redox de glutathione reduzida ou oxidada, e a concentração da glutathione reduzida está na faixa de 0-100 mM, por exemplo, de 0,01-50 mM, e a concentração da glutathione oxidada está na faixa de 0-5 mM, por exemplo, de 0,001-5 mM. Para polipeptídeos de fator IX, a concentração da glutathione reduzida está de preferência na faixa de 0-5 mM, por exemplo, de 0,01-2 mM, e a concentração da glutathione oxidada está na faixa de 0,001-2 mM, por exemplo, de 0,001-0,200 mM.

Uma vez que a glutathione e outros tióis de baixo peso molecular são em geral redutores/oxidantes pobres em termos de cinética de reação, um catalisador de redox de dissulfeto/tiol é mais de preferência incluído na mistura em combinação com tampão de redox a fim de aumentar a taxa da reação.

Catalisadores de redox de dissulfeto/tiol adequados a serem incluídos na mistura incluem glutaredoxinas de tipo ditiol e de tipo monotiol. Glutaredoxinas e suas funções são em geral descritas em Fernandes e outros. (2004). Exemplos de glutaredoxinas úteis são aquelas selecionadas de Grx1, Grx2 ou Grx3 de *Escherichia coli* (Holmgren e outros., 1995), Grx1p, Grx2p, Grx3p, Grx4p, e Grx5p de *Saccharomyces cerevisiae* (Luikenhuis e outros. 1998; Rodriguez-Manzanique e outros., 1999; Grant, 2001), Grx1 e Grx2 de *Homo sapiens* (Padilla e outros. 1995; Lundberg e outros., 2001), e suas variantes. Variantes incluem, mas não é restrita a, glutaredoxinas de tipo ditiol em que a cisteína C-terminal no pedaço de CXXC foi substituída por um outro aminoácido tipicamente serina (vide Yang e outros., 1998).

O catalisador de redox (em particular uma glutaredoxina) é de preferência usado em uma concentração de 0,001-20 μ M.

É preferido que a mistura não compreenda uma isomerase de dissulfeto de proteína (PDI).

O tampão de redox pode ulteriormente compreender outros componentes tais como sais, tampões de pH, etc., e o método da invenção

pode ser conduzido em qualquer temperatura que seja adequada para a proteína em questão, por exemplo, uma temperatura na faixa de de -5°C a 50°C, tal como na faixa de de 0°C a 37°C, naturalmente dependendo da estabilidade da proteína sob as dadas condições.

5 (B) Agente de redução de triarilfosfina

Como mencionado acima, a presente invenção também provê um método para redução seletiva de uma proteína engenheirada compreendendo pelo menos uma cisteína não nativa, por exemplo, um fator de coagulação ou uma proteína da família de tripsina de proteases de serina. A proteína em questão compreende uma ou mais porções de cisteína conjugada através de uma ponte de dissulfeto a um tiol de baixo peso molecular (RS-Cys), a(s) dita(s) porção/porções não estando envolvidas nas pontes S-S intramoleculares (Cys-S-S-Cys) quando a proteína está em sua forma ativa, o método compreendendo a etapa de permitir que a proteína conjugada com tiol de reaja com um agente de redução de triarilfosfina.

O termo "agente de redução de triarilfosfina" destina-se a significar uma triarilfosfina opcionalmente substituída com um ou mais substituintes.

Os grupos arila do agente de redução de triarilfosfina são de preferência selecionados de fenila, naftila, 1,2,3,4-tetraidronaftila, antracila, fenantracila, pirenila, benzopirenila, fluorenila e xantenila, em particular fenila, e em concretizações atualmente selecionadas, os grupos arila são de preferência idênticos. Na concretização atualmente mais interessante, todos os três grupos arila são fenila. Exemplos de substituintes, que podem estar presentes nos grupos arila, em particular grupos fenila, são tipicamente aqueles selecionados de ácido sulfônico, ácido carboxílico, C₁₋₆ alquila, C₁₋₆ alcóxi, e C₁₋₆ alcóxi-C₁₋₆ alquila, ou C₃₋₆ alquilenos (representando um anel com dois átomos de carbono de arila vizinhos) ou C₂₋₆ alquilenóxi (representando um anel com dois átomos de carbono de arila vizinhos) ou C₁₋₄ alquilenóxi-C₁₋₄ alquilenos (representando um anel com dois átomos de carbono de arila vizinhos).

Nas concretizações atualmente de modo mais interessante, pelo

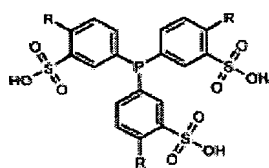
menos uma arila (por exemplo, fenila) tem pelo menos um substituinte selecionado de ácido sulfônico e ácido carboxílico, em particular ácido sulfônico; tal substituinte de preferência sendo disposto na posição meta em relação à ligação átomo de fósforo.

5 De preferência, todos os três grupos arila têm um substituinte de ácido sulfônico, por exemplo, todos os três grupos arila têm um substituinte de ácido sulfônico e pelo menos um outro substituinte, em particular pelo menos um substituinte na posição para em relação à ligação átomo de fósforo, em particular um substituinte de oxigênio nessa posição para.

10 Acredita-se atualmente que os grupos arila de agentes de redução preferidos não tenham quaisquer substituintes na posição orto em relação à ligação átomo de fósforo.

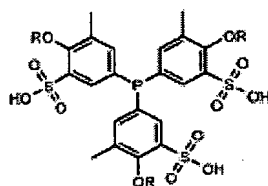
O termo "C₁₋₆ alquila" destina-se a incluir resíduos de hidrocarbonetos saturados ramificados ou lineares que têm de 1-6 átomos de carbono. Exemplos particulares são metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, sec-butila, terc-butila, n-pentila, isopentila, n-hexila, etc. Similarmente, o termo "C₁₋₄ alquila" inclui resíduos de hidrocarbonetos saturados ramificados ou lineares que têm 1-4 átomos de carbono. O termos "C₁₋₆-alquileno", "C₂₋₆-alquileno", etc. representam as birradicais que correspondem a "C₁₋₆ alquila", "C₂₋₆ alquila", respectivamente.

20 Agentes de redução de triarilfosfina adequados são aqueles tendo um equilíbrio útil entre potencial de redução e impedimento estérico. A natureza química do agente de redução de triarilfosfina é ditada por sua capacidade de clivar um dissulfeto misto de tiol de proteína de baixo peso molecular (RS-Cys) enquanto preservação da integridade das ligações de dissulfeto nativo na proteína. Atualmente compostos muito interessantes são ácidos triarilfosfina trissulfônico, tal como ácido trifenilfosfina-3,3',3"-trissulfônico e seus análogos. Seus exemplos ilustrativos são agentes de redução de triarilfosfina selecionados de ácido trifenilfosfina-3,3',3"-trissulfônico e seus análogos, por exemplo, um daqueles selecionados dos compostos de 9-11 abaixo:



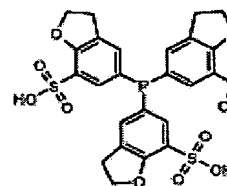
R = H, Me, Et, Pr, 2-Pr, Bu,
MeO, EtO, PrO, 2-PrO, BuO.

9



R = Me, Et, Pr, 2-Pr, Bu.

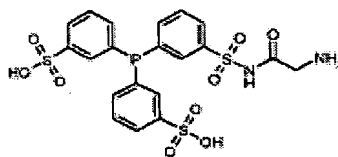
10



11

O agente de redução de triarilfosfina é de preferência usado em uma concentração de 0,001-100 mM, tais como de 0,01-50 mM ou de 0,1-25 mM.

Em uma concretização interessante, o agente de redução de triarilfosfina é imobilizado para dar um suporte sólido. Isso facilitará a separação fácil do agente de redução da proteína. Em geral, agente de redução de triarilfosfina, tais como compostos de 9-11, podem ser imobilizados por meios conhecidos pela pessoa versada na técnica, por exemplo, por introdução de um grupo ligador em um dos grupos arila. O reagente de triarilfosfina 12 é um exemplo de um variantee ligável de 1.



12

A reação é tipicamente conduzida a uma temperatura na faixa de 0-40°C, tal como a temperatura ambiente, por um período de desde 5 segundos a vários dias, como o caso pode ser. A reação pode ser seguida por HPLC a fim de confirmar a conversão. O solvente é de preferência um tampão aquoso, opcionalmente incluindo co-solventes tal como DMSO ou DMF. O solvente pode também compreender sais, por exemplo, sais de cálcio.

Conjugação

Uma finalidade importante dos métodos de redução seletiva descritos acima é para liberar um grupo cisteína que pode ser usados para a ligação (conjugação) de um grupo químico, por exemplo, uma porção de não polipeptídeo.

Portanto, em uma concretização importante, o método ulterior-

mente compreende a etapa simultânea e/ou subsequente da conjugação de pelo menos uma da(s) porção/porções de cisteína seletivamente reduzida (HS-Cys) com um grupo químico.

5 Seria entendido que a conjugação das pelo menos uma das porções de cisteína seletivamente reduzidoas com um grupo químico pode ser conduzida simultaneamente, isto é, por adição de um ou mais reagentes que levam à conjugação à mistura compreendendo o tampão de redox, ou em uma etapa subsequente, por exemplo, depois da purificação e/ou isolamento da proteína seletivamente reduzida.

