



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0720619-4 B1



(22) Data do Depósito: 27/12/2007

(45) Data de Concessão: 05/04/2022

(54) Título: COMPOSTO DE FATOR IX-POLI(ETILENO GLICOL) COM UMA LIGAÇÃO LIBERÁVEL, MÉTODO PARA PREPARAR O MESMO E COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: C08G 65/333; A61K 47/60; C08G 65/334; A61P 7/00.

(52) CPC: C08G 65/33337; A61K 47/60; C08G 65/3332; C08G 65/33396; C08G 65/3348; (...).

(30) Prioridade Unionista: 27/12/2006 US 60/877,589.

(73) Titular(es): NEKTAR THERAPEUTICS.

(72) Inventor(es): MARY J. BOSSARD; GAYLE STEPHENSON.

(86) Pedido PCT: PCT US2007026425 de 27/12/2007

(87) Publicação PCT: WO 2008/082613 de 10/07/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/06/2009

(57) Resumo: CONJUGADOS DE PORÇÃO DE FATOR IX-POLÍMERO TENDO UMA LIGAÇÃO LIBERÁVEL. A presente invenção fornece conjugados de porção de fator IX-polímero tendo uma ligação liberável. Métodos para fabricação de conjugados, métodos para administrar conjugados são também fornecidos.

**COMPOSTO DE FATOR IX-POLI(ETILENO GLICOL) COM UMA LIGAÇÃO
LIBERÁVEL, MÉTODO PARA PREPARAR O MESMO E COMPOSIÇÃO**

Referência Cruzada A Pedidos Relacionados

Este pedido reivindica o benefício de prioridade do
5 pedido de patente provisória do EUA n.º de série
60/877.589, depositado em 27 de dezembro de 2006, que é
incorporado neste para referência em sua totalidade.

Campo Da Invenção

A presente invenção se refere geralmente a conjugados
10 polímero-agente ativo que têm uma ligação liberável para
liberar desse modo in vivo o agente ativo. Além disso, a
invenção se refere, entre outras coisas, a métodos para
sintetizar os conjugados, métodos para purificar os
conjugados e assim por diante.

15 **Fundamentos Da Invenção**

Os cientistas e os clínicos enfrentam numerosos
desafios em suas tentativas de desenvolver agentes ativos
em formas adequadas para administração a um paciente. Os
agentes ativos que são polipeptídeos, por exemplo, são
20 freqüentemente administrados através de injeção ao invés de
oralmente. Desta maneira, o polipeptídeo é introduzido na
circulação sistêmica sem exposição ao ambiente proteolítico
do estômago. A injeção de polipeptídeos, entretanto, tem
diversos inconvenientes. Por exemplo, muitos polipeptídeos
25 têm uma meia vida relativamente curta, necessitando desse
modo de injeções repetidas, que são freqüentemente
incômodas e dolorosas. Além disso, alguns polipeptídeos
podem eliciar uma ou várias respostas imunes com a
conseqüência que o sistema imune do paciente tenta destruir
30 ou neutralizar de outra maneira o polipeptídeo imunogênico.

Naturalmente, uma vez que o polipeptídeo seja destruído ou neutralizado de outra maneira, o polipeptídeo não pode exercer sua atividade farmacodinâmica pretendida. Assim, a administração de agentes ativos tais como polipeptídeos é
5 frequentemente problemática mesmo quando estes agentes são administrados por injeção.

Algum sucesso foi conseguido ao tratar os problemas de administração de agentes ativos através de injeção. Por exemplo, conjugar o agente ativo a um polímero solúvel em
10 água conduziu a um conjugado polímero-agente ativo que tem imunogenicidade e antigenicidade reduzidas. Além disso, estes conjugados polímero-agente ativo frequentemente têm meias vidas grandemente aumentadas em comparação com suas contrapartes não conjugadas em consequência da depuração
15 diminuída através dos rins e/ou degradação enzimática diminuída na circulação sistêmica. Em consequência de ter uma meia vida maior, o conjugado polímero-agente ativo exige dosagem menos freqüente, que reduz por sua vez o número total de injeções dolorosas e de visitas incômodas a
20 um profissional de cuidados médicos. Além disso, os agentes ativos que eram somente marginalmente solúveis demonstram um aumento significativo na solubilidade em água quando conjugados a um polímero solúvel em água.

Devido à sua segurança documentada assim como sua
25 aprovação pela FDA tanto para uso tópico como interno, o polietilenoglicol tem sido conjugado a agentes ativos. Quando um agente ativo é conjugado a um polímero de polietilenoglicol, ou "PEG", o agente ativo conjugado é denominado convencionalmente "PEGilado." O sucesso
30 comercial de agentes ativos PEGilados, tais como interferon

alfa-2a PEGilado PEGASYS® (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ),
interferon alfa-2b PEGilado PEG-INTRON® (Schering Corp.,
Kennilworth, NJ) e PEG-filgrastim de NEULASTA™ (Amgen Inc.,
Thousand Oaks, CA) demonstra que a administração de uma
5 forma conjugada de um agente ativo pode ter vantagens
significativas sobre a contraparte não conjugada. Moléculas
pequenas tais como o distearoilfosfatidiletanolamina
(Zalipsky (1993) *Bioconjug. Chem.* 4 (4): 296-299) e
fluorouracil (Ouchi *et al.* (1992) *Drug Des. Discov.*
10 9(1):93-105) igualmente foram PEGiladas. Harris *et al.*
forneceram uma revisão dos efeitos da PEGilação em
farmacêuticos. Harris *et al.* (2003) *Nat. Rev. Drug Discov.*
2(3):214-221.

Apesar destes sucessos, a conjugação de um polímero
15 com um agente ativo para resultar em uma droga
comercialmente relevante é freqüentemente desafiadora. Por
exemplo, a conjugação pode resultar em o polímero ser
fixado no ou perto de um local no agente ativo que é
necessário para a atividade farmacológica (por exemplo, no
20 ou perto de um local de ligação). Tais conjugados podem
conseqüentemente ter atividade inaceitavelmente baixa
devido, por exemplo, aos efeitos estéricos introduzidos
pelo polímero. As tentativas de remediar conjugados que têm
atividade inaceitavelmente baixa podem ser frustradas
25 quando o agente ativo tem pouco ou nenhum local adequado
para a fixação de um polímero. Assim, alternativas
adicionais de PEGilação têm sido desejadas.

Um enfoque sugerido para resolver este e outros
problemas é "PEGilação reversível" onde o agente ativo
30 nativo (ou uma parte que tem atividade aumentada comparada

ao agente ativo PEGilado) é liberado. Por exemplo, PEGilação reversível foi divulgada no campo de quimioterapias de câncer. Vide Greenwald (1997) *Exp. Opin. Ther. Patents* 7 (6):601-609. A publicação de pedido de patente dos EUA n.º 2005/0079155 descreve conjugados usando 5 ligações reversíveis. Como descrito nesta publicação, as ligações reversíveis podem ser efetuadas com o uso de uma parte do substrato de enzima. Entretanto, já foi assinalado que abordagens dependendo de atividade enzimática são dependentes da disponibilidade de enzimas. Veja Peleg-Schulman (2004) *J. Med. Chem.* 47:4897-4904. A variabilidade do paciente em torno da quantidade e da atividade destas 10 enzimas pode introduzir o desempenho incompatível do conjugado entre populações diferentes. Assim, abordagens adicionais que não dependem de processos enzimáticos para a 15 degradação foram descritos como sendo desejáveis.

Outro enfoque para PEGilação reversível é descrito na patente dos EUA n.º 7.060.259, que descreveu (entre outras coisas) pró-drogas solúveis em água em que um agente 20 biologicamente ativo é ligado a um polímero não-imunogênico solúvel em água por uma ligação carbamato hidrolisável. Como descrito neste, o agente biologicamente ativo pode prontamente ser liberado pela hidrólise da ligação carbamato in vivo sem a necessidade de adicionar enzimas ou 25 materiais catalíticos.

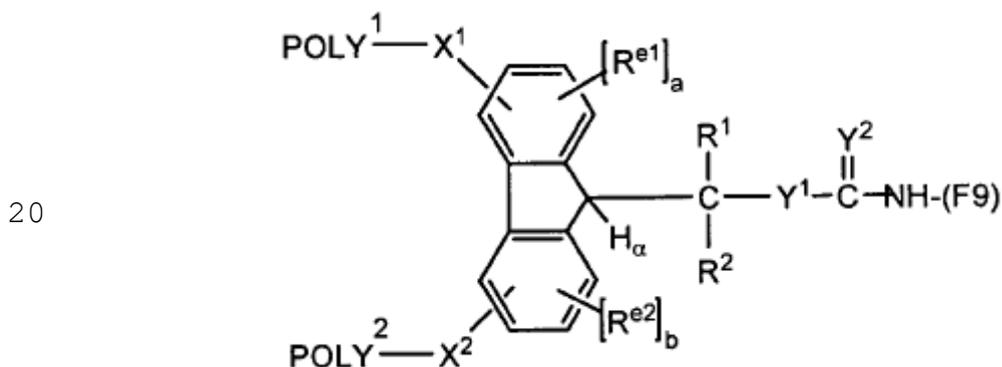
Outra abordagem para PEGilação reversível é descrito em Peleg-Schulman (2004) *J. Med. Chem.* 47:4897-4904, WO2004/089280 e publicação de pedido de patente dos EUA n.º 2006/0171920. Embora esta abordagem seja aplicada a um 30 número limitado de agentes ativos, estas referências

ignoram outros agentes ativos para os quais a PEGilação reversível seria particularmente adequada. Ainda outra abordagem liberável é descrito na publicação de pedido de patente dos EUA n.º 2006/0293499.

5 Na área de distúrbios hemorrágicos, as proteínas (como, por exemplo, o Fator IX) podem às vezes ser administradas a um paciente para tratar ou melhorar de outra maneira o distúrbio hemorrágico. Devido à meia vida relativamente curta do Fator IX e proteínas relacionadas,
10 seria vantajoso aumentar a meia vida in vivo destas proteínas, por exemplo, por PEGilação reversível. Assim, a presente invenção procura resolver esta e outras necessidades da arte.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

15 Em uma ou várias configurações da invenção, um conjugado da seguinte fórmula é fornecido:



onde:

POLY¹ é um primeiro polímero solúvel em água;

25 POLY² é um segundo polímero solúvel em água;

X¹ é uma primeira porção espaçadora;

X² é uma segunda porção espaçadora;

H_α é um átomo de hidrogênio ionizável;

R¹ é H ou um radical orgânico;

30 R² é H ou um radical orgânico;

(a) é ou zero ou um;

(b) é ou zero ou um;

R^{e1} , quando presente, é um primeiro grupo de alteração de elétron;

5 R^{e2} , quando presente, é um segundo grupo de alteração de elétron; e

Y^1 é O ou S;

Y^2 é O ou S; e

10 F_9 é um resíduo de uma porção de Fator IX contendo amina.

Em uma ou várias configurações da invenção, métodos para preparar conjugados são fornecidos.

Em uma ou várias configurações da invenção, preparações farmacêuticas que compreendem os conjugados são
15 fornecidas.

Em uma ou várias configurações da invenção, métodos para administrar os conjugados são fornecidos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é uma curva tempo-concentração dos
20 conjugados das invenções. Informações adicionais a respeito desta figura são fornecidas no Exemplo 3.

A Figura 2 fornece a atividade de coagulação dos conjugados da invenção. Informações adicionais a respeito desta figura são fornecidas no Exemplo 4.

DESCRIPÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

25 Antes de descrever a presente invenção em detalhes, deve-se compreender que esta invenção não está limitada aos polímeros, técnicas sintéticas, agentes ativos e semelhantes, em particular, porque tais podem variar.

30 Deve-se notar que, como usadas neste descrição e nas

reivindicações, as formas singulares "um", "uma" e "o", "a" incluem referentes plurais a menos que o contexto determine claramente de outra maneira. Assim, por exemplo, referência a um "polímero" inclui um único polímero assim como dois ou
5 mais do mesmo ou de polímeros diferentes, referência a um "conjugado" se refere a um único conjugado assim como dois ou mais do mesmo ou conjugados diferentes, referência a um "excipiente" inclui um único excipiente assim como dois ou mais do mesmo ou excipientes diferentes, e semelhantes.

10 Ao descrever e reivindicar a presente invenção, a seguinte terminologia será usada de acordo com as definições descritas abaixo.

"PEG", "polietileno glicol" e "poli(etileno glicol)" como usados neste destinam-se a abranger qualquer
15 poli(óxido de etileno) solúvel em água. Tipicamente, PEGs para o uso de acordo com a invenção compreendem a seguinte estrutura $\text{-O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{-}$, onde (m) é 2 a 4000. Como usado neste, PEG igualmente inclui $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ e $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{-}$, dependendo se os oxigênios terminais
20 tiverem sido deslocados ou não. Quando o PEG ainda compreende uma porção espaçadora (a ser descrita em mais detalhes abaixo) os átomos que compreendem a porção espaçadora, quando covalentemente fixados a um segmento de polímero solúvel em água, não conduzem à formação de uma
25 ligação do oxigênio-oxigênio (isto é, uma -O-O- ou ligação peróxido). Durante toda a descrição e as reivindicações, deve-se recordar que o termo "PEG" inclui estruturas que têm vários terminais ou grupos de "capeamento de extremidade" e assim por diante. O termo
30 "PEG" igualmente significa um polímero que contém uma

maioria, o que quer dizer, maior de 50% de subunidades monoméricas $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$. No que diz respeito a formas específicas, o PEG pode ter qualquer número de uma variedade de pesos moleculares, assim como estruturas ou geometrias tais como "ramificadas", "lineares", "bifurcadas", "multifuncionais" e semelhantes, a serem descritas em mais detalhes abaixo.

Os termos "extremidade capeada" ou "terminalmente capeado" são usados permutavelmente neste para se referir a um terminal ou ponto final de um polímero que tem uma porção de extremidade capeada. Tipicamente, embora não necessariamente, a porção de extremidade capeada compreende um grupo hidróxi ou alcóxi C_{1-20} . Assim, exemplos de porções de extremidade capeada incluem alcóxi (por exemplo, metoxi, etóxi e benziloxi), assim como arila, heteroarila, ciclo, heterociclo e semelhantes. Além disso, formas saturadas, não saturadas, substituídas e insubstituídas de cada um dos antecedentes são previstas. Além disso, o grupo de extremidade capeada pode igualmente ser um silano. O grupo de extremidade capeada pode igualmente vantajosamente compreender um rótulo detectável. Quando o polímero tem um grupo de extremidade capeada compreendendo um rótulo detectável, a quantidade ou a posição do polímero e/ou da porção (por exemplo, agente ativo) de interesse ao qual o polímero é acoplado podem ser determinadas usando um detector apropriado. Tais rótulos incluem, sem limitação, fluorescentes, quimioluminescentes, porções usadas na rotulagem de enzima, colorimétricos (por exemplo, tinturas), íons de metal, porções radioativas e semelhantes. Detectores apropriados incluem fotômetros,

películas, espectrômetros e semelhantes.

