

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 956 309**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2019** **PCT/FR2019/051456**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2019** **WO19239080**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2019** **E 19742443 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2023** **EP 3806891**

54 Título: **Combinación del factor VII y un anticuerpo biespecífico anti-factores IX y X**

30 Prioridad:

14.06.2018 FR 1855239

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

19.12.2023

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
Tour W - 102 Terrasse Boieldieu, 19ème Étage
92800 Puteaux, FR**

72 Inventor/es:

PLANTIER, JEAN-LUC

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 956 309 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Combinación del factor VII y un anticuerpo biespecífico anti-factores IX y X

La invención se refiere a composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de un trastorno de la coagulación, tal como la hemofilia A, especialmente en un paciente que presenta hemofilia de tipo A con desarrollo de anticuerpos inhibidores del factor VIII.

Antecedentes tecnológicos

La coagulación implica dos vías, una intrínseca y otra extrínseca, que conducen a una vía final común. La combinación de los dos mecanismos asegura la formación de un coágulo sanguíneo sólido y flexible, que resiste la presión sanguínea. Bajo la acción de la trombina, el fibrinógeno sufre modificaciones químicas que dan como resultado la formación de fibrina. La fibrina es necesaria para la formación del coágulo.

La vía intrínseca incluye factores presentes en la circulación y el proceso de coagulación comienza dentro del propio vaso sanguíneo. La vía extrínseca, por su parte, involucra factores tisulares que normalmente no están presentes en la circulación y que se liberan durante una lesión vascular.

El factor VII es una glicoproteína implicada en la vía extrínseca de la coagulación sanguínea. Para iniciar la cascada de la coagulación, el FVII debe activarse en FVIIa. Una vez activado, el FVIIa forma complejos con el factor tisular (FT), una proteína asociada a fosfolípidos, que se libera durante la lesión vascular. El FVIIa solo (no formando complejos con el factor tisular) presenta una actividad proteolítica baja. A continuación, el complejo FVIIa-FT transforma el factor X en factor Xa en presencia de iones de calcio. Este complejo también actúa sobre la activación del factor FIX en FIXa, catalizando así la vía intrínseca. Los factores IXa y Xa a su vez activan el factor VII activado.

El factor IX y el factor X intervienen en la vía intrínseca de la coagulación. El factor IX activado permite la activación del factor X en factor Xa.

El factor Xa forma un complejo con el factor FV activado y la protrombina transforma la protrombina en trombina. Luego, la trombina actúa sobre el fibrinógeno para transformarlo en fibrina y también permite la activación de FVIII y FV en FVIIa y FVa, respectivamente. La trombina, por su parte, permite activar el factor XIII en FXIIa, responsable de la consolidación del coágulo de fibrina, en presencia de calcio, presente de forma natural en el plasma.

Sin embargo, cuando falta un factor de la coagulación, la cascada de la coagulación se interrumpe o es deficiente y entonces hablamos de coagulación anormal.

El factor VII activado actúa localmente en presencia de factor tisular liberado después de una lesión tisular que provoca hemorragias, incluso en ausencia de factor VIII o IX. Por este motivo, el factor VII, preferentemente en forma activada, se utiliza para el tratamiento de determinados trastornos de la coagulación sanguínea que se manifiestan por hemorragia.

El factor VII se utiliza así en el tratamiento de pacientes que padecen de hemofilia, que presentan una deficiencia del factor VIII (hemofilia de tipo A) o del factor IX (hemofilia de tipo B), así como de pacientes con otras deficiencias de los factores de la coagulación, por ejemplo, una deficiencia hereditaria de FVII. El FVII también se recomienda en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares.

Ciertos pacientes con hemofilia desarrollan anticuerpos inhibidores del Factor VIII administrado, generalmente en forma concentrada, como tratamiento para la hemofilia. Hoy en día es la complicación más frecuente del tratamiento de la hemofilia.

Los anticuerpos biespecíficos dirigidos a FIX o FIXa y FX o FXa, tales como Emicizumab, se utilizan para tratar a pacientes que padecen de hemofilia A que presentan inhibidores anti-factor VIII. Estos anticuerpos reemplazan funcionalmente al FVIII al favorecer la activación de FX por FIXa al unir estas dos moléculas. Estos anticuerpos tienen una acción duradera.