10 Em uma concretização, o grupo químico é um grupo prolongador, isto é, um grupo que na conjugação à proteína (por exemplo, polipeptídeo de Fator IX) aumenta a semi-vida de circulação da(o) dita(o) proteína ou polipeptídeo, quando em comparação com o polipeptídeo ou proteína não modificada. O princípio específico atrás do efeito prolongador pode ser causado por tamanho aumentado, união de seqüências de peptídeos que po-
15 dem ser reconhecidas por peptidases ou anticorpos, ou marcaramento de glicanos de tal modo que eles não reconheçam por receptores específicos de glicano presentes, por exemplo, no fígado ou nos macrófagos, prevenção ou diminuição de depuração. O efeito do grupo prolongador pode, por exem-
20 plo, também ser levado por ligação a componentes de sangue tal como albumina ou adesão não específica a tecido vascular. A glicoproteína conjugada substancialmente preservaria sua atividade biológica.

 Em uma concretização da invenção o grupo prolongador é selecionado do grupo que consiste de:

25 (a) Um radical carregado orgânico de baixo peso molecular(15-1.000 Da), que pode conter um ou mais ácidos carboxílicos, ácidos aminas sulfônicos, ácidos fosfônicos, ou sua combinação.

 (b) Uma molécula hidrofílica neutra de baixo peso molecular (15-1.000 Da), tal como ciclodextrina, ou uma cadeia de polietileno que pode
30 opcionalmente ser ramificada.

 (c) Uma molécula hidrofílica de baixo peso molecular (15-1.000 Da) tal como um ácido graxo ou ácido cólico ou seus derivados.

(d) Polietilenoglicol com um peso molecular médio de 2.000-60,000 Da.

(e) Um polímero de precisão bem definido tal como um dendrímero com uma massa molecular exata que varia de 700 a 20.000 Da, ou
5 mais de preferência entre 700-10.000 Da.

(f) Um polipeptídeo substancialmente não imunogênico tal como albumina ou um anticorpo ou parte de um anticorpo opcionalmente contendo um domínio de Fc.

(g) Um polímero orgânico de alto peso molecular tal como dex-
10 trano.

Em uma outra concretização da invenção o grupo prolongador é selecionado do grupo que consiste de dendrímeros, óxido de polialquileno (PAO), incluindo polialquileno glicol (PAG), tais como polietileno glicol (PEG) e polipropileno glicol (PPG), PEGs ramificados, álcool polivinílico (PVA), po-
15 licarboxilato, poli-vinilpirolidona, anidrido de ácido polietileno-co-maléico, anidrido de ácido poliestireno-co-maléico, e dextrano, incluindo carboximetil-dextrano. Em uma concretização da invenção particularmente interessante, o grupo prolongador é um grupo PEG.

O termo "polímero ramificado", ou intercambiavelmente "políme-
20 ro dendrítico", "dendrímero" ou "estrutura dendrítica" significa um polímero orgânico montado a partir de uma seleção de blocos de construção de monômero dos quais, alguns contêm ramificações.

Em uma concretização da invenção o grupo prolongador é um selecionado do grupo que consiste de ligantes de ligação de proteína de so-
25 ro, tais como compostos que se ligam a albumina, como ácidos graxos, ácido C5-C24 graxo, diácido alifático (por exemplo, C5-C24). Outros exemplos de grupos prolongadores incluem moléculas orgânicas pequenas contendo porções que sob condições fisiológicas alteram as propriedades de carga, tais como ácidos carboxílicos ou aminas, ou substituintes neutros que previ-
30 nem reconhecimento específico de glicano tais como substituintes de alquila menores (por exemplo, C1-C5 alquila). Em uma concretização da invenção o grupo prolongador é uma albumina.

Em uma concretização, o grupo químico é um não polipeptídeo.

Em uma concretização interessante, o grupo químico é um polietilenoglicol (PEG), em particular um tendo um peso molecular médio de na faixa de 500-100,000, tais como de 1.000-75.000, ou de 2.000-60.000.

5 Conjugação pode ser conduzida como revelada na WO 02/077218 A1 e na WO 01/58935 A2.

Particularmente interessante é o uso de PEG como um grupo químico para a conjugação com a proteína. O termo "polietileno glicol" ou "PEG" significa um composto de polietileno glicol ou um seu derivado, com
10 ou sem agentes de acoplamento, porções de acoplamento ou de ativação (por exemplo, com tiol, triflato, tresilato, azirdina, oxirana, piridilditio, vinil sulfona, ou de preferência com um porção de maleimida). Compostos tal como maleimido monometóxi PEG são exemplares de compostos de PEG ativados da invenção.

15 PEG é um molécula de polímero adequada, uma vez que ela tem apenas poucos grupos reativos capazes de reticular em comparação com polissacarídeos tal como dextrano. Em particular, PEG monofuncional, por exemplo, metoxipolietileno glicol (mPEG), é de interesse uma vez que sua química de acoplamento é relativamente simples (apenas um grupo reativo
20 está disponível para a conjugação dos grupos de ligação no polipeptídeo). Conseqüentemente, o risco de reticulação é eliminado, os conjugados de polipeptídeo resultantes são mais homogêneos e a reação das moléculas de polímero com o polipeptídeo é mais fácil de se controlar.

Para efetuar a ligação covalente das molécula(s) de polímero ao
25 polipeptídeo, os grupos finais de hidroxila da molécula de polímero são providos em forma ativada, isto é, com grupos funcionais reativos. Moléculas de polímero ativadas adequadas estão comercialmente disponíveis, por exemplo, da Shearwater Corp., Huntsville, Ala., USA, ou da PoliMASC Pharmaceuticals plc, UK. Alternativamente, as moléculas de polímero podem ser
30 ativadas por métodos convencionais conhecidos na técnica, por exemplo, como revelados na WO 90/13540. Exemplos específicos de moléculas de polímero ramificadas ou lineares ativadas para o uso na presente invenção

são descritas no Shearwater Corp. 1997 e catálogos 2000 (Polímeros biocompatíveis funcionalizados para pesquisa e produtos farmacêuticos, Polietileno Glicol e derivados, incorporados aqui por referência). Exemplos específicos de polímeros de PEG ativados incluem a seguir PEGs lineares: NHS-PEG (por exemplo, SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG, e SCM-PEG), e NOR-PEG), BTC-PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO-PEG, e MAL-PEG, e PEGs ramificados tais como PEG2-NHS e aqueles revelados na patente U.S. no. 5.932.462 e na patente U.S. no. 5.643.575, ambas as quais são incorporadas aqui por referência. Além do mais, a seguir publicações, incorporadas aqui por referência, revelam moléculas de polímero úteis e/ou química de PEGilação chemistries: a patente U.S. no. 5.824.778, a patente U.S. no. 5.476.653, WO 97/32607, EP 229.108, EP 402.378, a patente U.S. no. 4,902.502, a patente U.S. no. 5.281.698, a patente U.S. no. 5.122.614, a patente U.S. no. 5.219.564, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO 95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, a patente U.S. no. 5.736.625, WO 98/05363, EP 809 996, a patente U.S. no. 5,629,384, WO 96/41813, WO 96/07670, a patente U.S. no. 5.473.034, a patente U.S. no. 5.516.673, EP 605 963, a patente U.S. no. 5.382.657, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 e EP 154 316.

A conjugação do polipeptídeo e das moléculas de polímero ativadas é conduzida pelo uso de qualquer método convencional, por exemplo, as described in the a seguir referências (que também descrevem métodos adequados para a ativação de moléculas de polímero): R. F. Taylor, (1991), "Protein immobilisation. Fundamental e applications", Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), "Chemistry of Protein Conjugação e Crosslinking", CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson e outros., (1993), "Immobilized Affinity Ligand Técnicas", Academic Press, N.Y.). A pessoa versada estará ciente

que o método de ativação e/ou química de conjugação a serem usados dependem do(s) grupos de ligação do polipeptídeo (cujos exemplos são dados ulteriormente acima), bem como os grupos funcionais do polímero (por exemplo, sendo amina, hidroxila, carboxila, aldeído, sulfidril, succinimidil, maleimida, vinilsulfona ou haloacetato). A PEGilação pode dizer respeito a conjugação a todos os grupos de ligação disponíveis no polipeptídeo (isto é, tais grupos de ligação que são expostos na superfície do polipeptídeo) ou pode dizer respeito em relação a um ou mais grupos de ligação específicos, por exemplo, o grupo amino N-terminal (a patente U.S. no. 5.985.265). Além do mais, a conjugação pode ser alcançada em uma etapa ou de um modo por etapas (por exemplo, como descrita na WO 99/55377).