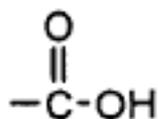
“Não ocorrendo naturalmente”, no que diz respeito a um polímero ou polímero solúvel em água significa um polímero que em sua totalidade não é encontrado na natureza. Um polímero ou polímero solúvel em água não ocorrendo naturalmente podem, entretanto, conter uma ou várias subunidades ou porções de uma subunidade que ocorrem naturalmente, contanto que a estrutura total do polímero não seja encontrada na natureza.

10 O termo “polímero solúvel em água” é qualquer polímero que seja solúvel em água na temperatura ambiente. Tipicamente, um polímero solúvel em água transmitirá pelo menos aproximadamente 75%, mais preferivelmente pelo menos aproximadamente 95% de luz, transmitida pela mesma solução após a filtração. Em uma base de peso, um polímero solúvel em água será preferivelmente pelo menos aproximadamente 35% (em peso) solúvel em água, mais preferivelmente pelo menos aproximadamente 50% (em peso) solúvel em água, ainda mais preferivelmente aproximadamente 85% (em peso) solúvel em 20 água. É ainda mais preferido, entretanto, que o polímero solúvel em água seja aproximadamente 95% (em peso) solúvel em água, sendo mais preferido que o polímero solúvel em água seja completamente solúvel em água.

O peso molecular no contexto de um polímero solúvel em 25 água da invenção, tal como PEG, pode ser expresso ou como um peso molecular médio numérico ou um peso molecular ponderal médio. Salvo indicação contrária, todas as referências ao peso molecular neste se referem ao peso molecular ponderal médio. Ambas as determinações de peso 30 molecular, médio numérico e ponderal médio, podem ser

medidas usando cromatografia de permeação de gel ou outras técnicas de cromatografia líquida. Outros métodos para medir valores de peso molecular podem igualmente ser usados, tais como o uso de análise de grupo de extremidade 5 ou a medida de propriedades coligativas (por exemplo, depressão do ponto de congelamento, elevação do ponto de ebulição, ou pressão osmótica), para determinar o peso molecular médio numérico ou o uso de técnicas de espalhamento de luz, ultracentrifugação ou viscosimetria para 10 determinar o peso molecular ponderal médio. Os polímeros da invenção são tipicamente polidispersos (isto é, o peso molecular médio numérico e o peso molecular ponderal médio dos polímeros não são iguais), possuindo baixos valores de polidispersidade de preferivelmente menos do que 15 aproximadamente 1,2, mais preferivelmente menos do que aproximadamente 1,15, ainda mais preferivelmente menos do que aproximadamente 1,10, ainda mais preferivelmente menos do que aproximadamente 1,05, e mais preferivelmente menos do que aproximadamente 1,03.

20 Como usado neste, o "ácido carboxílico" é uma porção que tem um grupo funcional



[igualmente representado como um "-COOH" ou -C(O)OH], 25 assim como porções que são derivadas de um ácido carboxílico, tais derivados incluindo, por exemplo, ácidos carboxílicos protegidos. Assim, a menos que o contexto determine claramente de outra maneira, o termo ácido carboxílico inclui não somente a forma ácida, mas também 30 ésteres correspondentes e formas protegidas. No que diz

respeito aos grupos de proteção adequados para um ácido carboxílico e qualquer outro grupo funcional descrito neste, referência é feita a Greene *et al.*, "PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS" 3ª Edição, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999.

Os termos "reativo" e "ativado" quando usados conjuntamente com um grupo funcional particular, se referem a um grupo funcional reativo que reage prontamente com um eletrófilo ou um nucleófilo em outra molécula. Isto está em contraste com aqueles grupos que exigem catalisadores fortes ou condições de reação altamente impraticáveis a fim de reagir (isto é, um grupo "não reativo" ou "inerte").

O termos "protegido", "grupo de proteção" e "grupo protetor" se referem à presença de uma porção (isto é, o grupo de proteção) que impede ou bloqueia a reação de um grupo funcional quimicamente reativo particular em uma molécula sob determinadas circunstâncias de reação. O grupo de proteção variará dependendo do tipo de grupo funcional quimicamente reativo que está sendo protegido, assim como das condições de reação a serem empregadas e da presença de grupos reativos ou de proteção adicionais na molécula, se existirem. Grupos de proteção conhecidos na arte podem ser encontrados em Greene *et al.*, *supra*.

Como usado neste, o termo "grupo funcional" ou qualquer sinônimo do mesmo se destina a abranger formas protegidas do mesmo.

Os termos "espaçador" ou "porção espaçadora" são usados neste para se referirem a um átomo ou uma coleção de átomos que aparecem opcionalmente entre uma porção e outra. As porções espaçadoras podem ser hidroliticamente estáveis

ou podem incluir uma ou várias ligações fisiologicamente hidrolisáveis ou enzimaticamente liberáveis.

Um "radical orgânico" como usado neste inclui, por exemplo, alquila, alquila substituída, alquenila, alquenila substituída, alquinila, alquinila substituída, arila e arila substituída.

"Alquila" se refere uma cadeia de hidrocarboneto, variando tipicamente de aproximadamente 1 a 20 átomos de comprimento. Tais cadeias de hidrocarboneto são saturadas preferivelmente, mas não necessariamente, e podem ser cadeias ramificadas ou retas, embora tipicamente a cadeia reta seja preferida. Grupos alquila exemplares incluem metila, etila, propila, butila, pentila, 1-metilbutil, 1-etilpropil, 3-metilpentil e semelhantes. Como usada neste, "alquila" inclui cicloalquila quando três ou mais átomos de carbono são providos e uma alquila inferior.

"Alquila inferior" se refere a um grupo alquila que contém de 1 a 6 átomos de carbono e pode ser de cadeia reta ou ramificada, como exemplificado por metila, etila, *n*-butila, *iso*-butila e *tert*-butila.

"Cicloalquila" se refere a uma cadeia de hidrocarboneto cíclica saturada ou não saturada, incluindo compostos cíclicos em ponte, fundidos, ou espiro, preferivelmente formados por 3 a aproximadamente 12 átomos de carbono, mais preferivelmente 3 a aproximadamente 8 átomos de carbono.

"Substituintes não interferentes" são aqueles grupos que, quando presentes em uma molécula, são tipicamente não-reativos com outros grupos funcionais contidos dentro da molécula.

O termo "substituído" como em, por exemplo, "alquila substituída", se refere a uma porção (por exemplo, um grupo alquila) substituída por um ou vários substituintes não interferentes, tais como, entre outros: C₃-C₈ cicloalquila, por exemplo, ciclopropila, ciclobutila e semelhantes; halo, por exemplo, fluoro, cloro, bromo e iodo; ciano; alcóxi, fenil inferior; fenil substituído, e semelhantes, para um ou mais átomos de hidrogênio. "Arila substituída" é arila que tem um ou vários grupos não interferentes como um substituinte. Para substituições em um anel fenil, os substituintes podem estar em qualquer orientação (isto é, orto, meta ou para). "Amônio substituído" é amônio que tem um ou vários grupos não interferentes (por exemplo, um radical orgânico) como um substituinte.

"Alcóxi" se refere a um grupo -O-R, onde R é alquila ou alquila substituída, preferivelmente alquila C₁-C₂₀ (por exemplo, metoxi, etoxi, propiloxi, benzol, etc.), mais preferivelmente alquila C₁-C₇.

Como usado neste, "alquenila" se refere a um grupo hidrocarboneto ramificado ou não ramificado de 2 a 15 átomos de comprimento, contendo pelo menos uma ligação dupla. Alquenila exemplar inclui (sem limitação) etenila, *n*-propenila, isopropenila, *n*-butenila, *iso*-butenila, octenila, decenila, tetradecenila e semelhantes.

O termo "alquinila" como usado neste se refere a um grupo hidrocarboneto ramificado ou não ramificado de 2 a 15 átomos de comprimento, contendo pelo menos uma ligação tripla. Alquinila exemplar inclui (sem limitação) etinila, *n*-butinila, *iso*-pentinila, octinila, decinila, e assim por diante.

"Arila" significa um ou vários anéis aromáticos, cada um de 5 ou 6 átomos de carbono no núcleo. Arila inclui anéis arila múltiplos que podem ser fundidos, como em naftil, ou não fundidos, como em bifenila. Anéis arila podem igualmente ser fundidos ou não fundidos com um ou vários anéis de hidrocarboneto cíclico, heteroarila ou anéis heterocíclicos. Como usado neste, "arila" inclui heteroarila. Uma porção contendo aromático (por exemplo, Ar¹, Ar², e assim por diante), significa uma estrutura que contém arila.

"Heteroarila" é um grupo arila que contém de um a quatro heteroátomos, preferivelmente N, O, ou S, ou uma combinação dos mesmos. Os anéis heteroarila podem igualmente ser fundidos com um ou vários anéis de hidrocarboneto cíclico, heterocíclico, arila ou heteroarila.

"Heterociclo" ou "heterocíclico" significa um ou vários anéis de 5-12 átomos, preferivelmente 5-7 átomos, com ou sem insaturação ou caráter aromático e tendo pelo menos um átomo do anel que não é um carbono. Heteroátomos preferidos incluem enxofre, oxigênio e nitrogênio.

"Heteroarila substituída" é heteroarila tendo um ou vários grupos não interferentes como substituintes.

"Heterociclo substituído" é um heterociclo que tem uma ou várias cadeias laterais formadas de substituintes não interferentes.

"Eletrófilo" se refere a um íon ou átomo ou coleção de átomos, que podem ser iônicos, tendo um centro eletrofílico, isto é, um centro que procura elétron capaz de reagir com um nucleófilo.

"Nucleófilo" se refere a um íon ou um átomo ou coleção de átomos que podem ser iônicos tendo um centro nucleofílico, isto é, um centro que procura um centro eletrofílico ou com um eletrófilo.

5 Uma ligação "fisiologicamente clivável" assim como uma "hidrolisável" é uma ligação relativamente fraca que reage com água (isto é, é hidrolisada) sob circunstâncias fisiológicas. A tendência de uma ligação hidrolisar em água dependerá não somente do tipo geral de ligação que conecta
10 dois átomos centrais, mas igualmente dos substituintes unidos a estes átomos centrais. Ligações hidrolisáveis exemplares incluem, entre outras, éster carboxilato, éster fostato, anidrido, acetal, cetol, éter aciloxialquila, imina e ésteres orto.

15 Uma "ligação liberável" inclui, mas não é limitada a, uma ligação clivável fisiologicamente, uma ligação hidrolisável e uma ligação enzimaticamente degradável. Assim, uma "ligação liberável" é uma ligação que pode sofrer ou hidrólise ou clivagem por algum outro mecanismo
20 (por exemplo, enzima-catalisado, ácido-catalisado, base-catalisado, e assim por diante) sob circunstâncias fisiológicas. Por exemplo, uma "ligação liberável" pode envolver uma reação de eliminação que tenha uma abstração base de um próton, (por exemplo, um átomo de hidrogênio
25 ionizável, $H\alpha$), como a força motriz. Para as finalidades deste, uma "ligação liberável" é sinônima de uma "ligação degradável".

Uma "ligação liberável enzimaticamente" significa uma ligação que está sujeita à degradação por uma ou várias
30 enzimas.

Uma ligação ou união "hidroliticamente estável" se refere a uma ligação química, tipicamente uma ligação covalente, que é substancialmente estável em água, o que quer dizer, não sofre hidrólise sob circunstâncias fisiológicas em nenhum grau apreciável durante um período prolongado de tempo. Exemplos de ligações hidroliticamente estáveis incluem, entre outros, os seguintes: ligações carbono-carbono (por exemplo, em cadeias alifáticas), éteres, amidas e semelhantes. Geralmente, uma ligação hidroliticamente estável é uma que exibe uma taxa de hidrólise de menos do que aproximadamente 1-2% por dia sob circunstâncias fisiológicas. As taxas de hidrólise de ligações químicas representativas podem ser encontradas na maioria dos livros texto padrão de química. Deve-se salientar que algumas ligações podem ser hidroliticamente estáveis ou hidrolisáveis dependendo (por exemplo) dos átomos adjacentes e circunvizinhos e das circunstâncias ambientais. Aqueles versados na técnica podem determinar se uma dada ligação ou união é hidroliticamente estável ou hidrolisável em um contexto dado, por exemplo, colocando uma molécula contendo a ligação de interesse sob circunstâncias de interesse e testando para a evidência de hidrólise (por exemplo, a presença e a quantidade de duas moléculas resultantes da clivagem de uma única molécula). Outras abordagens conhecidas daqueles versados na técnica para determinar se uma ligação ou união dada é hidroliticamente estável ou hidrolisável podem igualmente ser usados.

Os termos "agente ativo", "agente biologicamente ativo" e "agente farmacologicamente ativo" são usados

permutavelmente neste e são definidos para incluir qualquer agente, droga, composto, composição de matéria ou mistura que forneça algum efeito farmacológico, frequentemente benéfico, que pode ser demonstrado *in vivo* ou *in vitro*.

5 Isto inclui suplementos alimentares, nutrientes, nutricêuticos, drogas, proteínas, vacinas, anticorpos, vitaminas e outros agentes benéficos. Como usados neste, estes termos incluem ainda qualquer substância fisiologicamente ou farmacologicamente ativa que produz um
10 efeito localizado ou sistêmico em um paciente.

“Excipiente farmacêuticamente aceitável” ou “portador farmacêuticamente aceitável” se refere a um excipiente que pode ser incluído nas composições da invenção e que não cause nenhum efeito toxicológico adverso significativo ao
15 paciente.

“Quantidade farmacologicamente eficaz”, “quantidade fisiologicamente eficaz” e “quantidade terapeuticamente eficaz” são usadas permutavelmente neste para significar a quantidade de um conjugado polímero-agente ativo -
20 tipicamente presente em uma preparação farmacêutica - que é necessária para fornecer um nível desejado de agente ativo e/ou conjugado na circulação sanguínea ou em um tecido alvo. A quantidade exata dependerá de fatores numerosos, por exemplo, o agente ativo particular, os componentes e as
25 características físicas da preparação farmacêutica, população de paciente pretendida, considerações de paciente e semelhantes, e pode prontamente ser determinada por alguém de habilidade ordinária na arte, baseado na informação fornecida neste e disponível na literatura
30 relevante.

“Multifuncional” no contexto de um polímero significa um polímero que tem 3 ou mais grupos funcionais contidos no mesmo, onde os grupos funcionais podem ser os mesmos ou diferentes. Polímeros multifuncionais conterão tipicamente 5 de aproximadamente 3 a 100 grupos funcionais, ou de 3 a 50 grupos funcionais, ou de 3 a 25 grupos funcionais, ou de 3 a 15 grupos funcionais, ou de 3 a 10 os grupos funcionais, ou conterão 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 grupos funcionais dentro do polímero. Um polímero “difuncional” significa um 10 polímero que tem dois grupos funcionais contidos no mesmo, ou o mesmo (isto é, homodifuncional) ou diferente (isto é, heterodifuncional).

“Ramificado” com referência à geometria ou estrutura total de um polímero, se refere a polímero que tem 2 ou 15 mais “braços” de polímero. Um polímero ramificado pode possuir 2 braços de polímero, 3 braços de polímero, 4 braços de polímero, 6 braços de polímero, 8 braços de polímero ou mais. Um tipo particular de polímero altamente ramificado é um polímero dendrítico ou dendrímero que, para 20 as finalidades da invenção, é considerado possuir uma estrutura distinta daquela de um polímero ramificado.

Um polímero “dendrímero” ou dendrítico é um polímero monodisperso de tamanho globular em que todas as ligações emergem radialmente de um ponto de foco central ou núcleo 25 com um padrão de ramificação regular e com unidades de repetição que contribuem, cada uma, para um ponto de ramificação. Dendrímeros exibem certas propriedades de estado dendrítico tais como encapsulamento do núcleo, tornando-os únicos em relação a outros tipos de polímeros.

30 Um reagente básico ou ácido descrito neste inclui

formas de sal neutras, carregadas e qualquer correspondente das mesmas.

O termo "paciente" se refere a um organismo vivo que sofre de ou é inclinado a uma circunstância que possa ser
5 impedida ou tratada pela administração de um conjugado da maneira prevista neste, e inclui tanto seres humanos como animais.

Como usado neste, "taxa de liberação de droga" significa uma taxa (declarada como uma meia vida) em que
10 metade da quantidade total de conjugados polímero-agente ativo em um sistema clivará no agente ativo e em um resíduo polimérico.

"Opcional" e "opcionalmente" significam que a circunstância subseqüentemente descrita pode ou não pode
15 ocorrer, de modo que a descrição inclui exemplos onde a circunstância ocorre e exemplos onde ela não ocorre.

Como usado neste, o designador "halo" (por exemplo, fluoro, cloro, iodo, bromo, e assim por diante) é usado geralmente quando o halogênio é unido a uma molécula,
20 embora o sufixo "eto" (por exemplo, fluoreto, cloreto, iodeto, brometo e assim por diante) sejam usados quando o halogênio existe na sua forma iônica independente (por exemplo, como quando um grupo de partida deixa uma molécula).

O termo "porção de Fator IX" como usado neste se refere a uma porção que tem atividade de Fator IX. A porção de Fator IX igualmente terá pelo menos grupo amina adequado para reação com um reagente polimérico. Tipicamente, embora não necessariamente, a porção de Fator IX é uma proteína.
30 Além disso, o termo "porção de Fator IX" abrange tanto a

porção de Fator IX antes da conjugação assim como o resíduo da porção de Fator IX depois da conjugação. Como será explicado em mais detalhes abaixo, aqueles versados na técnica podem determinar se uma qualquer dada porção tem
5 atividade de Fator IX. Como usado neste o termo "porção de Fator IX" inclui proteínas modificadas deliberadamente como, por exemplo, por mutagênese dirigida ao local ou acidentalmente por meio de mutações. O termo "porção de Fator IX" igualmente inclui os derivados que têm de 1 a 6
10 locais adicionais de glicosilação, os derivados que têm pelo menos um aminoácido adicional na extremidade do terminal carbóxi da proteína onde o(s) aminoácido(s) adicional(is) inclui(em) pelo menos um local de glicosilação e os derivados que têm uma seqüência de
15 aminoácido que inclui pelo menos um local de glicosilação.

No contexto da discussão atual, deve-se reconhecer que a definição de uma variável fornecida no que diz respeito a uma estrutura ou fórmula é aplicável à mesma variável repetida em uma estrutura diferente, a menos que o contexto
20 determine de outra maneira.

Como indicado previamente, a invenção atual compreende (entre outras coisas) conjugados que têm uma ligação liberável.

Antes de descrever conjugados exemplares da invenção, serão discutidas configurações de um polímero solúvel em
25 água e um grupo funcional capaz de reagir com um grupo amino de um agente ativo para formar uma ligação liberável, tal como uma ligação carbamato.

No que diz respeito a um dado polímero solúvel em
30 água, cada polímero solúvel em água (por exemplo, POLI,

POLY¹ e POLY²) pode compreender qualquer polímero contanto que o polímero seja solúvel em água e não-peptídico. Embora seja preferível um poli(etileno glicol), um polímero solúvel em água para o uso no presente podem ser, por exemplo, outros polímeros solúveis em água tais como outros poli(alquilenos glicóis) [igualmente denominados "poli(alquilenóxidos)"], tais como poli(propileno glicol) ("PPG"), copolímeros de etileno glicol e propileno glicol e semelhantes, poli(álcool olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmacetamida), poli(hidroxiálquilmacetato), poli(sacarídeos), poli(ácido α -hidroxi), poli(álcool de vinila), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acrilóilmorfolino), tal como descrito na patente dos EUA 5.629.384. O polímero solúvel em água pode ser um homopolímero, copolímero, terpolímero, polímero de bloco não aleatório e polímero de bloco aleatório de qualquer um dos antecedentes. Além disso, um polímero solúvel em água pode ser linear, mas pode igualmente ser de outras formas (por exemplo, ramificado, bifurcado e semelhantes) como será descrito em detalhes adicionais abaixo. No contexto de estar presente dentro de uma estrutura total, um polímero solúvel em água tem de 1 a aproximadamente 300 termos.

Nos exemplos onde o reagente polimérico compreende dois ou mais polímeros solúveis em água, cada polímero solúvel em água na estrutura total pode ser o mesmo ou diferente. Prefere-se, entretanto, que todos os polímeros solúveis em água na estrutura total sejam do mesmo tipo. Por exemplo, prefere-se que todos os polímeros solúveis em água dentro de uma estrutura dada sejam polímeros

poli(etileno glicol).

Embora o peso molecular ponderal médio de qualquer polímero solúvel em água individual possa variar, o peso molecular ponderal médio de qualquer dado polímero solúvel em água estará tipicamente na seguinte escala: 100 Dáltons a aproximadamente 150.000 Dáltons. Escalas exemplares, entretanto, incluem pesos moleculares ponderais médios nas seguintes escalas: na escala de aproximadamente 880 Dáltons a aproximadamente 5.000 Dáltons; na escala maior de 5.000 Dáltons a aproximadamente 100.000 Dáltons; na escala de aproximadamente 6.000 Dáltons a aproximadamente 90.000 Dáltons; na escala de aproximadamente 10.000 Dáltons a aproximadamente 85.000 Dáltons; na escala de mais de 10.000 Dáltons a aproximadamente 85.000 Dáltons; na escala de aproximadamente 20.000 Dáltons a aproximadamente 85.000 Dáltons; na escala de aproximadamente 53.000 Dáltons a aproximadamente 85.000 Dáltons; na escala de aproximadamente 25.000 Dáltons a aproximadamente 120.000 Dáltons; na escala de aproximadamente 29.000 Dáltons a aproximadamente 120.000 Dáltons; na escala de aproximadamente 35.000 Dáltons a aproximadamente 120.000 Dáltons; na escala de aproximadamente 880 Dáltons a aproximadamente 60.000 Dáltons; na escala de aproximadamente 440 Dáltons a aproximadamente 40.000 Dáltons; na escala de aproximadamente 440 Dáltons a aproximadamente 30.000 Dáltons; e na escala de aproximadamente 40.000 Dáltons a aproximadamente 120.000 Dáltons. Para qualquer dado polímero solúvel em água, PEGs que têm um peso molecular em uma ou várias destas escalas são preferidos.

Pesos moleculares ponderais médios exemplares para o polímero solúvel em água incluem aproximadamente 100 Dáltons, aproximadamente 200 Dáltons, aproximadamente 300 Dáltons, aproximadamente 400 Dáltons, aproximadamente 440 Dáltons, aproximadamente 500 Dáltons, aproximadamente 600 Dáltons, aproximadamente 700 Dáltons, aproximadamente 750 Dáltons, aproximadamente 800 Dáltons, aproximadamente 900 Dáltons, aproximadamente 1.000 Dáltons, aproximadamente 1.500 Dáltons, aproximadamente 2.000 Dáltons, aproximadamente 2.200 Dáltons, aproximadamente 2.500 Dáltons, aproximadamente 3.000 Dáltons, aproximadamente 4.000 Dáltons, aproximadamente 4.400 Dáltons, aproximadamente 4.500 Dáltons, aproximadamente 5.000 Dáltons, aproximadamente 5.500 Dáltons, aproximadamente 6.000 Dáltons, aproximadamente 7.000 Dáltons, aproximadamente 7.500 Dáltons, aproximadamente 8.000 Dáltons, aproximadamente 9.000 Dáltons, aproximadamente 10.000 Dáltons, aproximadamente 11.000 Dáltons, aproximadamente 12.000 Dáltons, aproximadamente 13.000 Dáltons, aproximadamente 14.000 Dáltons, aproximadamente 15.000 Dáltons, aproximadamente 16.000 Dáltons, aproximadamente 17.000 Dáltons, aproximadamente 18.000 Dáltons, aproximadamente 19.000 Dáltons, aproximadamente 20.000 Dáltons, aproximadamente 22.500 Dáltons, aproximadamente 25.000 Dáltons, aproximadamente 30.000 Dáltons, aproximadamente 35.000 Dáltons, aproximadamente 40.000 Dáltons, aproximadamente 45.000 Dáltons, aproximadamente 50.000 Dáltons, aproximadamente 55.000 Dáltons, aproximadamente 60.000 Dáltons, aproximadamente 65.000 Dáltons, aproximadamente 70.000 Dáltons, e

aproximadamente 75.000 Dáltons. As versões ramificadas do polímero solúvel em água (por exemplo, um polímero solúvel em água ramificado de 40.000 Dáltons compreendido de dois polímeros de 20.000 Dáltons) tendo um peso molecular total ponderal de qualquer um dos antecedentes podem igualmente ser usadas.

O reagente polimérico usado para preparar o conjugado compreenderá pelo menos um polímero solúvel em água que tem um tamanho total na escala adequada para a taxa desejada de liberação do conjugado formado do mesmo. Por exemplo, um conjugado que tem uma taxa de liberação relativamente longa pode ser preparado a partir de um reagente polimérico que tem um tamanho adequado para (a) circulação prolongada antes da liberação do agente ativo do conjugado, e (b) depuração moderadamente rápida *in vivo* da espécie liberada do conjugado mediante liberação do conjugado. Do mesmo modo, quando o conjugado tem uma taxa de liberação relativamente rápida, então, o reagente polimérico teria tipicamente um peso molecular mais baixo.

Quando um PEG for usado como o(s) polímero(s) solúvel(is) em água no reagente polimérico, o PEG compreende tipicamente um número de monômeros (OCH₂CH₂) [ou monômeros (CH₂CH₂O), dependendo de como o PEG é definido]. Como usado durante toda a descrição, o número de unidades de repetição é identificado pelo subscrito "n" em "(OCH₂CH₂)_n". Assim, o valor de (n) cai tipicamente dentro de uma ou várias das seguintes escalas: de 2 a aproximadamente 3400, de aproximadamente 4 a aproximadamente 1500, de aproximadamente 100 a aproximadamente 2300, de aproximadamente 100 a

aproximadamente 2270, de aproximadamente 136 a
aproximadamente 2050, de aproximadamente 225 a
aproximadamente 1930, de aproximadamente 450 a
aproximadamente 1930, de aproximadamente 1200 a
5 aproximadamente 1930, de aproximadamente 568 a
aproximadamente 2727, de aproximadamente 660 a
aproximadamente 2730, de aproximadamente 795 a
aproximadamente 2730, de aproximadamente 795 a
aproximadamente 2730, de aproximadamente 909 a
10 aproximadamente 2730, e de aproximadamente 1.200 a
aproximadamente 1.900. Para qualquer dado polímero em que o
peso molecular seja conhecido, é possível determinar o
número de unidades de repetição (isto é, " n") dividindo o
peso molecular ponderal médio total do polímero pelo peso
15 molecular do monômero de repetição.

Cada polímero solúvel em água é tipicamente
biocompatível e não-imunogênico. No que diz respeito à
biocompatibilidade, uma substância é considerada
biocompatível se os efeitos benéficos associados com o uso
20 da substância sozinha ou com outra substância (por exemplo,
um agente ativo) em relação aos tecidos vivos (por exemplo,
administração a um paciente) compensam todos os efeitos
deletérios como avaliados por um clínico, por exemplo, um
médico. No que diz respeito à não-imunogenicidade, uma
25 substância é considerada não-imunogênica se o uso da
substância sozinha ou com outra substância em relação aos
tecidos vivos não produz uma resposta imune (por exemplo, a
formação de anticorpos) ou, se uma resposta imune é
produzida, que tal resposta não é julgada clinicamente
30 significativa ou importante como avaliada por um clínico. É

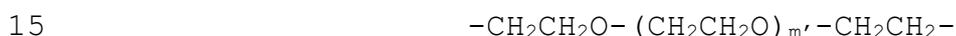
particularmente preferido que os polímeros solúveis em água descritos neste assim como conjugados de agentes ativos e dos polímeros sejam biocompatíveis e não-imunogênicos.

Em uma forma útil, PEG livre ou não ligado é um polímero linear terminado em cada extremidade com grupos hidroxila:



onde (m') varia tipicamente de zero a aproximadamente 4.000, preferivelmente de aproximadamente 20 a aproximadamente 1.000.

O polímero acima, alfa, omega-dihidroxi poli(etileno glicol) pode ser representado em breve forma como HO-PEG-OH onde se compreende que o símbolo -PEG- pode representar a seguinte unidade estrutural:



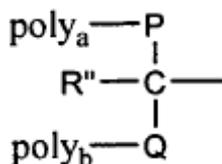
onde (m') é como definido acima.

Outro tipo de PEG livre ou não ligado útil na invenção atual é metóxi-PEG-OH, ou mPEG resumidamente, em que um término é o grupo metóxi relativamente inerte, enquanto o outro término é um grupo hidroxila. A estrutura de mPEG é dada abaixo.



onde (m') é como descrito acima.

Moléculas de braços múltiplos ou ramificadas de PEG, tais como aquelas descritas na patente dos EUA 5.932.462 podem igualmente ser usadas como o polímero PEG. Por exemplo, o PEG pode ter a estrutura:



30

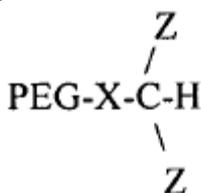
onde:

poly_a e poly_b são espinhas dorsais de PEG (ou o mesmo ou diferente), tal como metóxi poli(etileno glicol);

R'' é uma porção não reativa, tal como H, metila ou
5 uma espinha dorsal de PEG; e

P e Q são ligações não reativas. Em uma configuração preferida, o polímero ramificado de PEG é metóxi poli(etileno glicol) di-substituído lisina.

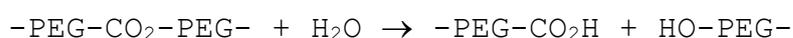
Além disso, o PEG pode compreender um PEG bifurcado.
10 Um exemplo de um PEG bifurcado livre ou não ligado é representado pela seguinte fórmula:



15 onde X são uma porção espaçadora e cada Z é um grupo terminal ativado ligado ao CH por uma cadeia de átomos de comprimento definido. A cadeia de átomos que ligam os grupos funcionais Z ao átomo de carbono de ramificação serve como um grupo de amarração e pode compreender, por
20 exemplo, cadeias alquila, cadeias éter, cadeias éster, cadeias amida e combinações das mesmas. A patente dos EUA 6.362.254 revela várias estruturas bifurcadas de PEG capazes de uso na invenção atual.