Será entendido que a PEGilação é projetada de modo a produzir a ótima molécula com relação ao número de moléculas de PEG ligadas, o tamanho e a forma de tais moléculas (por exemplo, se elas são lineares ou ramificadas), e onde no polipeptídeo tais moléculas estão ligadas. O peso molecular do polímero a ser usado será escolhido levando em consideração o efeito desejado a ser alcançado. Por exemplo, se a finalidade primária da conjugação é alcançar um conjugado tendo um alto peso molecular e tamanho maior (por exemplo, para reduzir a depuração renal), pode-se escolher para conjugar ou uma ou algumas moléculas de polímero de alto peso molecular ou numerosas moléculas de polímero com um peso molecular mais baixo para se obter o efeito desejado. Em uma concretização, várias moléculas de polímero com um peso molecular mais baixo são usadas. Esse é também o caso se um grau mais alto de união de epítipo for desejado. Em tais casos, de 2-8 polímeros com um peso molecular de, por exemplo, cerca de 5.000 Da, tais como de 3-6 tais polímeros, podem, por exemplo, ser usados. Uma vez que os exemplos abaixo ilustram, pode ser vantajoso ter um número maior de moléculas de polímero com um peso molecular mais baixo (por exemplo, de 4-6 com um M_w de 5,000) em comparação com um número menor de moléculas de polímero com um peso molecular mais alto (por exemplo, de 1-3 com um M_w de 12.000-20.000) em termos de aperfeiçoamento da semi-vida funcional in vivo do conjugado de polipeptídeo, even

onde o peso molecular total das moléculas de polímero ligadas nos dois casos é igual ou similar. Acredita-se que a presença de número maior de moléculas de polímero menores provê o polipeptídeo com um diâmetro maior ou um tamanho evidente maior do que, por exemplo, uma única molécula de polímero ainda maior, pelo menos quando as moléculas de polímero são relativamente uniformemente distribuídas na superfície de polipeptídeo.

Verificou-se que ulteriormente resultados vantajosos são obtidos quando o tamanho evidente (também chamado do "peso molecular aparente" ou "massa aparente") de pelo menos uma porção principal do conjugado da invenção é pelo menos cerca de 50 kDa, tais como pelo menos cerca de 55 kDa, tais como pelo menos cerca de 60 kDa, por exemplo, pelo menos cerca de 66 kDa. Acredita-se que se deve ao fato de que a depuração renal clearance seja substancialmente eliminada para os conjugados tendo um tamanho aparente suficiente grande. No presente contexto, o "tamanho aparente" de um conjugado de proteína ou polipeptídeo de Fator IX é determinado pelo método de SDS-PAGE.

Além do mais, foi relatado que conjugação de polímero excessiva pode levar a uma perda de atividade da proteína (por exemplo, polipeptídeo de Fator IX) a qual o grupo químico (por exemplo, uma porção de não polipeptídeo) é conjugada (vide naus abaixo). Esse problema pode ser eliminado, por exemplo, por remoção dos grupos de ligação localizado no sítio funcional ou por bloqueamento do sítio funcional ante da conjugação de modo que o sítio funcional da proteína seja bloqueada durante conjugação. Especificamente, a conjugação entre a proteína e o grupo químico (por exemplo, porção de não polipeptídeo) pode ser conduzida sob condições onde o sítio funcional da proteína é bloqueado por uma molécula auxiliar, por exemplo, um inibidor de protease de serina. De preferência, a molécula auxiliar é uma, que especificamente reconhece um sítio funcional da proteína, tal como um receptor ou um inibidor de sítio ativo que se liga e assim protegendo a área em volta da tríade catalítica (de preferência definida como resíduo de aminoácidos dentro de 10 Å de qualquer átomo na tríade catalítica).

Alternativamente, a molécula auxiliar pode ser um anticorpo, em

particular um anticorpo monoclonal que reconhece a proteína (por exemplo, polipeptídeo de Fator IX). Em particular, a molécula auxiliar pode ser um anticorpo monoclonal neutralizante.

5 A proteína é de preferência para interagir com a molécula auxiliar antes de afetar a conjugação. (Frequentemente é vantajoso usar a mesma molécula auxiliar (por exemplo, um inibidor) como aquela usada nas etapas onde dissulfetos mistos são reduzidos.) Isso assegura que o sítio funcional da proteína (por exemplo, polipeptídeo de Fator IX) é unido ou é protegido e conseqüentemente não disponível para derivatização pelo grupo
10 químico (por exemplo, porção de não polipeptídeo) tal como um polímero. A seguir sua eluição a partir da molécula auxiliar, o conjugado do grupo químico e da proteína podem ser recuperados com pelo menos um sítio funcional parcialmente preservado.

Formulações e administração

15 Em um outro aspecto a presente invenção refere-se a uma formulação farmacêutica compreendendo um análogo de FIX em uma forma seca, para onde o médico ou o paciente adiciona solventes e/ou diluentes antes do uso. Por "forma seca" destina-se a composição ou formulação farmacêutica líquida é seca por congelamento (isto é, liofilização; vide, por exemplo, Williams e Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secagem por spray (vide Masters (1991) in Spray-Drying Handbook (5th ed; Longman Scientific e Technical, Essex, U.K.), págs. 491-676; Broadhead e outros. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; e Mumenthaler e outros. (1994) Pharm. Res. 11:12-20), ou secagem ao ar (Carpenter e Crowe
20 (1988) Cryobiology 25:459-470; e Roser (1991) Biopharm. 4:47-53).

Em um outro aspecto a invenção refere-se a uma formulação farmacêutica compreendendo uma solução aquosa de um análogo de FIX e um tampão, em que o análogo de FIX está presente em uma concentração de 0,01 mg/ml ou acima, e em que a dita formulação tem um pH de cerca de
30 2,0 a cerca de 10,0.

Em uma outra concretização da invenção o tampão é selecionado do grupo que consiste de acetato de sódio, carbonato de sódio, citrato,

glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, diidrogênio phosphato de sódio, fosfato de hidrogênio de dissódio, fosfato de sódio e tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maléico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico ou suas misturas. Cada um desses
5 tampões específicos constitui uma concretização alternativa da invenção.

Em uma outra concretização da invenção a formulação ulteriormente compreende um preservativo farmacêuticamente aceitável. Em uma outra concretização da invenção o preservativo é selecionado do grupo que consiste de fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, metil p-hidroxibenzoato, propil
10 p-hidroxibenzoato, 2-fenoxietanol, butil p-hidroxibenzoato, 2-fenilethanol, álcool benzílico, clorobutanol, e tiomerosal, bronopol, ácido benzóico, imiduréia, cloroexidina, desidroacetato de sódio, clorocresol, etil p-hidroxibenzoato, cloreto de benzetônio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) ou suas misturas. Em uma outra concretização da invenção o pre-
15 servativo está presente em uma concentração de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. Em uma outra concretização da invenção o preservativo está presente em uma concentração de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. Em uma outra concretização da invenção o preservativo está presente em uma concentração de 5 mg/ml a 10 mg/ml. Em uma outra concretização da invenção o preservativo está presen-
20 te em uma concentração de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada um desses preservativos específicos constitui uma concretização alternativa da invenção. O uso do preservativo em composições farmacêuticas é bem conhecido pela pessoa versada. Para a referência de conveniência is made to Remington: The Science e Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

25 Em uma outra concretização da invenção a formulação ulteriormente compreende um agente isotônico. Em uma outra concretização da invenção o agente isotônico é selecionado do grupo que consiste de um sal (por exemplo, cloreto de sódio), um açúcar ou álcool de acuar, um aminoácido (por exemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lusina, isoleucina, ácido as-
30 pártico, triptofano, treonina), umn alditol (por exemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propileneglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenoglicol (por exemplo, PEG400), ou suas misturas. Qualquer açúcar tais co-

mo mono-, di- ou polissacarídeos, ou glucanos solúveis em água, incluindo por exemplo frutose, glicose, manose, sorbose, xilose, maltose, lactose, sacarose, trealose, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, amido solúvel, amido de hidroxietila e carboximetilcelulose-Na podem ser usados. Em uma concretização o aditivo de açúcar é sacarose. Álcool de açúcar é definido como um hidrocarboneto de C4-C8 tendo pelo menos um grupo -OH e inclui, por exemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, e arabitol. Em uma concretização o aditivo de álcool de açúcar é manitol. Os açúcares ou álcoois de açúcar mencionados acima podem ser usados individualmente ou em combinação. Não há limite fixo para a quantidade usada, contanto que o açúcar ou álcool de açúcar seja solúvel na preparação líquida e não adversamente afeta os efeitos de solubilização alcançados usando-se os métodos da invenção. Em uma concretização, a concentração de açúcar ou álcool de açúcar está entre cerca de 1 mg/ml e cerca de 150 mg/ml. Em uma outra concretização da invenção o agente isotônico está presente em uma concentração de 1 mg/ml a 50 mg/ml. Em uma outra concretização da invenção o agente isotônico está presente em uma concentração de 1 mg/ml a 7 mg/ml. Em uma outra concretização da invenção o agente isotônico está presente em uma concentração de 8 mg/ml a 24 mg/ml. Em uma outra concretização da invenção o agente isotônico está presente em uma concentração de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada um desses agentes isotônicos específicos constitui uma concretização alternativa da invenção. O uso de um agente isotônico em composições farmacêuticas é bem conhecido pela pessoa versada. Para a referência de conveniência é produzida por Remington: The Science e Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

Em uma outra concretização da invenção a formulação ulteriormente compreende um agente de quelação. Em uma outra concretização da invenção o agente de quelação é selecionado de sais de ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), ácido cítrico, e ácido aspártico, e suas misturas. Em uma outra concretização da invenção o agente de quelação está presente em uma concentração de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. Em uma outra concretização da invenção o agente de quelação está presente em uma concentração de

0,1 mg/ml a 2mg/ml. Em uma outra concretização da invenção o agente de quelação está presente em uma concentração de 2 mg/ml a 5mg/ml. Cada um desses agentes de quelação específicos constitui uma concretização alternativa da invenção. O uso de um agente de quelação em composições farmacêuticas é bem conhecido pela pessoa versada. Para a referência de conveniência é produzida por Remington: The Science e Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

Em uma outra concretização da invenção a formulação further compreende um estabilizador. O uso de um estabilizador em composições farmacêuticas é bem conhecido pela pessoa versada. Para a referência de conveniência é produzida por Remington: The Science e Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

As composições farmacêuticas da invenção podem ulteriormente compreender uma quantidade de uma base de aminoácido suficiente para diminuir formação de agregado pelo polipeptídeo durante a armazenagem da composição. Por "base de aminoácido" destina-se a um aminoácido ou uma combinação de aminoácidos, onde qualquer dado aminoácido está presente ou em sua forma de base livre ou em sua forma de sal. Onde uma combinação de aminoácidos é usada, todos os aminoácidos podem estar presentes em suas formas de base livre, todos podem estar presentes em suas formas de sal, ou alguns podem estar presentes em suas formas de base livre enquanto outros estão presentes em suas formas de sal. Em uma concretização, aminoácidos para usar na preparação das composições da invenção são aqueles que portam uma cadeia lateral carregada, tais como arginina, lisina, ácido aspártico, e ácido glutâmico. Qualquer estereoisômero (isto é, isômero de L, D, ou DL) de um aminoácido particular (por exemplo, glicina, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptofano, treonina e suas misturas) ou combinações desses estereoisômeros, podem estar presentes nas composições farmacêuticas da invenção contanto que o aminoácido particular esteja presente ou em sua forma de base livre ou sua forma de sal. Em uma concretização o L-estereoisômero é usado. Composições da invenção podem também ser for-

mulados com análogos desses aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" destina-se a um derivado do aminoácido de ocorrência natural que traz cerca do efeito desejado de formação de agregado decrescente pelo polipeptídeo durante a armazenagem das composições farmacêuticas líquidas da invenção. Análogos de arginina adequados incluem, por exemplo, amino-
5 guanidina, ornitina e N-monoetil L-arginina, análogos de metionina adequados incluem etionina e butionina e análogos de cisteína adequados incluem S-metil-L cisteína. Como com os outros aminoácidos, os análogos de aminoácido são incorporados nas composições ou em sua forma de base livre
10 ou sua forma de sal. Em uma outra concretização da invenção os aminoácidos ou análogos de aminoácido são usados em uma concentração, que é suficiente para prevenir ou retardar a agregação da proteína.

Em uma outra concretização da invenção metionina (ou outros análogos de aminoácido ou aminoácidos sulfúricos) pode ser adicionada
15 para inibir oxidação de resíduos de metionina em sulfóxido de metionina quando o polipeptídeo que age como o agente terapêutico é um polipeptídeo compreendendo pelo menos um resíduo de metionina suscetível a tal oxidação. Por "inibir" destina-se um acúmulo mínimo de espécie oxidada por metionina durante um tempo. Inibição de oxidação de metionina resulta em re-
20 tenção maior do polipeptídeo em sua forma molecular adequada. Qualquer estereoisômero de metionina (isômero L, D, ou DL) ou suas combinações podem ser usadas. A quantidade a ser adicionada seria uma quantidade suficiente para inibir oxidação dos resíduos de metionina tal que a quantidade de sulfóxido de metionina é aceitável para agências reguladoras. Tipicamen-
25 te, isso significa que a composição contém não mais do que cerca de 10% a cerca de 30% de sulfóxido de metionina. Em geral, isso pode ser alcançado por adição de metionina tal que a razão de metionina adicionada para resíduos de metionina varia de cerca de 1:1 a cerca de 1000:1, tais como 10:1 a cerca de 100:1.

30 Em uma outra concretização da invenção a formulação ulteriormente compreende um estabilizador selecionado do grupo de polímeros de alto peso molecular ou compostos de baixo peso molecular. Em uma outra

concretização da invenção o estabilizador é selecionado de polietileno glicol (por exemplo, PEG 3350), álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carbóxi-/hidroxicelulose ou seus derivados (por exemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L e HPMC), ciclodextrinas, substâncias contendo enxofre como monotioglicerol, ácido tioglicólico e 2-metiltioetanol, e sais diferentes (por exemplo, cloreto de sódio). Cada um desses estabilizadores específicos constitui uma concretização alternativa da invenção.

As composições farmacêuticas podem também compreender agentes de estabilização adicionais, que ulteriormente aumentam estabilidade de um polipeptídeo terapeuticamente ativo ali. Agentes de estabilização de interesse particular para a presente invenção incluem, mas não são limitados a, metionina e EDTA, que protegem o polipeptídeo contra oxidação de metionina, e um tensoativo não iônico, que protege o polipeptídeo contra agregação associada a descongelamento na geladeira ou cisalhamento mecânico.

Em uma outra concretização da invenção a formulação compreende um tensoativo. O tensoativo pode ser um detergente, óleo de rícino etoxilado, glicerídeos poliglicolisados, monoglicerídeos acetilados, ésteres de ácido graxo de sorbitano, polímeros por blocos de polioxipropileno-polioxietileno (por exemplo, poloxâmeros tal como Pluronic® F68, poloxâmero 188 e 407, Triton X-100), ésteres de ácido graxo de polioxietileno sorbitan, derivados de polioxietileno e de polietileno tais como derivados alquilados e alcoilados (tweens, por exemplo, Tween-20, Tween-40, Tween-80 e Brij-35), monoglicerídeos ou seus derivados etoxilados, diglicerídeos ou seus derivados de polioxietileno, álcoois, glicerol, lectinas e fosfolipídios (eg. fosfatidil serina, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol, difosfatidil glicerol e esfingomielina), derivados de fosfolipídios (por exemplo, ácido dipalmitoil fosfatídico) e lisofosfolipídios (por exemplo, palmitoil lisofosfatidil-L-serina e ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina ou treonina) e alquila, alcoila (éster de alquila), alcóxi (éter de alquila)- derivados de lisofosfatidila e fosfatidilcolinas, por exemplo, derivados de lauroila e miristoila de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, e modificações do

grupo de topo polar, isto é, colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, e o DODAC positivamente carregado, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina e lisofosfatidilthreonina, e glicerofosfolípidios (por exemplo, cefalinas), gliceroglicolípídios (por exemplo, galactopiranosíde), esfingoglicolípídios (por exemplo, ceramidas, gangliosídeos), dodecilfosfocolina, lisolecitina de ovo de galinha, derivados de ácido fusídico- (por exemplo, tauro-diidrofusidato de sódio etc.), ácidos graxos de cadeia longa e seus sais de C6-C12 (por exemplo, ácido oléico e ácido caprílico), acilcarnitinas e derivados, derivados de lisina N[□]-acilados, arginina ou histidina, ou derivados acilados de cadeia lateral de lisina ou arginina, derivados de dipeptídeos N[□]-acilados compreendendo qualquer combinação de lisina, arginina ou histidina e um aminoácido ácido ou neutro, derivado de N[□]-acilado de um tripeptídeo compreendendo qualquer combinação de um aminoácido neutro e dois aminoácidos carregados, DSS (docusato sódico, CAS registro no [577-11-7]), docusato cálcico, CAS registro no [128-49-4]), docusato potássico, CAS registro no [7491-09-0]), SDS (sulfato de dodecila de sódio ou sulfato de laurila de sódio, caprilato de sódio, ácido cólico ou seus derivados, ácidos biliares e seus sais e conjugados de taurina e glicina, ácido ursodesoxicólico, colato de sódio, desoxicolato de sódio, taurocolato de sódio, glicocolato de sódio, N-Hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato, tensoativos monovalentes (alquil-aril-sulfonatos) aniônicos, tensoativos zwitteriônicos (por exemplo, N-alquila-N,N-dimetilamônio-1-propanossulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamônio-1-propanossulfonato, tensoativos catiônicos (bases de amônio quaternário) (por exemplo, brometo de cetiltrimetilamônio, cloreto de cetilpiridínio), tensoativos não iônicos (por exemplo, Dodecil beta-D-glucopiranosídeo), poloxaminas (por exemplo, Tetronic's), que são copolímeros por blocos tetrafuncionais derivados da adição seqüencial de óxido de propileno e óxido de etileno a etilenodiamina, ou o tensoativo pode ser selecionado do grupo de derivados de imidazolina, ou suas misturas. Cada um desses tensoativos específicos constitui uma concretização alternativa da invenção.

O uso de um tensoativo em composições farmacêuticas é bem

conhecido pela pessoa versada. Para a referência de conveniência is made to Remington: The Science e Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

É possível que outros ingredientes podem estar presentes na formulação farmacêutica da presente invenção. Tais ingredientes adicionais incluem a-

5 agentes de umectação, emulsificadores, antioxidantes, agentes de aumento de volume, modificadores de tonicidade, agentes de quelação, íons de metal, veículo oleaginosos, proteínas (por exemplo, albumina de soro de ser humano, gelatina ou proteínas) e um zwiterion (por exemplo, um aminoácido tais como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tais ingredien-

10 tes adicionais, naturalmente, não deveriam adversamente afetar a estabilidade global da formulação farmacêutica da presente invenção.