O polímero PEG pode compreender uma molécula de PEG
25 pendente que tem grupos reativos, tais como carboxila, unidos covalentemente ao longo do comprimento do PEG ao invés de na extremidade da cadeia de PEG. Os grupos reativos pendentes podem ser unidos ao PEG diretamente ou por meio de uma porção espaçadora, tal como um grupo
30 alquilenos.

Além das formas descritas acima de PEG, cada polímero solúvel em água no reagente polimérico pode igualmente ser preparado com uma ou várias ligações fracas ou liberáveis no polímero, incluindo qualquer um dos polímeros acima descritos. Por exemplo, o PEG pode ser preparado com ligações éster no polímero que são sujeitas a hidrólise. Como mostrado abaixo, esta hidrólise conduz a clivagem do polímero em fragmentos de mais baixo peso molecular:



Outras ligações hidroliticamente degradáveis úteis como uma ligação degradável dentro de uma espinha dorsal de polímero, incluem ligações carbonato; ligações imina resultando, por exemplo, da reação de uma amina e um aldeído (veja, por exemplo, Ouchi *et al.* (1997) *Polymer Preprints* 38(1): 582-3); ligações éster de fosfato formadas, por exemplo, reagindo um álcool com um grupo fosfato; ligações hidrazona que são formadas tipicamente pela reação de uma hidrazida e um aldeído; ligações acetal que são formadas tipicamente pela reação entre um aldeído e um álcool; ligações orto éster que, por exemplo, são formadas pela reação entre um formato e um álcool; ligações amida formadas por um grupo amina, por exemplo, em uma extremidade de um polímero tal como PEG, e um grupo carboxila de outra cadeia de PEG; ligações uretano formadas da reação de, por exemplo, um PEG com um grupo terminal isocianato e um álcool de PEG; ligações de peptídeo formadas por um grupo amina, por exemplo, em uma extremidade de um polímero tal como PEG, e um grupo carboxila de um peptídeo; e ligações de oligonucleotídeo formadas, por exemplo, por um grupo fosforamídita, por

exemplo, no fim de um polímero e um grupo 5' hidroxila de um oligonucleotídeo.

É compreendido por aqueles versados na técnica que o termo poli(etileno glicol) ou PEG representa ou inclui
5 todas as formas acima de PEG.

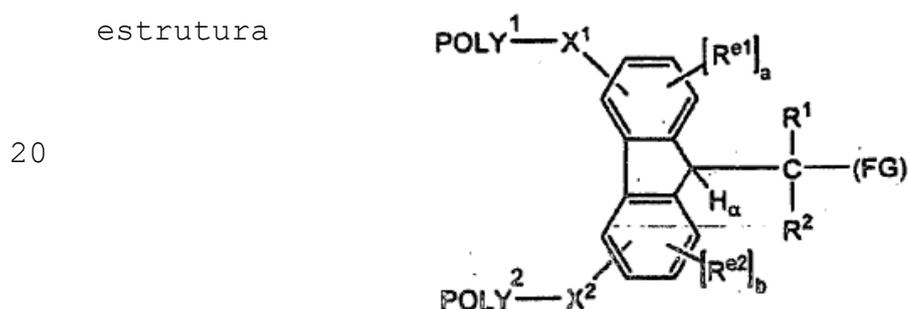
Aqueles versados na técnica reconhecerão que a discussão antecedente a respeito de polímeros substancialmente solúveis em água é de nenhuma maneira exaustiva e é meramente ilustrativa, e que todos os
10 materiais poliméricos que têm as qualidades descritas acima estão contemplados. Como usado neste, o termo "polímero solúvel em água" se refere tanto a uma molécula assim como ao resíduo do polímero solúvel em água que foi unido a outra porção. A seguinte descrição de um polímero solúvel
15 em água é aplicável não somente ao reagente polimérico, mas aos correspondentes conjugados formados usando os reagentes poliméricos descritos.

O grupo funcional dos reagentes poliméricos usados para formar os conjugados descritos neste é um grupo
20 funcional capaz de reagir com um grupo amino de um agente ativo para formar uma ligação liberável, tal como uma ligação carbamato. A invenção não é limitada no que diz respeito ao grupo funcional específico contanto que o grupo funcional seja capaz de reagir com um grupo amino de um
25 agente ativo para formar uma ligação liberável, tal como uma ligação carbamato. Grupos funcionais exemplares capazes de reagir com um grupo amino de um agente ativo incluem aqueles grupos funcionais selecionados do grupo que consiste em carbonatos ativos tais como N-succinimidil, 1-
30 benzotriazolil, imidazola, haletos de carbonato (tais como

cloreto de carbonato e brometo de carbonato), fenolatos (tais como, *p*-nitrofenolato) e assim por diante. Também, como um exemplo especial, se o agente ativo está disponível com o grupo ativo amina convertido em um grupo do isocianato ou isotiocianato, então, o grupo funcional do reagente polimérico pode ser hidroxila uma vez que a reação destes componentes fornece uma ligação carbamato liberável.

Os reagentes poliméricos exemplares serão discutidos agora em mais detalhes. Deve-se recordar que embora a estereoquímica não seja mostrada especificamente em nenhuma fórmula ou estrutura (seja para um reagente polimérico, conjugado, ou qualquer outra fórmula ou estrutura), as fórmulas e as estruturas fornecidas contemplam tanto enantiômeros assim como composições que compreendem misturas de cada enantiômero em quantidades iguais (isto é, uma mistura racêmica) e em quantidades desiguais.

Um reagente polimérico exemplar tem a seguinte estrutura



onde:

POLY¹ é um primeiro polímero solúvel em água;

25 POLY² é um segundo polímero solúvel em água;

X¹ é uma primeira porção espaçadora;

X² é uma segunda porção espaçadora;

H_α é um átomo de hidrogênio ionizável;

R¹ é H ou um radical orgânico;

30 R² é H ou um radical orgânico;

(a) é zero ou um;

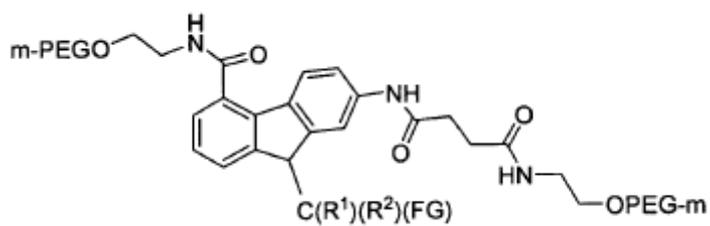
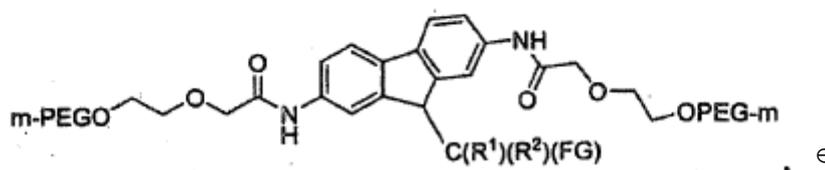
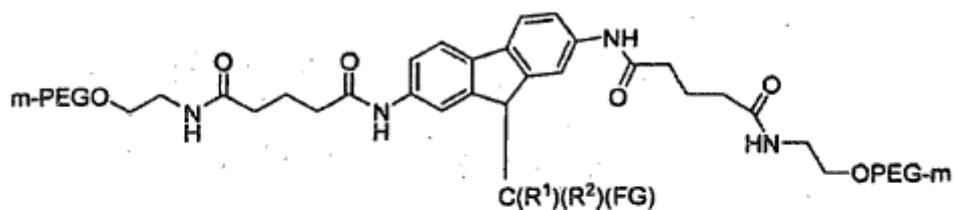
(b) é zero ou um;

R^{e1} , quando presente, é um primeiro grupo de alteração de elétron;

5 R^{e2} , quando presente, é um segundo grupo de alteração de elétron; e

(FG) é um grupo funcional capaz de reagir com um grupo amino de um agente ativo para formar uma ligação liberável, tal como uma ligação carbamato.

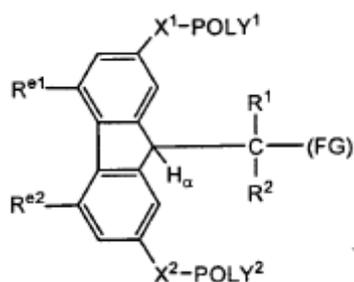
10 Os reagentes poliméricos exemplares recaem dentro das seguintes fórmulas:



onde, em cada exemplo: (FG) é um grupo funcional capaz de reagir com um grupo amino de um agente ativo para formar uma ligação liberável, tal como uma ligação carbamato; R^1 é H ou um radical orgânico; e R^2 é H ou um radical orgânico;

Ainda outros reagentes poliméricos exemplares têm a estrutura:

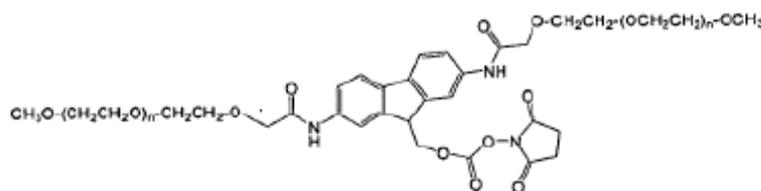
30



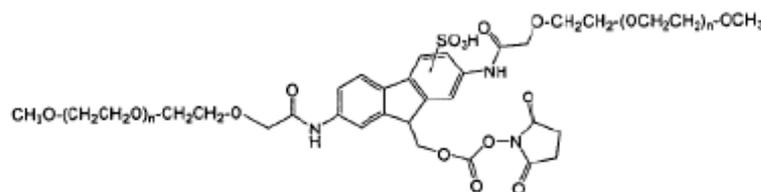
5

onde cada um de POLY¹, POLY², X¹, X², R¹, R², H_α e (FG) é como definido previamente, e R^{e1} é um primeiro grupo de alteração de elétron; e R^{e2} é um segundo grupo de alteração de elétron.

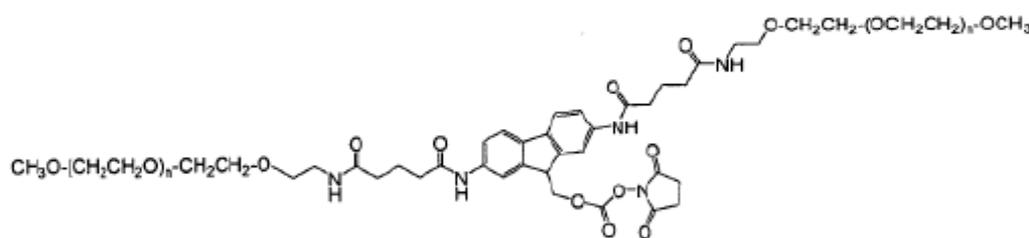
10 Ainda outros reagentes poliméricos exemplares caem dentro das seguintes estruturas



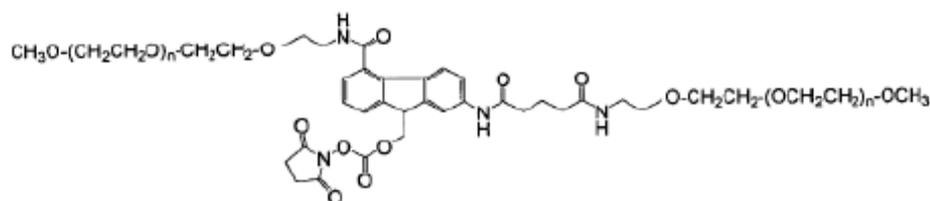
15



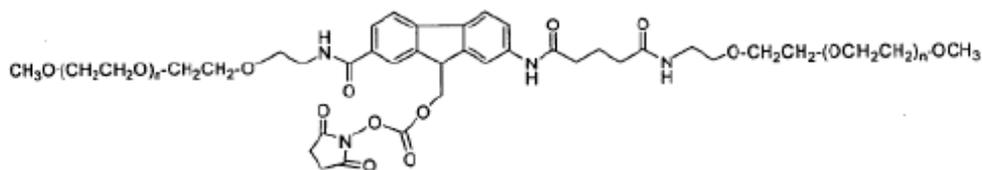
20

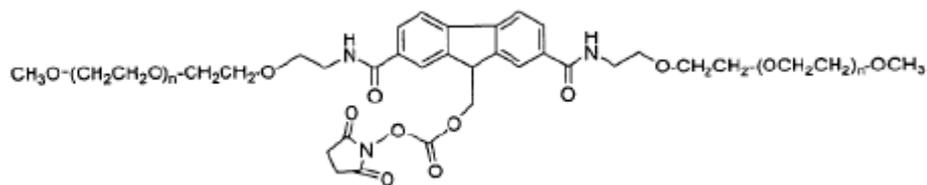


25



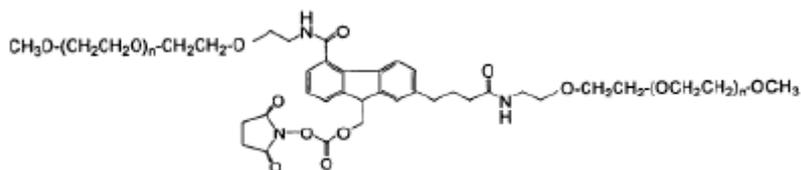
30





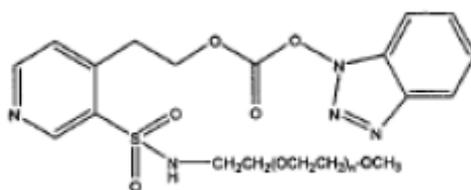
;

5



; e

10



;

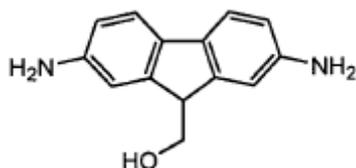
onde, para cada estrutura e em cada exemplo, (n) é independentemente um número inteiro de 4 a 1500.

Os reagentes poliméricos podem ser preparados em qualquer número de vezes. Conseqüentemente, as sínteses dos reagentes poliméricos não são limitadas à técnica ou à aproximação específica usada em sua preparação.

Em um método para preparar um reagente polimérico útil em preparar os conjugados descritos aqui, o método compreende: (a) fornecer uma porção contendo aromático que carrega um primeiro local de fixação, um segundo local de fixação e um terceiro local de fixação opcional; (b) reagir um reagente de grupo funcional com o primeiro local de fixação para conduzir ao primeiro local de fixação que carrega um grupo funcional capaz de reagir com um grupo amino de um agente ativo e resulta em uma ligação liberável, tal como um carbamato; e (c) reagir um polímero solúvel em água que carrega um grupo reativo com o segundo local de fixação e, quando presente, o terceiro local de fixação opcional para conduzir (i) o segundo local de fixação que carrega um polímero solúvel em água com uma

porção espaçadora e (ii) o terceiro local de fixação
opcional, quando presente, carregando um segundo polímero
solúvel em água com uma porção espaçadora. Em alguns casos,
(b) é executado antes da etapa (c) quando em outros
5 exemplos, (c) é executado antes da etapa (b).

Assim, neste método para preparar um reagente
polimérico, uma etapa exigida é (a) fornecer uma porção
contendo aromático que carrega um primeiro local de
fixação, um segundo local de fixação e um terceiro local de
10 fixação opcional. No contexto de uma preparação sintética,
compreende-se que "fornecendo" um material significa obter
o material (por exemplo, sintetizando-o ou obtendo-o
comercialmente). Uma porção contendo aromático exemplar,
para finalidades ilustrativas, é 9-hidroximetil-2,7-
15 diaminofluoreno, como mostrado abaixo.



Esta porção contendo aromática, 9-hidroximetil-2,7-
20 diaminofluoreno, é um exemplo de uma porção contendo
aromático que tem três locais de fixação: um grupo
hidroxila na posição 9 e grupos amino em cada uma das
posições 2 e 7. A porção contendo aromático pode ser
fornecida em uma forma de base ou sal. No que diz respeito
25 a 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno, é possível usar a
forma dihidrocloreto. Outras porções contendo aromática
podem ser fornecidas através da preparação e/ou aquisição
sintética de um fornecedor comercial.

Fornecendo a porção contendo aromática, outra etapa no
30 método inclui amplamente a etapa de reagir um polímero

solúvel em água que carrega um grupo reativo com os locais de fixação na porção contendo aromática. Aqui, qualquer aproximação conhecida na técnica para unir um polímero solúvel em água a um ou mais locais de fixação na porção
5 contendo aromático pode ser usada e o método não é limitado à aproximação específica. Por exemplo, um PEG reativo-amina (tal como um mPEG com terminação éster de N-succinimidila, por exemplo, da reação de N-hidroxissuccinimida e $\text{CH}_3\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)-\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{OCH}_2\text{COOH}$ com diciclohexil
10 carbodiimida (DCC) ou diisopropil carbodiimida (DIC) como um agente de condensação e opcionalmente na presença de uma base) pode ser reagido com uma porção contendo aromático carregando amina tal como 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno.

15 Em alguns casos, a reação do polímero solúvel em água que carrega um grupo reativo com a porção contendo aromático conduzirá a todos os locais de fixação possíveis que têm o polímero solúvel em água unido ao mesmo. Em tais circunstâncias é necessário remover pelo menos um polímero
20 solúvel em água de modo que um local de fixação seja disponível para a reação com um reagente de grupo funcional. Assim, por exemplo, a reação de mPEG com terminação éster de N-succinimidila discutida no parágrafo precedente com os resultados de 9-hidroximetil-2,7-
25 diaminofluoreno em uma mistura que compreende (a) uma espécie que carrega dois polímeros solúveis em água, um em cada um dos dois locais amina, e (b) uma espécie que carrega três polímeros solúveis em água, um em cada um dos dois locais amina, e um no local hidroxila. Aqui, é
30 possível remover e coletar espécies mais elevadas de peso

molecular usando cromatografia de exclusão de tamanho. Além disso, é possível tratar a mistura a pH elevado [que trata, por exemplo, a mistura ao hidróxido de lítio (LiOH), hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH)],
5 seguido pela cromatografia de troca iônica (IEC). Em um ou outro caso, o resultado é uma composição que contém na maior parte 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno que carrega dois polímeros solúveis em água, um em cada um dos dois locais amina. Um terceiro local hidroxila está desse modo
10 disponível para a reação com um reagente do grupo funcional.

A etapa final é reagir um local reativo da porção contendo aromático com um reagente de grupo funcional. Uma aproximação preferida é para reagir 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno contendo hidroxila que carrega dois
15 polímeros solúveis em água, um em cada um dos dois locais amina com trifosgênio seguido pelo tratamento com N-hidroxissuccinimida. Desta maneira, um grupo funcional capaz de reagir com um grupo amino de um agente ativo para
20 formar uma ligação liberável, tal como uma ligação carbamato (neste caso, um "carbonato ativado") é formado no local reativo contendo hidroxila.

Nenhuma matéria a qual a abordagem é usada, as etapas do método sintético ocorrem em um solvente apropriado.
25 Aqueles versados na técnica podem determinar se qualquer solvente específico é apropriado para qualquer reação dada. Tipicamente, entretanto, o solvente é preferivelmente um solvente não polar ou um solvente aprótico polar. Os exemplos não limitantes de solventes não polares incluem
30 benzeno, xileno, dioxano, tetrahidrofurano (THF), álcool t-

butílico e tolueno. Solventes não polares particularmente preferidos incluem tolueno, xileno, dioxano, tetrahidrofurano, e álcool t-butílico. Os solventes apróticos polares exemplares incluem, entre outros, DMSO
5 (sulfóxido de dimetila), HMPA (hexametilfosforamida), DMF (dimetilformamida), DMA (dimetilacetamida), NMP (N-metilpirrolidinona).

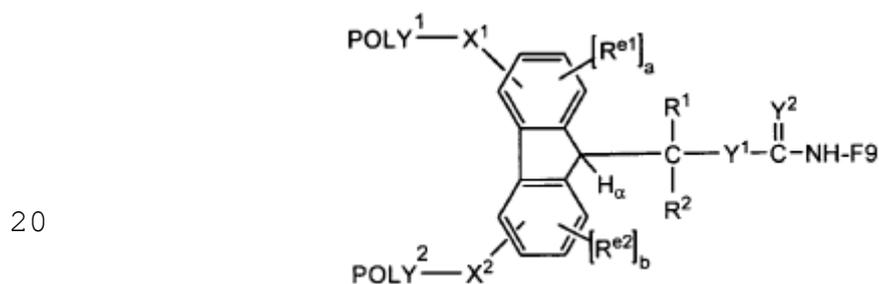
Uma vez preparados, os reagentes poliméricos podem ser isolados. Os métodos conhecidos podem ser usados para
10 isolar o reagente polimérico, mas o mesmo é particularmente preferido para usar cromatografia, por exemplo, cromatografia de exclusão de tamanho. Alternadamente ou além, o método inclui a etapa de purificar o reagente polimérico uma vez que o mesmo é formado. Além disso, os
15 métodos de purificação conhecidos na técnica podem ser usados para purificar o reagente polimérico.

Os reagentes poliméricos são sensíveis à umidade e ao oxigênio e são armazenados idealmente sob uma atmosfera inerte, tal como sob argônio ou sob nitrogênio, e em baixa
20 temperatura. Desta maneira, os processos potencialmente degradativos associados com, por exemplo, oxigênio atmosférico são reduzidos ou evitados inteiramente. Em alguns casos, para evitar a degradação oxidativa, os antioxidantes, tais como hidroxil tolueno butilado (BHT),
25 podem ser adicionados ao reagente polimérico antes do armazenamento. Além disso, prefere-se minimizar a quantidade de umidade associada com as condições de armazenamento para reduzir reações prejudiciais potencialmente associadas com água, por exemplo, hidrólise
30 do éster ativo. Além disso, prefere-se manter a obscuridade

das condições de armazenamento a fim de impedir determinados processos degradativos que envolvem a luz. Assim, as condições de armazenamento preferidas incluem um ou mais dos seguintes: armazenamento sob o argônio seco ou
 5 outro gás inerte seco; armazenamento em temperaturas abaixo de aproximadamente -15°C ; armazenamento na ausência de luz; e armazenamento com uma quantidade apropriada (por exemplo, aproximadamente 50 a aproximadamente 500 partes por milhão) de um antioxidante tal como BHT.

10 Os reagentes poliméricos descritos acima são úteis para a conjugação aos agentes biologicamente ativos. Por exemplo, um grupo amino (por exemplo, amina primária) em um agente ativo reagirá com o grupo funcional capaz de reagir com um grupo amino de um agente ativo para formar uma
 15 liberação, tal como uma ligação carbamato.

Os conjugados exemplares têm a seguinte estrutura:



onde:

POLY¹ é um primeiro polímero solúvel em água;

POLY² é um segundo polímero solúvel em água;

25 X¹ é uma primeira porção espaçadora;

X² é uma segunda porção espaçadora;

H_α é um átomo de hidrogênio ionizável;

R¹ é H ou um radical orgânico;

R² é H ou um radical orgânico;

30 (a) é zero ou um;

(b) é zero ou um;

R^{e1} , quando presente, é um primeiro grupo de alteração de elétron;

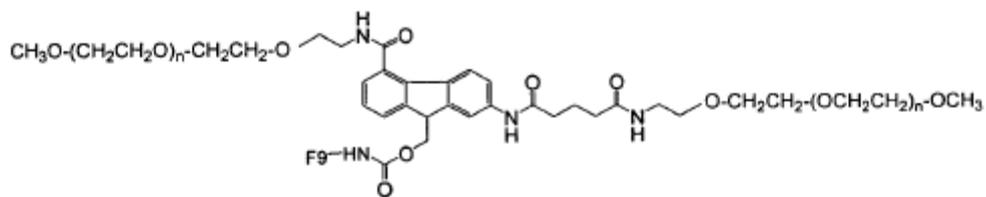
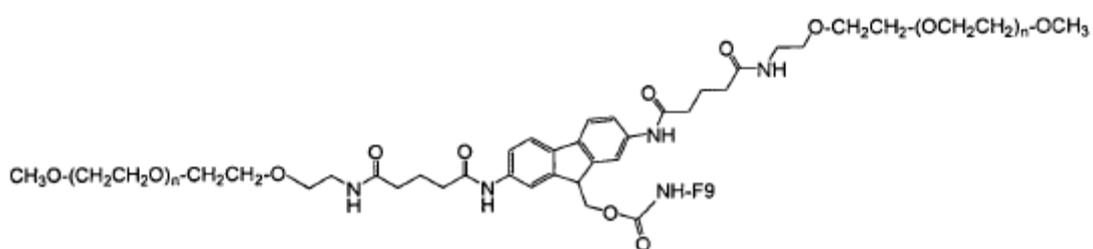
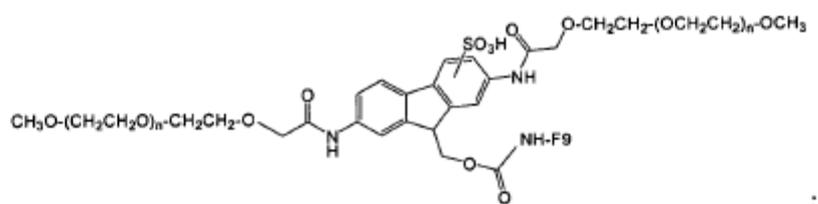
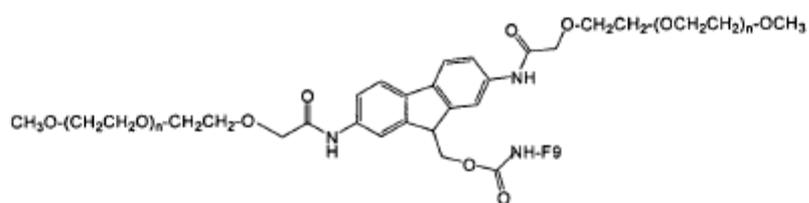
R^{e2} , quando presente, é um segundo grupo de alteração de elétron;

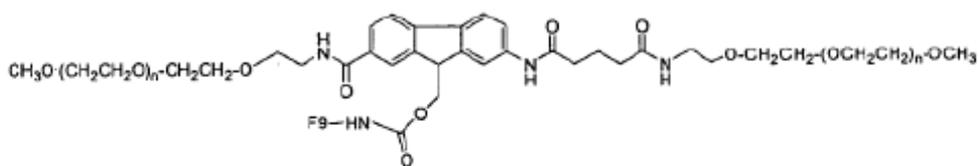
Y^1 é O ou S;

Y^2 é O ou S; e

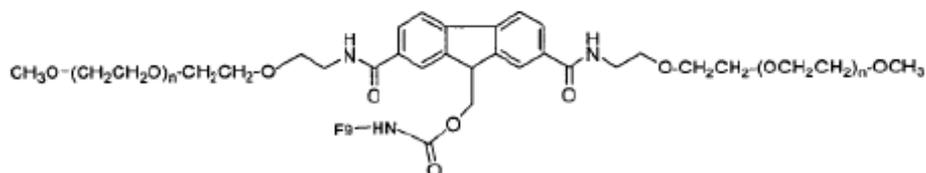
(F9) é um resíduo de uma porção de fator IX contendo amina

Os conjugados exemplares incluem aqueles das seguintes fórmulas:

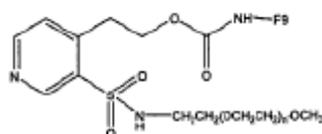
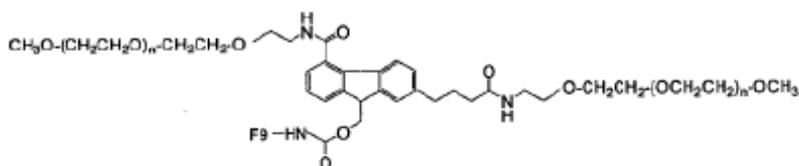




5



10



15 onde, para cada estrutura e em cada exemplo, (n) é independentemente um número inteiro de 4 a 1500, e F9 é um resíduo de uma porção de fator IX contendo amina.

O agente biologicamente ativo a que um reagente polimérico como descrito aqui pode ser conjugado, é um agente biologicamente ativo contendo amina. Tipicamente, o agente biologicamente ativo será uma macromolécula, tal como um polipeptídeo, tendo um peso molecular maior do que aproximadamente 3.500 Daltons. Os polipeptídeos farmacologicamente ativos representam um tipo preferido de agente biologicamente ativo. Deve-se compreender que para finalidades da presente discussão, o termo "polipeptídeo" será genérico para oligopeptídeos e proteínas. No que diz respeito aos polipeptídeos, a amina a qual o reagente polimérico se acopla pode ser uma cadeia lateral contendo amina ou N-término de um aminoácido (tal como, lisina)

dentro do polipeptídeo.

A invenção igualmente prevê um método de preparar um conjugado que compreende a etapa de contatar um reagente polimérico com um agente biologicamente ativo sob condições
5 apropriadas para formar uma ligação covalente entre o polímero e o agente biologicamente ativo. Tipicamente, o polímero é adicionado ao agente ativo ou à superfície em uma quantidade equimolar (no que diz respeito ao número desejado de grupos apropriados para a reação com o grupo
10 reativo) ou em um excesso molar. Por exemplo, o reagente polimérico pode ser adicionado ao agente ativo alvo em uma relação molar de aproximadamente 1: 1 (reagente polimérico: agente ativo), 1.5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1, ou 10:1. A reação de conjugação é permitida para proceder até que
15 substancialmente nenhuma conjugação mais adicional ocorra, que pode geralmente ser determinada monitorando o progresso da reação sobre o tempo. O progresso da reação pode ser monitorado retirando alíquotas da mistura de reação em vários pontos de tempo e analisando a mistura de reação
20 pela espectrometria de massa SDS-PAGE ou MALDI-TOF ou qualquer outro método analítico apropriado. Uma vez que um platô é alcançado no que diz respeito à quantidade de conjugado formada ou a quantidade de polímero não conjugado remanescente, a reação é assumida estar completa.
25 Tipicamente, a reação de conjugação toma em qualquer lugar dos minutos a diversas horas (por exemplo, 5 minutos a 24 horas ou mais). A mistura de produto resultante é preferivelmente, mas não necessariamente, purificada para separar reagentes em excesso, espécies multiconjugadas não
30 desejadas de reagentes não conjugados (por exemplo, agente

ativo), e o polímero livre ou sem reação. Os conjugados resultantes podem então ser mais caracterizados usando métodos analíticos tais como, MALDI, eletroforese capilar, eletroforese em gel, e/ou cromatografia.