Administração parenteral pode ser realizada por injeção subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa por meio de uma seringa, opcionalmente sering de tipo caneta. Alternativamente, administração

15 parenteral pode ser realizada por meio de uma bomba de infusão. Uma outra opção é uma composição que pode ser uma solução ou uma suspensão para a administração do composto de FIX na forma de um spray nasal ou pulmonar. Como ainda outra opção, as composições farmacêuticas contendo o composto de FIX da invenção podem ser adaptadas para a administração

20 transdérmicas, por exemplo, por injeção livre de agulha ou de um administração de emplastro, opcionalmente implastro iontoforético, ou transmucosal, por exemplo, buccal.

Definições

"Fator IX" ou "FIX" como usado aqui refere-se a uma glicoproteína de Fator IX no plasma de ser humano que é um membro da trajetória de

25 coagulação intrínseca e é essencial para a coagulação de sangue. Deve ser entendido que essa definição inclui formas nativas bem como recombinantes dessa glicoproteínas de Fator IX no plasma de ser humano. A não ser que de outra maneira especificada ou indicada, como usado aqui fator IX significa

30 qualquer molécula de proteína de fator IX de ser humano funcional em seu papel normal na coagulação, incluindo qualquer fragmento, análogo e seu derivados.

"FIX Nativo" é a molécula de FIX humano de comprimento total como mostrada em SEQ ID NO:1. A numeração da posição de resíduo de aminoácido está de acordo com SEQ ID NO: 1 onde o primeiro resíduo de aminoácido N-terminal é número 1 e assim por diante.

5 Os termos "análogo" ou "análogos", como usados aqui, destinam-se à designar Fator FIX tendo a seqüência de SEQ ID NO: 1, em que um ou mais aminoácidos da proteína de origem foram substituídos por um outro aminoácido e/ou em que um ou mais aminoácidos da proteína de origem foram deletados e/ou em que um ou mais aminoácidos foram inseridos na
10 proteína e/ou em que um ou mais aminoácidos foram adicionados à proteína de origem. Tal adição pode ocorrer ou na extremidade N-terminal ou na extremidade C-terminal da proteína de origem ou ambas. O "análogo" ou "análogos" dentro dessa definição ainda têm aditividade de FIX em sua forma ativada. Em uma concretização uma variante é 70% idêntica com a seqüência de SEQ ID NO: 1. Em uma concretização uma variante é 80% idêntica
15 com a seqüência de of SEQ ID NO: 1. Em uma outra concretização uma variante é 90% idêntica com a seqüência de SEQ ID NO: 1. Em uma outra concretização uma variante é 95% idêntica com a seqüência de SEQ ID NO: 1. Como usado aqui qualquer referência a posições específicas refere-se à
20 posição correspondente na SEQ ID NO: 1.

A não ser que de outra maneira especificada, domínio de fator IX incluem a seguir resíduo de aminoácidos: domínio de Gla estando a região de resíduo Tyr1 para resíduo Lys43; EGF1 estando a região de resíduo Gln44 a resíduo Leu84; EGF2 estando a região de resíduo Asp85 para resí-
25 duo Arg145; o peptídeo de ativação estando a região de resíduo Ala146 para resíduo Arg180; e o domínio de protease estando a região de resíduo Val181 para Thr414. A cadeia leve refere-se à região que inclui o domínio de Gla, EGF1 e EGF2, enquanto a cadeia pesada refere-se ao domínio de protease.

30 "Semi-vida de FIX" refere-se à semi-vida de fator IX na circulação sanguínea, como determinada em animais tais como camundongos ou em ser humano, como determinada por farmacocinética por procedimentos

padrão conhecidos por pessoas versadas na técnica.

"Atividade de FIX" ou "atividade biológica de FIX" é definida como a capacidade de funcionar nas cascata de coagulação, induz a formação de FXa via interação com FVIIIa em uma plaqueta ativada, e suporta a formação de um coágulo de sangue. A atividade pode ser avaliada in vitro por técnicas tal como análise de coágulo, como descrito, por exemplo, no McCarthi e outros Thromb Haemost. maio de 2002; 87(5):824-30, e outras técnicas conhecidas por pessoas versadas na técnica.

"FIX prolongado" significa um composto de FIX que circula em um paciente por um período de tempo prolongado a seguir administração quando em comparação com o FIX humano nativo.

O termo "resíduo de amino inserido" destina-se à incluir tanto uma substituição de um resíduo de aminoácido natural com um outro resíduo de aminoácido, que não é normalmente encontrado naquela posição da molécula nativa de FIX, quanto uma adição de um resíduo de aminoácido à molécula de FIX humana nativa. A adição de um resíduo de aminoácido pode ser ou entre dois resíduos de aminoácidos existentes ou na extremidade N- ou C-terminal da molécula de fix nativa.

O termo "FIX PEGilado" significa FIX tendo uma molécula de PEG conjugada à molécula de FIX. O termo "FIX cisteína-PEGilada" significa FIX tendo uma molécula de PEG conjugada a um grupo sulfidril de uma cisteína introduzida na molécula de FIX.

A terminologia para as substituições de aminoácido usadas é como se segue. A primeira letra representa o resíduo de aminoácido naturalmente presente em uma posição de FVIII de ser humano. A seguir o número representa a posição em FIX de ser humano. A segunda letra representa o aminoácido diferente que usa como substituição do (resposição) aminoácido natural. Um exemplo é E162C, onde uma lisina na posição 162 de FIX de ser humano é substituída por uma cisteína.

No presente contexto as indicações de três letras ou de uma letra dos aminoácidos foram usadas em seu mío convencional como indicado na tabela 2. A não ser que explicitadamente indicado, os aminoácidos men-

cionados aqui são L-aminoácidos. Além disso, as extremidade a esquerda e a direita de uma seqüência de aminoácidos de um peptídeo are, respectivamente, os N- e C-terminais de outra maneira especificados.

Tabela 2: Abreviações para aminoácidos:

Aminoácido	Código de três letras	Código de uma letra
Glicine	Gly	G
Proline	Pro	P
Alanine	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Fe	F
Tirosina	Tyr	Y
Triptofano	Trp	W
Histidina	His	H
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Glutamina	Gln	Q
Asparagina	Asn	N
Ácido Glutâmico	Glu	E
Ácido aspártico	Asp	D
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Ácido gama- carboxiglutâmico	GLA ou Xaa	

Cys)" e termos similares destinam-se a significar que um grupo tiol de uma cisteína da proteína em questão é conjugada com um composto tendo um grupo tiol, em que o dito composto tem um peso molecular de menos do que 500 Da. Exemplos de tais compostos são glutathione, gama-glutamylcisteína, cisteinylglycine, cisteína, N-acetylcysteína, cysteamine, etc.

O termo "forma ativa" refere-se à forma (ou formas) de uma proteína em que é capaz de realizar uma ação desejada, por exemplo, como um catalisador (enzima), zimogênio, ou como um co-fator, etc. A "forma ativa" é algumas vezes chamada da "forma corretamente dobrada".

A proteína é em geral um polipeptídeo "engenheirado" que em comparação com uma proteína nativa inclui pelo menos uma cisteína não nativa. Tais polipeptídeos "engenheirados" são de preferência preparados por técnicas recombinantes como estarão evidentes por técnicas recombinantes para a pessoa versada na técnica; vide também WO 02/077218 A1 e WO 01/58935 A2.

Todas as referências, incluindo publicações, pedidos de patentes, e patentes são aqui incorporados por referência em sua totalidade e na medida que se cada referência seja individualmente e especificamente indicada ser incorporada por referência e fosse indicada em sua totalidade aqui (na medida máxima permitida pela lei).

Todos os títulos e sub-títulos são usados aqui para conveniência apenas e não seriam interpretados como limitantes da invenção de maneira alguma.

O uso de quaisquer e todos os exemplo, ou linguagem exemplar (por exemplo, "tais como") provido aqui, destina-se à meramente melhor iluminar a invenção e não possui uma limitação no escopo da invenção a não ser que de outra maneira reivindicado. Nenhuma linguagem no relatório seria interpretado como indicando qualquer elemento não reivindicado como essencial à prática da invenção.

Para citação e incorporação dos documentos de patente aqui são feitos para conveniência apenas e não refletem qualquer ponto de vista da validade, patentabilidade e/ou executabilidade de tais documentos de

patente.

Essa invenção inclui todas as modificações e equivalentes do objeto relatado nas reivindicações anexas à mesma uma vez que permitida pela lei aplicável.

5 Concretizações da invenção:

1. Análogo de FIX com uma semi-vida circulatória prolongada, em que pelo menos um dos resíduos de amino naturais na posição 44, 46, 47, 50, 53, 57, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 80, 84, 87, 89, 90, 91, 94, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 113, 116, 119, 120, 121, 123, 125, 129, 138, 10 140, 141, 142, 146-180, 185, 186, 188, 189, 201, 202, 203, 224, 225, 228, 239, 240, 241, 243, 247, 249, 252, 257, 260, 261, 262, 263, 265, 277, 280, 314, 316, 318, 321, 341, 372, 374, 391, 392, 406, 410, 413 ou 415 é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

15 2. Análogo de FIX de acordo com a concretização 1, em que pelo menos um dos resíduos de amino naturais na posição 44, 46, 47, 50, 53, 57, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 80 ou 84 é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

20 3. Análogo de FIX de acordo com a concretização 1, em que pelo menos um dos resíduos de amino naturais na posição 87, 89, 90, 91, 94, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 113, 116, 119, 120, 121, 123, 125, 129, 138, 140, 141 ou 142, é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso 25 molecular do polipeptídeo de FIX.