5 No que diz respeito aos conjugados de agente ativo-polímero, os conjugados podem ser purificados para obter/isolar espécies conjugadas diferentes. Alternativamente, e mais preferivelmente para polímeros de peso molecular inferiores (por exemplo, menos do que
10 aproximadamente 20 kiloDáltons, mais preferivelmente menos do que aproximadamente 10 kiloDáltons), a mistura do produto pode ser purificada para obter a distribuição de segmentos de polímero solúveis em água por agente ativo. Por exemplo, a mistura do produto pode ser purificada para
15 obter uma média de em qualquer lugar de um a cinco PEGs por agente ativo (por exemplo, polipeptídeo). A estratégia para a purificação da mistura de reação conjugada final dependerá de um número de fatores, incluindo, por exemplo, o peso molecular do polímero empregado, o agente ativo
20 particular, o regime de dose desejado, e a atividade residual e propriedades *in vivo* dos conjugados individuais.

Se desejados, os conjugados que têm pesos moleculares diferentes podem ser isolados usando a cromatografia de filtração de gel. Que quer dizer, cromatografia de
25 filtração de gel é usada para fracionar diferentemente relações de agente ativo a polímero numeradas (por exemplo, 1-mer, 2-mer, 3-mer, e assim por diante, onde "1-mer" indica polímero 1 a agente ativo, "2-mer" indica dois polímeros a agente ativo, e assim por diante) com base em
30 seus pesos moleculares diferentes (onde a diferença

corresponde essencialmente ao peso molecular médio dos segmentos de polímero solúvel em água). Por exemplo, em uma reação exemplar onde uma proteína de 100 kDa é conjugada aleatoriamente a um reagente polimérico que tem um peso molecular de aproximadamente 20 kDa, a mistura de reação resultante conterá provavelmente proteína não modificada (MW 100 kDa), proteína mono-PEGilada (MW 120 kDa), proteína di-PEGilada (MW 140 kDa), e assim por diante. Quando esta abordagem puder ser usada para separar o PEG e os outros conjugados de polímero que têm pesos moleculares diferentes, esta abordagem é geralmente ineficaz para separar os isômeros posicionais que têm locais de fixação do polímero diferentes dentro da proteína. Por exemplo, a cromatografia de filtração de gel pode ser usada para separar cada mistura das outras misturas de PEG 1-mers, 2-mers, 3-mers, e assim por diante, embora cada uma das composições recuperadas PEG-mer possa conter PEGs unidos aos grupos amino reativos diferentes (por exemplo, resíduos de lisina) dentro do agente ativo.

As colunas de filtração de gel apropriadas para realizar este tipo de separação incluem Colunas Superdex™ e Sephadex™ disponíveis de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). A seleção de uma coluna particular dependerá da escala de fracionamento desejada. A eluição é realizada geralmente usando um tampão apropriado, tal como, fosfato, acetato ou similares. As frações coletadas podem ser analisadas por um número de métodos diferentes, por exemplo, (i) densidade óptica (OD) a 280 nm por conteúdo de proteína, (ii) análise da proteína de albumina de soro bovino (BSA), (iii) teste de iodo para conteúdo PEG [Sims *et al.* (1980) *Anal.*

Biochem, 107:60-63], e (iv) eletroforese em gel de poliacrilamida de sulfato dodecil de sódio (SDS PAGE), seguidos manchando com iodeto de bário.

A separação de isômeros posicionais é realizada pela
5 cromatografia de fase reversa usando uma coluna C18 de cromatografia líquida de alto desempenho-fase reversa (RP-HPLC) (Amersham Biosciences ou Vydac) ou pela cromatografia de troca iônica usando uma coluna de troca iônica, por exemplo, uma coluna de troca iônica de Sepharose™
10 disponível de Amersham Biosciences. Qualquer abordagem pode ser usada para separar os isômeros de agente ativo-polímero que têm o mesmo peso molecular (isômeros posicionais).

No que diz respeito à porção de fator IX, a porção de fator IX útil para a presente invenção inclui qualquer
15 proteína que tiver a mesma atividade (embora não necessariamente o mesmo grau de atividade) que o fator nativo, humano IX.

Como indicado previamente, o termo "porção de fator IX" incluirá a porção de fator IX antes da conjugação assim
20 como a porção de fator IX seguindo fixação a um polímero solúvel em água. Compreende-se, entretanto, que quando a porção de fator IX é unida a um polímero solúvel em água não peptídico, a porção de fator IX é ligeiramente alterada devido à presença de uma ou mais ligações covalentes
25 associadas com a ligação ao polímero (ou porção espaçadora que é unida ao polímero). Frequentemente, esta forma ligeiramente alterada da porção de fator IX unida a outra molécula é referida a um "resíduo" da porção de fator IX.

A porção de fator IX pode ser derivada de ou métodos
30 não recombinantes ou de métodos recombinantes e a invenção

não é limitada nesta consideração. Além disso, a porção de fator IX pode ser derivada das fontes humanas ou das fontes animais.

A porção de fator IX pode ser derivada não
5 recombinantemente. Por exemplo, a porção de fator IX pode ser obtida de hemoderivados. Em particular, o fator IX pode ser fracionado do plasma humano usando técnicas de precipitação e de centrifugação conhecidas àqueles versados na técnica. Veja, por exemplo, Wickerhauser (1976)
10 *Transfusion* 16 (4): 345-350 e Slichter *et al.* (1976) *Transfusion* 16 (6): 616-626. O fator IX pode igualmente ser isolado dos granulócitos humanos. Veja Szmitkoski *et al.* (1977) *Haematologia (Budap.)* 11(1-2): 177-187.

A porção de fator IX pode ser derivada dos métodos
15 recombinantes. Por exemplo, a codificação do cDNA para o fator nativo IX, que é uma porção de fator IX, foi isolada, caracterizada, e clonada em vetores da expressão. Veja, por exemplo, Choo *et al.* (1982) "Molecular Cloning of the Gene for Human Anti-hemophilic Factor IX", *Nature*, Vol. 299: 178-180,
20 e Kurachi *et al.* (1982) "Isolation and Characterization of a cDNA Coding for Human Factor IX", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 79:6461-65.

Uma vez expressado, o fator nativo IX é uma única cadeia glicoproteína de aproximadamente 55.000 Dáltons.
25 Pode-se estruturalmente considerar como ter quatro domínios: o domínio rico em carboxiglutamato gama ou Gla; regiões tipo; peptídeo de ativação; e local ativo.

No que diz respeito às porções de fator IX, fragmentos biologicamente ativos, variantes de deleções, variantes de
30 substituição ou variantes de adição de qualquer um dos

anteriores que mantêm pelo menos algum grau da atividade de fator IX desejada pode igualmente ser usado.

O agente ativo pode vantajosamente ser modificado para incluir um ou mais resíduos de aminoácido como, por exemplo, lisine, cisteína e/ou arginina, a fim de fornecer 5 fixação fácil do polímero a um átomo dentro da cadeia lateral do aminoácido. As técnicas para adicionar resíduos de aminoácido são bem conhecidas por aqueles versados na técnica. Referência é feita a J. March, *Advanced Organic* 10 *Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992).

O agente ativo pode ser obtido das fontes derivadas de sangue. Por exemplo, o fator VIII pode ser fracionado do plasma humano usando precipitação e técnicas de 15 centrifugação conhecidas por aqueles versados na técnica. Veja, por exemplo, Wickerhauser (1976) *Transfusion* 16 (4): 345-350 e Slichter *et al.* (1976) *Transfusion* 16 (6): 616-626. O fator VIII pode igualmente ser isolado dos granulócitos humanos. Veja Szmitkoski *et al.* (1977) 20 *Haematologia (Budap.)* 11 (1-2): 177-187.

Além disso, o agente ativo pode igualmente ser obtido dos métodos recombinantes. Momentaneamente, os métodos recombinantes envolvem construir o ácido nucléico codificando o polipeptídeo ou fragmento desejado, clonando 25 o ácido nucléico em um vetor de expressão, transformando uma célula hospedeira (por exemplo, bactérias, levedura, ou célula mamífera tal como, célula de ovário de hamster Chinês ou célula do rim de hamster bebê), e expressando o ácido nucléico para produzir o polipeptídeo ou fragmento 30 desejado. Os métodos para produzir e expressar

polipeptídeos recombinantes *in vitro* e em células hospedeiras procarióticas e eucarióticas são conhecidos por aqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, a Patente dos EUA N° 4.868.122.

5 Os agentes biologicamente ativos exemplares acima são significados para abranger, onde aplicáveis, análogos, agonistas, antagonistas, inibidores, isômeros, e formas de sal farmacologicamente aceitáveis dos mesmos. Na referência a peptídeos e proteínas, a invenção é pretendida abranger
10 formas sintéticas, recombinantes, nativas, glicosiladas, e não glicosiladas, assim como fragmentos biologicamente ativos dos mesmos. Além disso, o termo "agente ativo" é pretendido para abranger o agente ativo antes da conjugação assim como o "resíduo" de agente ativo seguindo conjugação.

15 Para qualquer dada porção, é possível determinar se essa porção tem a atividade de fator IX. Por exemplo, diversas linhagens animais foram produzidas intencionalmente com a mutação genética para a hemofilia tal que um animal produzido de tal linhagem tem níveis
20 muito baixos e insuficientes de fator IX. Tais linhagens são disponíveis de uma variedade de fontes como, entre outras, a Divisão dos Laboratórios e Pesquisa, Departamentos de Nova York de Saúde Pública, Albany, NY e o Departamento de Patologia, Universidade da Carolina do
25 Norte, Chapel Hill, NC. Ambas as fontes, por exemplo, fornecem os caninos que sofrem da hemofilia canina B. A fim de testar a atividade de fator IX de qualquer dada porção em questão, a porção é injetada no animal doente, em um corte pequeno feito e no tempo de sangramento comparado a
30 um animal doente tratado como um controle. Outro método

útil para determinar a atividade de fator de IX é determinar o cofator e a atividade procoagulante. Veja, por exemplo, Mertens *et al.* (1993) *Brit. J. Haematol.* 85: 133-42. Outros métodos conhecidos por aqueles versados na técnica podem igualmente ser usados para determinar se uma dada porção tem atividade de fator IX. Tais métodos são úteis para determinar a atividade de fator IX de ambas as porções de fator IX propostas assim como o conjugado da porção de Fator IX-polímero correspondente.

10 A presente invenção igualmente inclui preparações farmacêuticas que compreendem um conjugado como fornecido aqui em combinação com um excipiente farmacêutico. Geralmente, o próprio conjugado estará em uma forma sólida (por exemplo, um precipitado), que possa ser combinado com um excipiente farmacêutico apropriado que possa estar ou na
15 forma sólida ou líquida.

Os excipientes exemplares incluem, entre outros, aqueles selecionados do grupo consistindo em carboidrato, sais inorgânicos, agentes antimicrobiais, antioxidantes, tensoativos, tampões, ácidos, bases, e combinações dos
20 mesmos.

Um carboidrato tal como um açúcar, um açúcar derivado tal como um alditol, ácido aldônico, um açúcar esterificado, e/ou um polímero de açúcar que pode estar presente como um excipiente. Excipientes de carboidrato
25 específicos incluem, por exemplo: monossacarídeos, tais como frutose, maltose, galactose, glicose, D-manose, sorbose e similares; dissacarídeos, tais como lactose, sacarose, trehalose, celobiose e similares; polissacarídeos, tais como o rafinose, melezitose,
30

maltodextrina, dextranos, amidos e similares; e alditóis, tais como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, [sic:] xilitol, sorbitol (glucitol), piranosil sorbitol, mioinositol e similares.

5 O excipiente pode igualmente incluir um sal inorgânico ou tampão tal como ácido cítrico, cloreto de sódio, cloreto do potássio, sulfato de sódio, nitrato de potássio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, e combinações dos mesmos.

10 A preparação pode igualmente incluir um agente antimicrobiano para impedir ou intimidar o crescimento microbiano. Os exemplos não limitantes dos agentes antimicrobiais apropriados para a presente invenção incluem cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, álcool benzílico, cloreto de cetilpiridínio, clorobutanol, fenol, 15 álcool feniletílico, nitrato de fenilmercúrio, timersol, e combinações dos mesmos.

Um antioxidante pode estar presente na preparação também. Os antioxidantes são usados para impedir oxidação, 20 impedindo desse modo a deterioração do conjugado ou de outros componentes da preparação. Os antioxidantes apropriados para o uso na presente invenção incluem, por exemplo, palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, 25 monotioglicerol, galato de propila, bissulfito de sódio, sulfoxilato de formaldeído de sódio, metabissulfito de sódio e combinações dos mesmos.

Um tensoativo pode estar presente como um excipiente. Os tensoativos exemplares incluem: polissorbatos, tais como 30 "Tween 20" e " Tween 80, " e plurônicos tais como F68 e F88

(ambos estão disponíveis de BASF, Mount Olive, New-Jersey); ésteres de sorbitano; lipídeos, tais como fosfolipídeos tais como lecitina e outros fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (embora preferivelmente não na forma lipossomal), ácidos graxos e ésteres graxos; esteróides, tais como colesterol; e agentes de quelação, tais como EDTA, zinco e outros tais cátions apropriados.

Ácidos ou bases podem estar presentes como um excipiente na preparação. Os exemplos não limitativos dos ácidos que podem ser usados incluem aqueles ácidos selecionados do grupo consistindo em ácido clorídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico e combinações dos mesmos. Os exemplos de bases apropriadas incluem, sem limitação, bases selecionadas do grupo consistindo em hidróxido de sódio, acetato de sódio, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, acetato de amônio, acetato de potássio, fosfato de sódio, fosfato de potássio, citrato de sódio, formiato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de potássio, fumerato de potássio e combinações dos mesmos.

As preparações farmacêuticas abrangem todos os tipos de formulações e em particular aquelas que são adequadas para injeção, por exemplo, pós que podem ser reconstituídos assim como suspensões e soluções. A quantidade do conjugado (isto é, o conjugado formado entre o agente ativo e o polímero descrito aqui) na composição variará dependendo de um número de fatores, mas será otimamente uma dose terapêuticamente eficaz quando a composição é armazenada em

um recipiente de dose de unidade (por exemplo, um frasco). Além disso, a preparação farmacêutica pode ser abrigada em uma seringa. Uma dose terapeuticamente eficaz pode ser determinada experimentalmente pela administração repetida
5 das quantidades crescentes do conjugado a fim de determinar que quantidade produz um ponto de extremidade clinicamente desejado.

A quantidade de qualquer excipiente individual na composição variará dependendo da atividade do excipiente e
10 das necessidades particulares da composição. Tipicamente, a quantidade ótima de qualquer excipiente individual é determinada com a experimentação rotineira, isto é, preparando as composições que contêm as quantidades de variação do excipiente (que varia do ponto baixo à
15 elevação), examinando a estabilidade e outros parâmetros, e determinando então a escala em que o desempenho ótimo é alcançado sem efeitos adversos significativos.

Geralmente, entretanto, o excipiente estará presente na composição em uma quantidade de aproximadamente 1% a
20 aproximadamente 99% em peso, preferivelmente de aproximadamente 5%-98% em peso, mais preferivelmente de aproximadamente 15-95% em peso do excipiente, com concentrações menores que 30% em peso o mais preferido.

Estes excipientes farmacêuticos antecedentes junto com
25 outros excipientes são descritos em "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), e Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Edition, American
30 Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

As preparações farmacêuticas da presente invenção são tipicamente, embora não necessariamente, administradas através da injeção e são conseqüentemente soluções ou suspensões geralmente líquidas imediatamente antes da 5 administração. A preparação farmacêutica pode igualmente tomar outras formas tais como xaropes, cremes, pomadas, comprimidos, pós e similares. Outros modos de administração são incluídos igualmente, como pulmonar, retal, transdérmico, transmucosal, oral, intratecal, subcutâneo, 10 intra-arterial e assim por diante.

Como descrito previamente, os conjugados podem ser administrados parenteralmente pela injeção intravenosa, ou menos preferivelmente por injeção intramuscular ou subcutânea. Os tipos apropriados de formulação para a 15 administração parenteral incluem soluções prontas para injeção, pós secos para a combinação com um solvente antes do uso, suspensões prontas para a injeção, composições insolúveis secas para a combinação com um veículo antes do uso e emulsões e concentrados líquidos para a diluição 20 antes da administração, entre outros.

A invenção igualmente fornece um método para administrar um conjugado como fornecido aqui a um paciente que sofre de uma condição que seja responsiva ao tratamento com conjugado. O método compreende administrar, geralmente 25 através da injeção, uma quantidade terapeuticamente eficaz do conjugado (fornecido preferivelmente como parte de uma preparação farmacêutica). O método da administração pode ser usado para tratar qualquer condição que possa ser remediada ou impedida pela administração do conjugado 30 particular. Aqueles versados na técnica apreciarão que

condições um conjugado específico pode eficazmente tratar. A dose atual a ser administrada variará dependendo da idade, peso, e condição geral do indivíduo assim como a severidade da condição que está sendo tratada, o julgamento
5 do profissional de saúde, e o conjugado que está sendo administrado. As quantidades terapeuticamente eficazes são conhecidas por aqueles versados na técnica e/ou são descritas nos textos e na literatura pertinentes da referência. Geralmente, uma quantidade terapeuticamente
10 eficaz variará de aproximadamente 0.001 mg a 100 mg, preferivelmente nas doses de 0.01 mg/dia a 75 mg/dia, e mais preferivelmente nas doses de 0.10 mg/dia a 50 mg/dia.

A dosagem de unidade de qualquer dado conjugado (fornecida outra vez, preferivelmente como parte de uma
15 preparação farmacêutica) pode ser administrada em uma variedade de programações de dose dependendo do julgamento do clínico, necessidades do paciente, e assim por diante. A programação de dose específica será conhecida por aqueles versados na técnica ou pode ser determinada
20 experimentalmente usando métodos rotineiros. As programações de dose exemplares incluem, entre outras, administração cinco vezes por dia, quatro vezes por dia, três vezes por dia, duas vezes por dia, uma vez ao dia, três vezes por semana, duas vezes por semana, uma vez por
25 semana, duas vezes por mês, uma vez por mês, e qualquer combinação dos mesmos. Uma vez que o ponto de extremidade clínico foi alcançado, a administração da dose da composição é interrompida.

Deve ser compreendido que quando a invenção for
30 descrita conjuntamente com as configurações específicas

preferidas dos mesmos, a descrição antecedente assim como a experimental que segue são pretendidas para ilustrar e não limitar o escopo da invenção. Outros aspectos, vantagens e modificações dentro do escopo da invenção serão aparentes 5 àqueles versados na técnica a qual a invenção pertence.

Todos os artigos, livros, patentes, publicações de patente e outras publicações referidas aqui são por meio deste incorporados pela referência em suas totalidades.

EXPERIMENTAL

10 A prática da invenção empregará, salvo indicação contrária, as técnicas convencionais da síntese orgânica e similares, que são compreendidas por aqueles versados na técnica e explicadas na literatura. Nos seguintes exemplos, os esforços foram feitos para assegurar a exatidão no que 15 diz respeito aos números usados (por exemplo, quantidades, temperaturas, e assim por diante), mas algum erro experimental e desvio devem ser incluídos. Salvo indicação contrária, a temperatura está nos graus Celsius e a pressão está ou perto da pressão atmosférica no nível do mar. Todos 20 os reagentes foram obtidos comercialmente salvo indicação contrária. Todo o NMR gerado foi obtido de um espectrômetro NMR de 300 ou 400 MHz fabricado por Bruker (Billerica, MA). Todo processamento é realizado em vidro ou vasos revestidos com vidro e o contato com vasos contendo metal ou 25 equipamento é evitado.

As seguintes abreviaturas serão usadas.

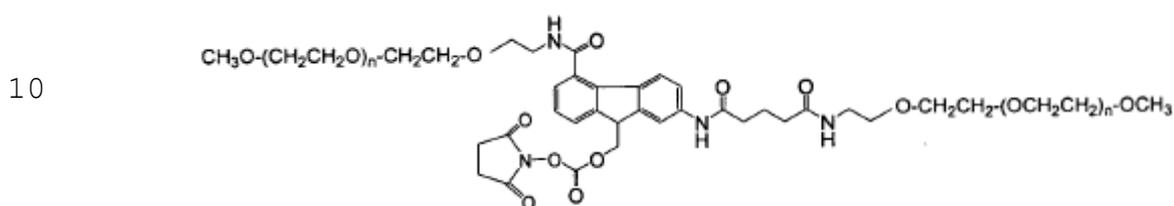
Cromatografia líquida de alta pressão HPLC.

Eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio SDS-PAGE

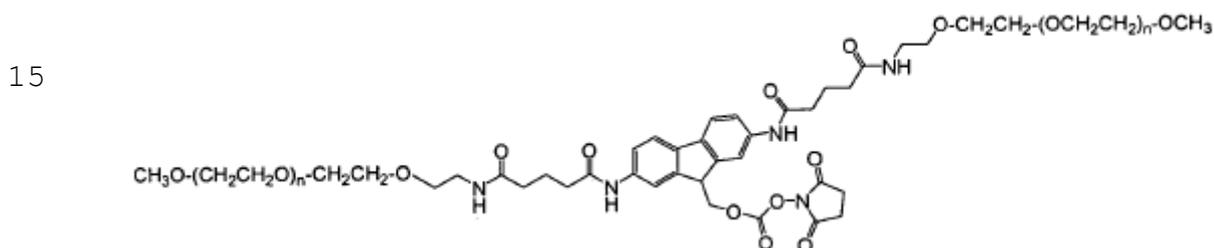
30 O fator IX usado nos seguintes exemplos é isolado da

preparação comercialmente disponível negociada sob a marca BENEFIX® de fator recombinante IX (Wyeth, Madison NJ). A solução isolada da proteína é armazenada em temperaturas reduzidas.

5 Os reagentes poliméricos foram feitos de acordo com as pesquisas básicas descritas na publicação do Pedido de Patente dos EUA N° 2006/0293499 e tiveram as seguintes estruturas:



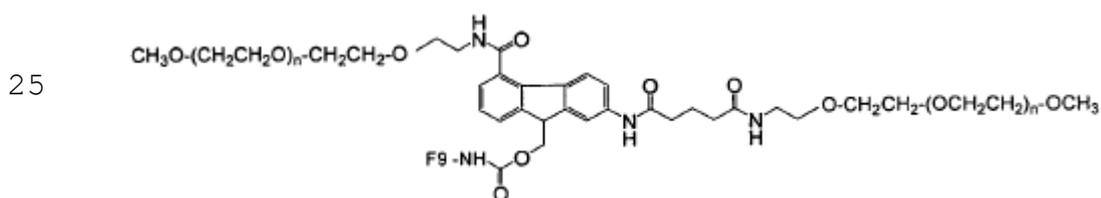
"reagente polimérico A"



"reagente polimérico B"

20 **Exemplo 1**

Preparação do conjugado de fator IX (20.000 Da peso molecular médio do peso do polímero total) ("liberação curta")



(onde F9 é um resíduo do fator IX)

Um frasco de Benefix® de fator IX (5,5 mg de fator IX, 30 Wyeth) foi removido do armazenamento de 4°C e deixado

aquecer à temperatura ambiente. O pó liofilizado foi ressuspenso como descrito na inserção de pacote (10 mL de água estéril por frasco). Enquanto a solução de fator IX foi ressolubilizada em uma placa oscilante, o reagente polimérico A foi removido do armazenamento de -20°C e aquecido à temperatura ambiente. O líquido ressuspenso Benefix® foi trocado por tampão em 1 x PBS + 1% Sacarose + 0,005% Tween 20 pH 7,3 usando uma coluna de 16/10 HiPrep DeSalt da GE para remover a glicina na formulação. As frações da proteína foram coletadas e vertidas nos tubos cônicos de 50 mL para a reação da conjugação do reagente de polímero. Uma relação molar em excesso de 9,34 (relativo ao fator IX) do reagente polimérico A que tem um peso molecular médio do peso do polímero total (isto é, a soma do peso molecular médio do peso de cada "braço" de polímero) de aproximadamente 40.000 Da que foi dissolvido recentemente em 2 mM de HCl, foi introduzido lentamente com pipeta na solução de fator IX. Uma barra de agitação foi adicionada à reação e a solução foi agitada em velocidade baixa durante três horas do processo de conjugação. A reação foi então resfriada rapidamente pela adição 1:100 de glicina a 1 M em água, que foi então agitada delicadamente em um agitador à temperatura ambiente por outros 30 minutos. Acredita-se que a adição da glicina deve ocorrer dentro de 24 horas. A solução foi diluída por uma adição de 3:1 (volume) de 20 mM Bis-Tris pH 7,5 + 1% Sacarose + 10 mM Histidina + 0,005 % Tween 20. A solução foi misturada bem por agitação suave, e o reagente polimérico A não ligado na solução foi então removido pela cromatografia de troca iônica. O fator conjugado IX foi eluído por um

fator IX) do reagente polimérico B que tem um peso molecular médio do peso do polímero total (isto é, a soma do peso molecular médio do peso de cada "braço" de polímero) de aproximadamente 40.000 Da que foi dissolvido recentemente em 2 mM de HCl, foi introduzido lentamente com pipeta na solução de fator IX. Uma barra de agitação foi adicionada à reação e a solução foi agitada em velocidade baixa durante três horas do processo de conjugação. A reação foi então resfriada bruscamente pela adição 1:100 de glicina a 1 M em água, que então agitada delicadamente em um agitador à temperatura ambiente por outros 30 minutos. Acredita-se que a adição da glicina deve ocorrer dentro de 24 horas. A solução foi diluída por uma adição de 3:1 (volume) de 20 mM Bis-Tris pH 7.5 + 1% Sacarose + 10 mM Histidina + 0,005 % Tween 20. A solução foi misturada bem por agitação suave, e o reagente polimérico B não ligado na solução foi então removido pela cromatografia de troca iônica. O fator conjugado IX foi eluído por um gradiente de NaCl. Uma "liberação longa" do conjugado de fator IX foi desse modo preparada.

O procedimento básico foi repetido salvo que o reagente polimérico B que têm um peso molecular médio do peso do polímero total de aproximadamente 40.000 Da e 400,4 mg do reagente polimérico foram usados.

Exemplo 3

Farmacocinética

A farmacocinética dos conjugados preparados de acordo com os exemplos 1 e 2, cada um com um peso molecular médio do peso do polímero total de 20.000 Da (junto com o fator IX como um controle) foi determinada usando técnicas

convencionais. Brevemente, os ratos SD macho foram usados (180 a 220 gramas; 6 a 7 semanas de idade) e fornecidos uma injeção iv de 100 µL. Quatro animais por grupo foram usados e o plasma de sangue coletado em vários pontos do tempo (por exemplo, 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 horas) depois da injeção.

Os resultados são fornecidos na tabela 1 abaixo, onde V é volume de distribuição, CL é depuração total do plasma, AUC é área sob a curva tempo-concentração do plasma, e $T_{1/2}$ beta é a meia-vida da fase terminal da eliminação. Uma curva tempo-concentração foi preparada e é fornecida como figura 1.

Tabela 1

Valores Farmacocinéticos Conjugados

Dose (ug/kg)	Tratamento	V (mL/kg)	CL (mL/hr/kg)	AUC (ng/mL*hr/kg)	$T_{1/2}$ beta (hr)
500	Factor IX	183.9	59.3	8431.5	2.4
500	Factor IX - "short release"	76.7	11.8	42489.8	8.9
500	Factor IX - "long release"	44.2	2.9	170391.3	21.2
Ratios					
	Factor IX - "short release" / Factor IX	0.42	0.20	5.04	3.77
	Factor IX - "long release" / Factor IX	0.24	0.05	20.21	8.98

Factor IX - "short release" = Fator IX "liberação curta"

Factor IX - "long release" = Fator IX "liberação longa"

Exemplo 4

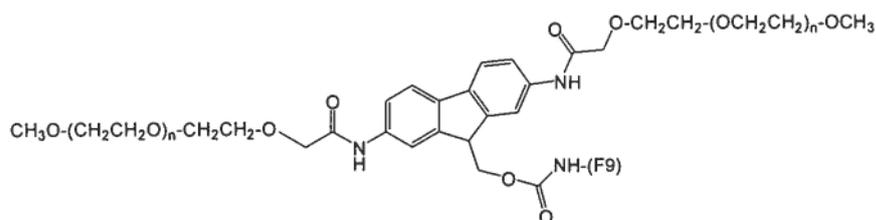
Atividade de Coagulação

As atividades da coagulação in vitro dos conjugados preparados de acordo com os exemplos 1 e 2, cada um com um peso molecular médio do peso do polímero total de 20.000 Da (junto com o fator IX como um controle) foram determinadas usando técnicas convencionais. Os resultados são fornecidos na figura 2.