4. Análogo de FIX de acordo com a concretização 1, em que pelo menos um dos resíduos de amino naturais na posição 185, 186, 188, 189, 201, 202, 203, 224, 225, 228, 239, 240, 241, 243, 247, 249, 252, 257, 260, 261, 262, 263, 265, 277, 280, 314, 316, 318, 321, 341, 372, 374, 391, 392, 30 406, 410, 413 ou 415, é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX

5. Análogo de FIX de acordo com a concretização 1, em que pelo menos um dos resíduos de amino naturais na posição 146-180, é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

5 6. Análogo de FIX de acordo com a concretização 1, em que pelo menos um dos resíduos de amino naturais selecionado das posições 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176 177, é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

10 7. Análogo de FIX de acordo com a concretização 1, em que pelo menos um dos resíduos de amino naturais selecionados de positions 160, 161, 162, 163, 164, 165 e 166, é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

15 8. Análogo de FIX de acordo com a concretização 7, em que resíduo de aminoácido E162 é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

20 9. Análogo de FIX com uma semi-vida circulatória prolongada, em que pelo menos um resíduo de cisteína está anexado ao C-terminal T415, a dita cisteína sendo conjugada com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.

25 10. Análogo de FIX de acordo com qualquer uma das concretizações anteriores, em que o grupo químico é selecionado de polietileno glicóis (PEG).

 11. Análogo de FIX de acordo com a concretização 10, em que o polietilenoglicol tem um peso molecular médio de na faixa de 500-100.000, tais como 1000-75.000, ou 2.000-60.000.

30 12. Análogo de FIX de acordo com qualquer uma das concretizações anteriores, em que o análogo tem uma semi-vida circulatória de pelo menos 1,5 vezes que de FIX de tipo selvagem.

13. Análogo de FIX de acordo com qualquer uma das concretizações anteriores, em que o análogo, quando medido em um ensaio de coagulação, tem uma atividade biológica de pelo menos 20% de FIX de tipo selvagem.

5 14. Um método para preparação de um análogo de FIX de acordo com qualquer uma das concretizações anteriores, compreendendo as etapas de a) redução seletiva de um polipeptídeo de FIX engenheirado compreendendo pelo menos uma cisteína não nativa em uma posição selecionada do grupo da posição 44, 46, 47, 50, 53, 57, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 80,
10 84, 87, 89, 90, 91, 94, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 113, 116, 119, 120, 121, 123, 125, 129, 138, 140, 141, 142, 146-180, 185, 186, 188, 189, 201, 202, 203, 224, 225, 228, 239, 240, 241, 243, 247, 249, 252, 257, 260, 261, 262, 263, 265, 277, 280, 314, 316, 318, 321, 341, 372, 374, 391, 392, 406, 410, 413 ou 415, conjugada através de uma ponte de dissulfeto a um
15 tiol de baixo peso molecular (RS-CYS), por permissão de que o FIX conjugado com tiol de baixo peso molecular reaja com uma mistura compreendendo um tampão de redox e b) uma etapa simultânea ou subsequente de conjugação de pelo menos uma das porções de cisteína seletivamente reduzidas (HS-Cys) com um grupo químico.

20 15 . Um método de acordo com a concretização 14, em que o tampão de redox compreende a uma mistura compreendendo glutathione reduzida ou oxidada e a glutaredoxina.

 16. Um método para preparação de um análogo de FIX de acordo com qualquer uma das concretizações de 1-13, compreendendo as etapas de a) redução seletiva de um polipeptídeo de FIX engenheirado compreendendo pelo menos uma cisteína não nativa em uma posição selecionada do grupo da posição 44, 46, 47, 50, 53, 57, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 80,
25 84, 87, 89, 90, 91, 94, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 113, 116, 119, 120, 121, 123, 125, 129, 138, 140, 141, 142, 146-180, 185, 186, 188, 189, 201, 202, 203, 224, 225, 228, 239, 240, 241, 243, 247, 249, 252, 257, 260,
30 261, 262, 263, 265, 277, 280, 314, 316, 318, 321, 341, 372, 374, 391, 392, 406, 410, 413 ou 415, conjugada através de uma ponte de dissulfeto a um

tiol de baixo peso molecular (RS-CYS), por permissão de que o FIX conjugado com tiol de baixo peso molecular reaja com uma mistura compreendendo um composto de ácido triarilfosfina-3,3',3''-trissulfônico e b) uma etapa simultânea ou subsequente de conjugação de pelo menos uma das porções de cisteína seletivamente reduzidas (HS-Cys) com um grupo químico.

17. Um método de acordo com as concretizações de 14-16, em que o grupo químico é selecionado de polietileno glicóis (PEG).

18. O método de acordo com a concretização 17, em que o grupo químico é um polietilenoglicol, em particular um tendo um peso molecular médio de na faixa de 500-100.000, tais como 1000-75.000, ou 2,000-60.000.

19. Uma formulação farmacêutica para o tratamento de um paciente com hemofilia compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de FIX de acordo com as concretizações de 1-13, juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável.

20. Um método de tratamento de um paciente com hemofilia compreendendo administração ao paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de FIX de acordo com qualquer uma das concretizações de 1-13, juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável.

21. Um método de acordo com a concretização 20, em que o tratamento compreende pelo menos um tratamento uma vez por semana.

22. Um método de acordo com a concretização 21, em que o tratamento compreende apenas o tratamento uma vez por semana.

Exemplos

A terminologia para as substituições de aminoácido usadas nos seguintes exemplos é como se segue. A primeira letra representa o aminoácido naturalmente presente em uma posição de SEQ ID NO: 1. A seguir o número representa a posição em SEQ ID NO: 1. A segunda letra representa o aminoácido diferente usando como substituto do aminoácido natural. Um exemplo é o fator IX E162C, onde um ácido glutâmico na posição 162 de SEQ ID No: 1 é substituído por uma cisteína.

Materiais –Glutathione reduzida ou oxidada (GSH e GSSG, respectivamente) foram adquiridas da Sigma. PEG5k-maleimida (2E2M0H01),

PEG20k-maleimida (2E2M0P01), PEG40k-maleimida (2D3Y0T01) foram adquiridas da Nektar Therapeutics (Huntsville, AL). Todos os outros produtos químicos eram de grau analítico ou melhor.

5 Determinação de concentração – A concentração de GSSG na solução de estoque foi determinada a partir de sua absorção a 248 nm usando-se um coeficiente de extinção de $381 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Chau e Nelson, 1991). A concentração de GSH foi determinada usando-se o reagente de Ellman's (5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico)) e $14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como o coeficiente de extinção molar de ácido 2-nitro-5-tiobenzóico a 412 nm (Riddles e outros.,
10 1979).

Clonagem e expressão de glutaredoxinas – A sequência de codificação de DNA para glutaredoxina 2 de *Escherichia coli* (Grx2) foi ampliada por PCR usando-se sistema de PCR Expand High Fidelity (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) de acordo com as recomendações do fabricante e introdução de par iniciador oHOJ98-f/oHOJ98 que flanqueia sítios de restrição de NdeI e XhoI (seqüências iniciadoras são listadas na Tabela 1). DNA de modelo genômico para a reação de PCR foi preparado a partir de *E. coli* de acordo com o procedimento publicado (Grimberg e outros.,
15 1989). O produto de PCR purificado foi cortado com NdeI e XhoI e então foi ligado nos sítios correspondentes de pET-24a(+) (Novagen) para dar pHOJ294. Uma vez que um códon de parada foi provida pelo vetor, o gene foi equipado com uma extensão derivada de vetor 3' que codifica uma etiqueta de afinidade de LEHHHHHH C-terminal. A identidade correta da sequência clonada foi verificada por seqüenciação de DNA.

25 Para a expressão, o plasmídio 294 foi introduzido para dentro das células de BL21(DE3) competentes (Stratagene, La Jolla, CA). Transformantes de um dia para o outro frescos foram inoculados em 50 ml de caldo terrífico ((Sambrook e outros., 1989)) e $30 \mu\text{g/ml}$ de canamicina em um OD600 inicial de 0,02. Culturas foram desenvolvidas a 37°C em frascos providos de defletor a 230 rpm para a fase logarítma do meio (OD600 3-4) tempo esse em que a temperatura foi diminuída para 25°C e expressão de proteína induzida por isopropil- β -D-tiogalactopironosídeo a 0,1 mM (ITPG). De-
30

pois da expressão de um dia para o outro, células foram coletadas por centrifugação, foram ressuspensas e 50 ml de tampão de lise (fosfato de potássio a 50 mM, NaCl a 300 mM, pH 8,0), e foram lisadas por três ciclos de congelamento-descongelamento. O lisado clareado foi carregado sobre uma
 5 coluna de 20 ml de Ni-NTA Superflow (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) foi equilibrado com tampão de lise a uma taxa de fluxo de 5 ml/min. Depois da lavagem com tampão lise, proteína ligada foi eluída com um gradiente de linear de imidazol a 0-200 mM no tampão de lise. Frações de pico foram combinadas, foram tratadas com ditioneitol a 20mM por 20 min antes da dia-
 10 lise extensiva contra Tris-HCl a 50 mM, EDTA a 2 mM, pH 8,0. A proteína foi armazenada a -80°C e foi avaliada ter >90% de pureza por SDS-PAGE. Concentração foi estimada por absorbância a 280 nm usando-se coeficientes de extinção de 21740 M⁻¹cm⁻¹.

Construção de DNA que codifica de fator IX e mutantes de fator IX E162C e
 15 fator IX 416C–

Plasmídios pHOJ338 e pHOJ358 que codificam fator IX E162C e fator IX 416C, respectivamente, foram construídos por mutagênese de sítio-dirigido QuickChange® usando-se pares de iniciador de oHOJ137-f/oHOJ137-r e oHOJ155-f/oHOJ155-r (vide Tabela 1) como modelo de acor-
 20 do com as instruções do fabricante (Stratagene, La Jolla, CA). A identidade correta de todas as seqüências clonadas foi verificada por seqüenciação de DNA.

Purificação de fator IX e variantes – Fator IX e variantes são purificados como descritos emn Arruda e outros. (2001) Blood, 97, 130-138,
 25 com a exceção de que frações contendo fator IX (Cys variantes) são combinados, são dialisados contra HEPES a 50 mM, NaCl a 100 mM, CaCl₂ a 10 mM, pH 7,0 e são armazenados a -80°C.

Modificação de variantes de FIX Cys com PEG-maleimida – Redução seletiva é realizada por incubação de 4,8 mg de variante de FIX Cys a
 30 30°C por 5 horas em um volume total de 4,4 ml de HEPES a 50 mM, NaCl a 100 mM, CaCl₂ a 10 mM, pH 7,0 tampão contendo GSH a 0,5 mM, GSSG a 20 µM, e Grx2 a 10 µM. Subseqüentemente, geraram tióis livres são seleti-

vamente modificados por adição de PEG5k-maleimida, PEG20k-maleimida, ou PEG40k-maleimida (dissolvidos em água) para dar uma concentração final de 0,8 mM. Alquilação de tiol é deixado que prossiga por 15 min a temperatura ambiente no resfriamento brusco com cisteína a 0,5 mM. EDTA é

5 adicionado em excesso de cálcio (concentração final de 20 mM) e o conteúdo total carregado sobre uma coluna de 1 ml de HiTrap Q FF (Amersham Biosciences, GE Healthcare) equilibrado com tampão A (HEPES a 50 mM, NaCl a 100 mM, EDTA a 1 mM, pH 7,0) para capturar variante de FIX Cys.

Depois da lavagem com tampão A, eluição de uma etapa da proteína ligada

10 é realizada com tampão B (GlyGly a 10 mM, NaCl a 150 mM, CaCl₂ a 10 mM, 0,01% de Tween 80, pH 7,0) diretamente sobre uma coluna de HiLoad Superdex 200 16/60 pg (Amersham Biosciences) montada em frente da coluna de HiTrap. Espécies PEGiladas e não PEGiladas são separadas a uma taxa de fluxo de 1 ml/min e são detectadas por absorção a 280 nm. O pico

15 contendo variante de FIX Cys PEGilado é coletado e é armazenado a -80°C.

Tabela 1

Oligos de DNA usados para a construção de plasmídios.

Iniciador	Plasmid	Seqüência (5'→3')
oHOJ98-f	pHOJ294	GCCGCCGGCATATGAAGCTATACATTTACGATCACTGCCC
oHOJ98-r	pHOJ294	CCGCCGCCCTCGAGAATCGCCATTGATGATAACAAATTGATTTG TG
oHOJ137-f	pHOJ338	CTATGTAAATTCTACTGAAGCTTGCACCATTTTGGATAACATCAC
oHOJ137-r	pHOJ338	GTGATGTTATCCAAAATGGTGCAAGCTTCAGTAGAATTTACATAG
oHOJ155-f	pHOJ358	GGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTTGCTAAGCGGCCGCTTCC C
oHOJ155-r	pHOJ358	GGGAAGCGGCCGCTTAGCAAGTGAGCTTTGTTTTTCCTTAATC C

Referências

- Begbie M. E., Mamdani A., Gataiance S., Eltringham-Smith L. J.,
- 20 Bhakta V., Hortelano G., e Sheffield W. P. (2005) An important role for the activation peptide domain in controlling factor IX levels in the blood of hemofi-

lia B mice. *Thromb Haemost* 94, 1138-1147.

Brandstetter H, Bauer M, Huber R, Lollar P, Bode W (1995) X-ray structure of clotting factor IXa: active site e module structure related to Xase activity e hemophilia B. *PNAS* 92, 9796-9800.

5 Chau, M.H. e Nelson, J.W. (1991). Direct measurement of the equilibrium entre glutathione e dithiothreitol by high performance liquid chromatographi. *FEBS Lett.* 291, 296-298.

Fernandes, A.P. e Holmgren, A. (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzyme com functions far beyond a simple tioredoxin backup system. *Antioxid.Redox.Signal.*, 6, 63-74

10 Gilbert, H. F. (1995). Thiol/disulfide exchange equilibria e disulfide bond stability. *Methods Enzymol.* 251, 8-28.

Grant, C. (2001). MicroReview: Role of the glutathione/glutaredoxin e tioredoxin systems in yeast growth e response to stress conditions. *Mol. Microbiol.* 39, 533-541

Grimberg, J., Maguire, S., e Belluscio, L. (1989). A simple method for the preparation of plasmid e chromosomal E. coli DNA. *Nucleic Acids Res* 17, 8893.

Holmgren, A., Åslund, F. (1995) Glutaredoxin, *Método Enzymol.* 252, 283-292

Hoffman, C.S. e Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.

Hoffman M. e Monroe D. M., III (2001) A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 85, 958-965.

Hopfner K.P., Lang A., Karcher A., Sichler K., Kopetzki E., Brandstetter H., Huber R., Bode W., Engh R.A. (1999) Coagulation factor IXa: the relaxed conformation of Tyr99 blocks substrate binding. *Structure com Folding & design.* 7, 989-96

30 Loferer, H., Wunderlich, M., Hennecke, H., e Glockshuber, R. (1995). A bacterial tioredoxin-like protein that is exposed to the periplasm tem redox properties comparable com those of cytoplasmic tioredoxins. *J.*

Biol. Chem. 270, 26178-26183.

- Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W., e Grant, C. M. (1998).
The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxina genes that
are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* 9,
5 1081-1091

Lundberg, M., Johansson, C., Chandra, J., Enoksson, M., Jacobsson, G., Ljung, J., Johansson, M., e Holmgren, A. (2001). Cloning e expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial e nuclear isoforms. *J Biol Chem* 276, 26269-26275

- 10 McCarthy e outros (2002). Pharmacokinetics of recombinant factor IX after intravenous e subcutaneous administration in dogs e cynomolgus monkeys. *Thromb Haemost.* 87(5):824-30.

Rodriguez-Manzanique, M. T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., e Herre-
ro, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 8180-
15 8190

- Oe, T., Ohiagi, T., Naganuma, A. (1998) Determination of γ -glutamylglutathione e other low-molecular-mass thiol compounds by isocratic high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chrom.*
20 B, 708, 285-289

Ostergaard, H., Tachibana, C., e Winther, J. R. (2004). Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J Cell Biol* 166, 337-345.

- Padilla, C. A., Martinez-Galisteo, E., Barcena, J. A., Spirou, G., e
25 Holmgren, A. (1995). Purification from placenta, amino acid sequence, structure comparisons e cDNA cloning of human glutaredoxin. *Eur J Biochem* 227, 27-34

Riddles, P. W., Blakeley, R. L., e Zerner, B. (1979). Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)--a reexamination. *Anal. Biochem.* 94,
30 75-81.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., e Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor

Laboratory).

Schmidt A. E. e Bajaj S. P. (2003) Structure-function relationships in factor IX e factor IXa. *Trends Cardiovasc Med* 13, 39-45

5 Takahashi, N. e Creighton, T.E. (1996). On the reactivity e ionization of the active site cysteine residues of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* 35, 8342-8353.

Wang, E.C.W., Hung, S. -H., Cahoon, M., Hedstrom, L. (1997) The role of Cys191-Cys220 disulfide bond in trypsin: new targets for engineering substrate specificity. *Protein Engineering*, 10, 405-411

10 Vlamis-Gardikas, A., Aslund, F., Spirou, G., Bergman, T., and Holmgren, A. (1997). Cloning, overexpression, e characterization of glutaredoxin 2, an atypical glutaredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 11236-11243.