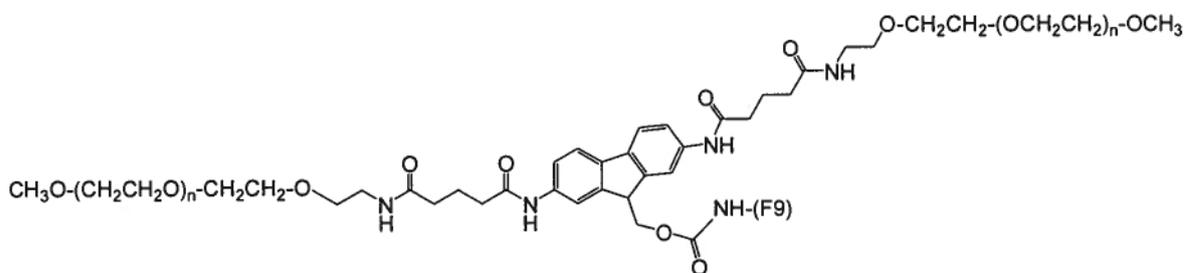
REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fator IX-poli(etileno glicol) com uma ligação liberável **caracterizado** pelo fato de ter uma estrutura selecionada de:

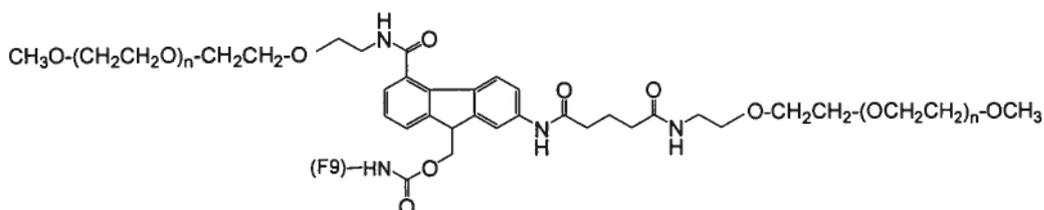
5



;

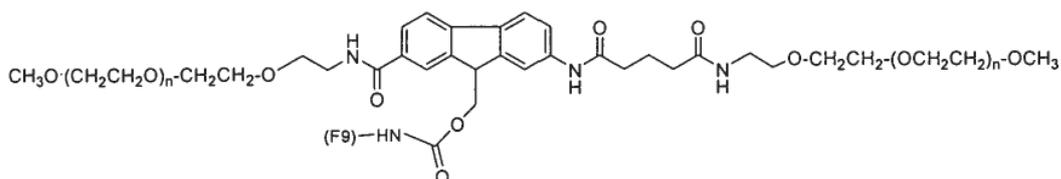


;



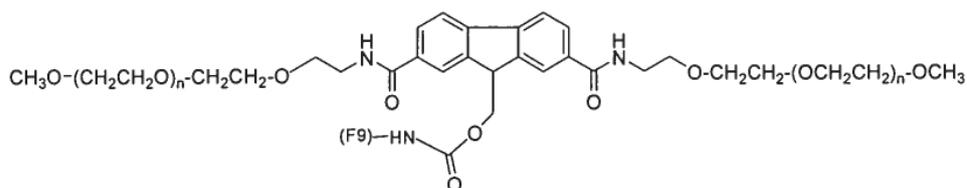
;

10

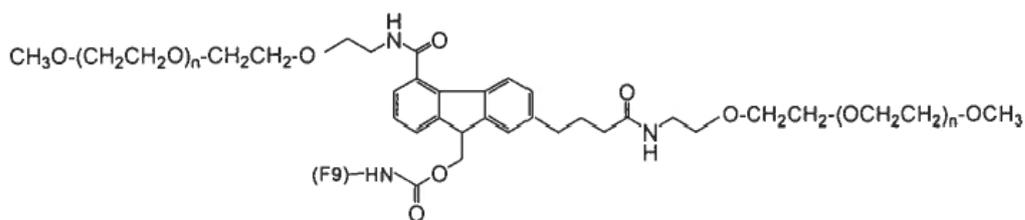


;

15



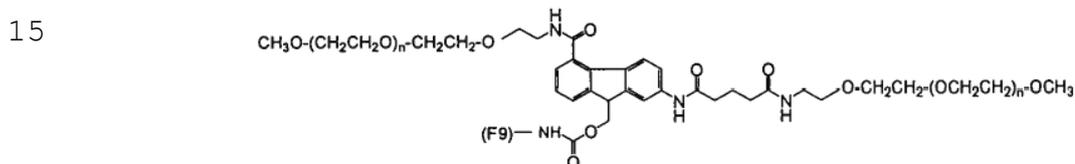
; e



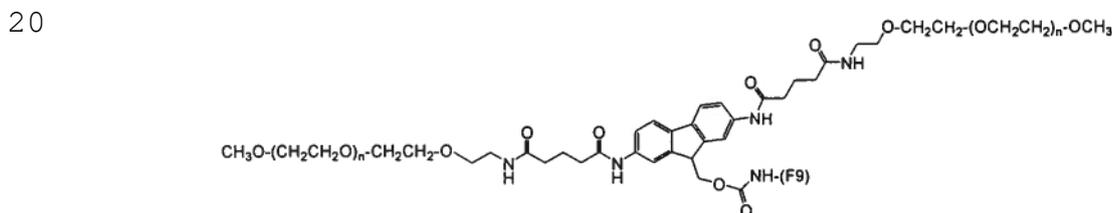
em que, para cada estrutura e em cada exemplo, (n) é independentemente um número inteiro de 4 a 1500 e (F9) é uma proteína recombinante humana fator IX, em que "NH-(F9)" representa um grupo amino da proteína do fator IX.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que cada cadeia do polímero poli(etileno glicol), $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, independentemente e em cada estrutura, possui um peso molecular ponderal médio entre 10.000 dáltons a 85.000 dáltons.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de possuir a seguinte estrutura:



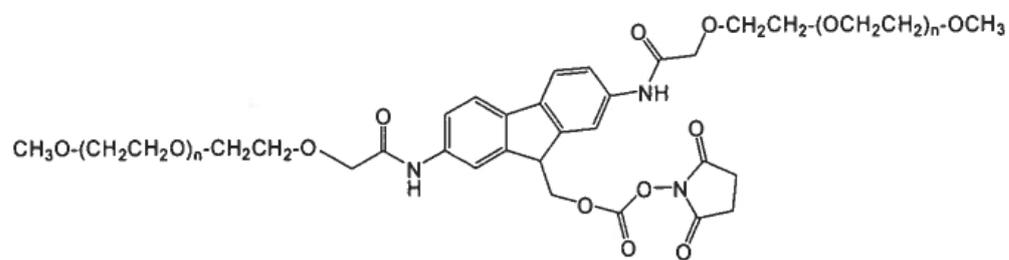
4. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de possuir a seguinte estrutura:



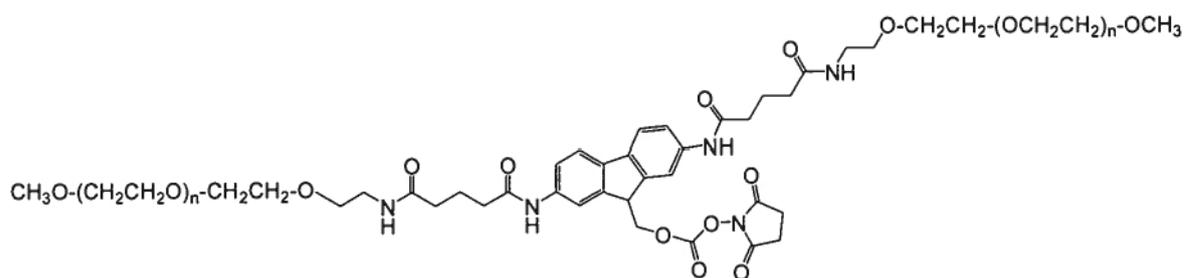
5. Método para preparar um composto fator IX-poli(etileno glicol), conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de compreender

(i) colocar em contato um excesso molar de um reagente

polimérico selecionado do grupo que consiste em:

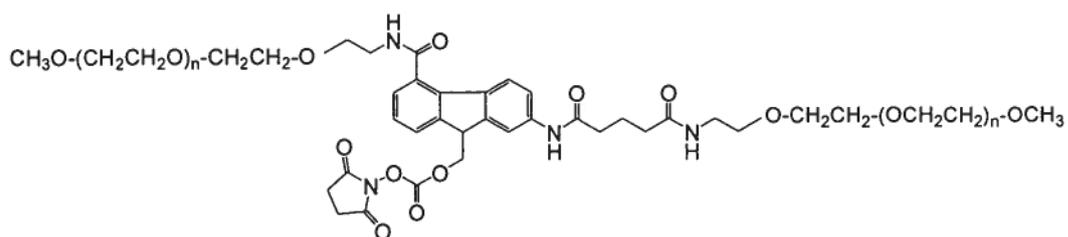


;

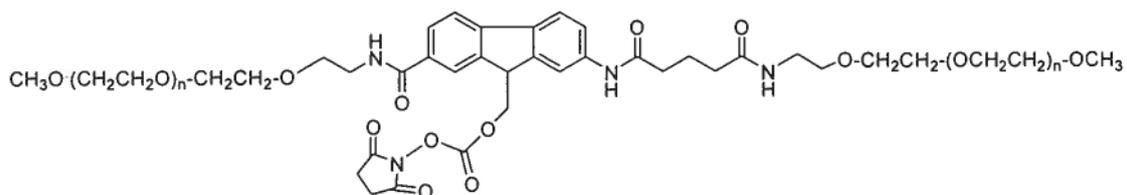


5

;

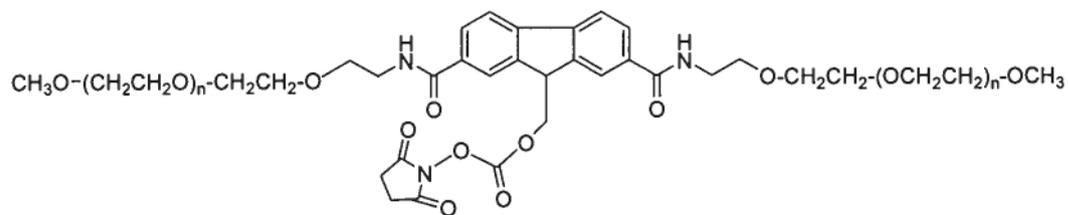


;



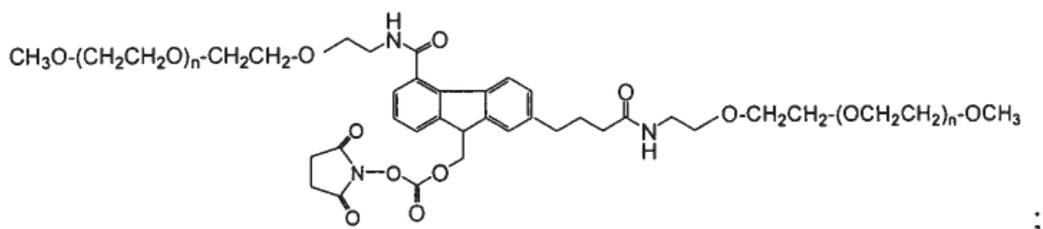
;

10



;

15



5 em que, para cada estrutura e em cada exemplo, (n) é independentemente um número inteiro de 4 a 1500,

com uma proteína recombinante humana fator IX para, assim, formar uma ligação covalente liberável entre o reagente polimérico e um grupo amino da proteína recombinante humana fator IX, para formar um composto fator IX-poli(etileno glicol) compreendido em uma mistura de reação, em que o excesso do reagente polimérico é de 1,5:1 a 10:1 e a reação é realizada à temperatura ambiente, na faixa de 20°C a 25°C,

15 (ii) separar o composto formado em (i) da mistura de reação, e

(iii) purificar o composto por cromatografia.

6. Composição **caracterizada** pelo fato de compreender o composto, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e um excipiente farmacologicamente aceitável.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de ser eficaz para melhorar a atividade de coagulação sanguínea.

Farmacocinéticos de Conjugados de Fator IX

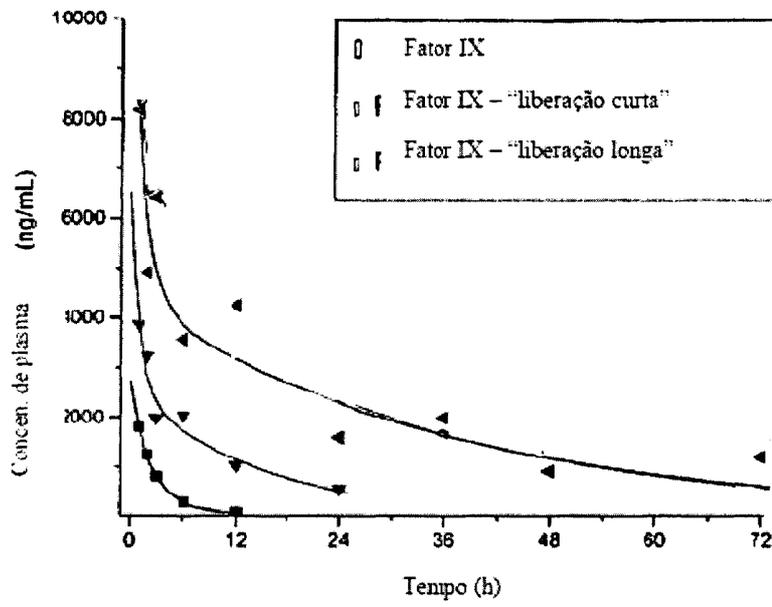


FIG. 1

Atividade de Coagulação In Vitro

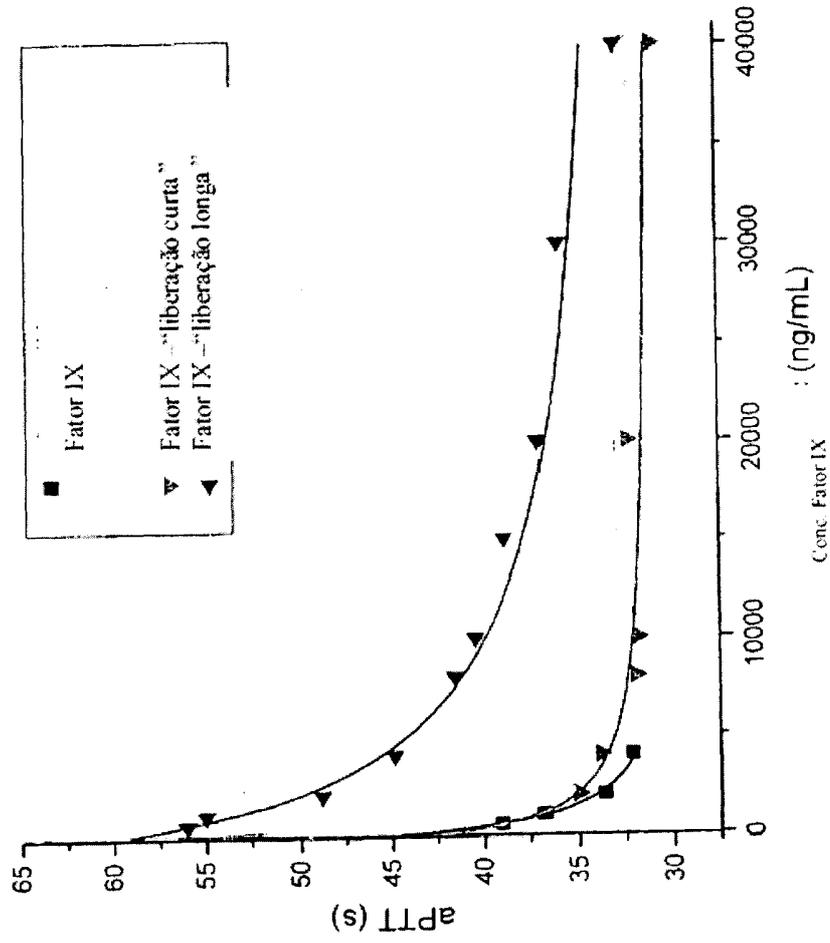


FIG. 2