15 Yang, Y., Jao, S., Nanduri, S., Starke, D. W., Mieyal, J. J., and Qin, J. (1998). Reactivity of the human thioltransferase (glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S mutant e NMR solution structure of its glutathionyl mixed disulfide intermediate reflect catalytic specificity. *Biochemistry* 37, 17145-17156

LISTA DE SEQUÊNCIA

<110> NOVO NORDISK A/S
 <120> PROLONGED FACTOR IX ANALOGUES AND DERIVATIVES
 <130> 7387.204-WO
 5 <160> 1
 <170> PATENTIN VERSION 3.3
 <210> 1
 <211> 415
 <212> PRT
 10 <213> HOMO SAPIENS
 <220>
 <221> THE THREE-LETTER INDICATION "XAA" MEANS 4-CARBOXYGLUTAMIC ACID
 (GAMMA-CARBOXYGLUTAMATE)
 <222> (1)..(415)
 15 <400> 1
 TYR ASN SER GLY LYS LEU XAA XAA PHE VAL GLN GLY ASN LEU XAA ARG
 1 5 10 15
 XAA CYS MET XAA XAA LYS CYS SER PHE XAA XAA ALA ARG XAA VAL PHE
 20 25 30
 20 XAA ASN THR XAA ARG THR THR XAA PHE TRP LYS GLN TYR VAL ASP GLY
 35 40 45
 ASP GLN CYS GLU SER ASN PRO CYS LEU ASN GLY GLY SER CYS LYS ASP
 50 55 60
 ASP ILE ASN SER TYR GLU CYS TRP CYS PRO PHE GLY PHE GLU GLY LYS
 25 65 70 75 80
 ASN CYS GLU LEU ASP VAL THR CYS ASN ILE LYS ASN GLY ARG CYS GLU
 85 90 95
 GLN PHE CYS LYS ASN SER ALA ASP ASN LYS VAL VAL CYS SER CYS THR
 100 105 110
 30 GLU GLY TYR ARG LEU ALA GLU ASN GLN LYS SER CYS GLU PRO ALA VAL
 115 120 125
 PRO PHE PRO CYS GLY ARG VAL SER VAL SER GLN THR SER LYS LEU THR

	130	135	140	
	ARG ALA GLU THR VAL PHE PRO ASP VAL ASP TYR VAL ASN SER THR GLU			
	145	150	155	160
	ALA GLU THR ILE LEU ASP ASN ILE THR GLN SER THR GLN SER PHE ASN			
5	165	170	175	
	ASP PHE THR ARG VAL VAL GLY GLY GLU ASP ALA LYS PRO GLY GLN PHE			
	180	185	190	
	PRO TRP GLN VAL VAL LEU ASN GLY LYS VAL ASP ALA PHE CYS GLY GLY			
	195	200	205	
10	SER ILE VAL ASN GLU LYS TRP ILE VAL THR ALA ALA HIS CYS VAL GLU			
	210	215	220	
	THR GLY VAL LYS ILE THR VAL VAL ALA GLY GLU HIS ASN ILE GLU GLU			
	225	230	235	240
	THR GLU HIS THR GLU GLN LYS ARG ASN VAL ILE ARG ILE ILE PRO HIS			
15	245	250	255	
	HIS ASN TYR ASN ALA ALA ILE ASN LYS TYR ASN HIS ASP ILE ALA LEU			
	260	265	270	
	LEU GLU LEU ASP GLU PRO LEU VAL LEU ASN SER TYR VAL THR PRO ILE			
	275	280	285	
20	CYS ILE ALA ASP LYS GLU TYR THR ASN ILE PHE LEU LYS PHE GLY SER			
	290	295	300	
	GLY TYR VAL SER GLY TRP GLY ARG VAL PHE HIS LYS GLY ARG SER ALA			
	305	310	315	320
	LEU VAL LEU GLN TYR LEU ARG VAL PRO LEU VAL ASP ARG ALA THR CYS			
25	325	330	335	
	LEU ARG SER THR LYS PHE THR ILE TYR ASN ASN MET PHE CYS ALA GLY			
	340	345	350	
	PHE HIS GLU GLY GLY ARG ASP SER CYS GLN GLY ASP SER GLY GLY PRO			
	355	360	365	
30	HIS VAL THR GLU VAL GLU GLY THR SER PHE LEU THR GLY ILE ILE SER			
	370	375	380	
	TRP GLY GLU GLU CYS ALA MET LYS GLY LYS TYR GLY ILE TYR THR LYS			

385

390

395

400

VAL SER ARG TYR VAL ASN TRP ILE LYS GLU LYS THR LYS LEU THR

405

410

415

REIVINDICAÇÕES

1. Análogo de FIX com uma semi-vida circulatória prolongada, em que pelo menos um dos resíduos de amino naturais na posição 44, 46, 47, 50, 53, 57, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 80, 84, 87, 89, 90, 91, 94, 100, 101,
5 102, 103, 104, 105, 106, 108, 113, 116, 119, 120, 121, 123, 125, 129, 138, 140, 141, 142, 146-180, 185, 186, 188, 189, 201, 202, 203, 224, 225, 228, 239, 240, 241, 243, 247, 249, 252, 257, 260, 261, 262, 263, 265, 277, 280, 314, 316, 318, 321, 341, 372, 374, 391, 392, 406, 410, 413 ou 415 é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com
10 um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.
2. Análogo de FIX de acordo com claim 1, em que pelo menos um dos resíduos de amino naturais na posição 146-180, é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.
- 15 3. Análogo de FIX de acordo com a reivindicação 2, em que resíduo de aminoácido E162 é usado como substituto de um resíduo de aminoácido de cisteína conjugado com um grupo químico que aumenta o peso molecular do polipeptídeo de FIX.
- 20 4. Análogo de FIX de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o grupo químico é selecionado de polietileno glicóis (PEG).
5. Análogo de FIX de acordo com a reivindicação 4, em que o polietilenoglicol tem um peso molecular médio de na faixa de 500-100,000, tais como 1000-75,000, ou 2,000-60,000.
- 25 6. Análogo de FIX de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o análogo tem uma semi-vida circulatória de pelo menos 1,5 vezes que de FIX de tipo selvagem.
- 30 7. Análogo de FIX de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o análogo, quando medido em um ensaio de coagulação, tem uma atividade biológica de pelo menos 20% de FIX de tipo selvagem.
8. Um método para preparação de um análogo de FIX de acordo

com qualquer uma das reivindicações anteriores, compreendendo as etapas de a) redução seletiva an polipeptídeo de FIX engenheirado compreendendo pelo menos uma cisteína não nativa em uma posição selecionada do grupo da posição 44, 46, 47, 50, 53, 57, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 80, 84, 87, 89, 90, 91, 94, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 113, 116, 119, 120, 121, 123, 125, 129, 138, 140, 141, 142, 146-180, 185, 186, 188, 189, 201, 202, 203, 224, 225, 228, 239, 240, 241, 243, 247, 249, 252, 257, 260, 261, 262, 263, 265, 277, 280, 314, 316, 318, 321, 341, 372, 374, 391, 392, 406, 410, 413 ou 415, conjugada através de uma ponte de dissulfeto a um tiol de baixo peso molecular (RS-CYS), por permissão de que o FIX conjugado com tiol de baixo peso molecular reaja com uma mistura compreendendo um tampão de redox e b) uma etapa simultânea ou subsequente de conjugação de pelo menos uma das porções de cisteína seletivamente reduzidas (HS-Cys) com um grupo químico.

9. Um método para preparação de um análogo de FIX de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1-7, compreendendo as etapas de a) redução seletiva de um polipeptídeo de FIX engenheirado compreendendo pelo menos uma cisteína não nativa em uma posição selecionada do grupo da posição 44, 46, 47, 50, 53, 57, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 80, 84, 87, 89, 90, 91, 94, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 113, 116, 119, 120, 121, 123, 125, 129, 138, 140, 141, 142, 146-180, 185, 186, 188, 189, 201, 202, 203, 224, 225, 228, 239, 240, 241, 243, 247, 249, 252, 257, 260, 261, 262, 263, 265, 277, 280, 314, 316, 318, 321, 341, 372, 374, 391, 392, 406, 410, 413 ou 415, conjugada através de uma ponte de dissulfeto a um tiol de baixo peso molecular (RS-CYS), por permissão de que o FIX conjugado com tiol de baixo peso molecular reaja com uma mistura compreendendo um composto de ácido triarilfosfina-3,3',3''-trissulfônico e b) uma etapa simultânea ou subsequente de conjugação de pelo menos uma das porções de cisteína seletivamente reduzidas (HS-Cys) com um grupo químico.

10. Um método de acordo com a reivindicações 8-9, em que o grupo químico é selecionado de polietileno glicóis (PEG).

11. O método de acordo com a reivindicação 10, em que o grupo

químico é um polietilenoglicol, em particular um tendo um peso molecular médio of na faixa de 500-100.000, tais como 1000-75.000, ou 2.000-60.000.

5 12. Uma formulação farmacêutica para o tratamento de um paciente com hemofilia compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de FIX de acordo com a reivindicação 1-7, juntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável.

10 13. Um método de tratamento de um paciente com hemofilia compreendendo administração ao paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de FIX de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1-7, juntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável.

14. Um método de acordo com a reivindicação 13, em que o tratamento compreende pelo menos um tratamento uma vez por semana.

15. Um método de acordo com a reivindicação 14, em que o tratamento compreende apenas o tratamento uma vez por semana.

RESUMO

Patente de Invenção: **"DERIVADOS E ANÁLOGOS DE FIX PROLONGADOS"**.

A presente invenção refere-se a análogos de FIX que têm um
5 tempo de circulação aumentado na corrente sanguínea antes da ativação
em comparação com aquele de FIX nativo (e uma semana depois da injeção
para um paciente retém pelo menos cerca de 5% da atividade de FIX em
comparação com o valor de pico de atividade inicial alcançado depois da
injeção). Os análogos de FIX reivindicados compreendem um resíduo de
10 cisteína inserido que foi ulteriormente modificado por conjugação com um
grupo químico que aumenta o peso molecular do análogo de FIX.