Se ha ensayado la combinación recombinante de FVIIa procedente de cultivo celular (tal como Novoseven®, producido en células BHK) con Emicizumab (tal como ACE910 o Hemlibra®) (*R. HARTMANN, et al. OR36 / Synergistic Effects of a Procoagulant Bispecific Antibody and FEIBA or Factor VIIA on Thrombin Generation (Haemophilia (2017), 23 (Supl. 2), 11-27)*). Esta combinación solo muestra un efecto aditivo en el tratamiento de los trastornos de la coagulación.

Por tanto, existe la necesidad de una combinación farmacéutica que permita un mejor tratamiento de los pacientes con hemofilia A y, más particularmente, de los pacientes que presentan anti-factor VIII.

Resumen de la invención

La invención propone combinar el factor VII transgénico con un anticuerpo multiespecífico dirigido contra los factores IX y X.

Según la invención, la combinación de la invención del factor VII obtenido por transgénesis y anticuerpos dirigidos

contra el factor IX y el factor X induce un efecto sinérgico en el tratamiento de los trastornos de la coagulación, y en particular para el tratamiento de pacientes que padecen de hemofilia A que presentan anti-FVIII. inhibidores y pacientes con deficiencia de FVII.

Por tanto, un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende:

- 5 a. factor VII transgénico, y
- b. un anticuerpo multiespecífico, preferentemente biespecífico, dirigido contra el factor IX y el factor X, tal como, por ejemplo, emicizumab.

Preferentemente, el factor VII está en forma de factor VII activado (FVIIa).

- 10 En una realización particular, el factor IX está en forma de factor IX activado (FIXa), y/o el factor X está en forma de factor X activado (FXa).

Preferentemente, dicho factor VII transgénico es un factor VII humano resultante de la producción por las células epiteliales de las glándulas mamarias de un mamífero no humano transgénico, por ejemplo, un conejo transgénico para el factor VII humano.

La invención también proporciona un producto de combinación que comprende:

- 15 a. factor VII transgénico, y
 - b. un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X,
- para su utilización en la prevención o el tratamiento de un trastorno de la coagulación, tal como hemofilia A, más especialmente hemofilia A con inhibidores del factor VIII (FVIII).

- 20 Preferentemente, el producto de combinación está en forma de una composición farmacéutica que comprende tanto el factor VII transgénico como dicho anticuerpo.

Alternativamente, el factor VII transgénico y el anticuerpo están en forma de composiciones separadas, adaptadas para una administración simultánea o separada (por ejemplo, secuencial) al paciente.

Otro objeto de la invención se refiere a un kit que comprende:

- Un recipiente que contiene factor FVII transgénico; y
- 25 - Otro recipiente que contiene un anticuerpo dirigido contra el factor IX y el factor X.

Lista de Figuras:

- Figura 1: Evaluación del efecto trombogénico sinérgico de la combinación Sevenfact™ + Hemlibra® sobre el lote 1 de plasma de Hemofilia A después de la inducción con TF/PL. (A) Evaluación del efecto trombogénico sinérgico sobre el PTE, (B) Evaluación del efecto trombogénico sinérgico sobre el pico de generación de trombina, (C) Evaluación del efecto trombogénico sinérgico sobre la velocidad.
- 30

Figura 2: Evaluación del efecto trombogénico sinérgico de la combinación Sevenfact™ + Hemlibra® sobre el lote 2 de plasma de Hemofilia A después de la inducción con TF/PL. (A) Evaluación del efecto trombogénico sinérgico sobre el PTE, (B) Evaluación del efecto trombogénico sinérgico sobre el pico de generación de trombina, (C) Evaluación del efecto trombogénico sinérgico sobre la velocidad.

35 Descripción detallada de la invención

Definiciones generales

- El fenómeno de la coagulación consta de una cascada de reacciones enzimáticas que implica factores de la coagulación presentes en forma de proenzimas que, en presencia de determinados cofactores, se convierten mediante escisión proteolítica en su forma "**activada**". La forma activada de cada factor presente en forma de precursor inactivo se designa con la letra a. Así, FVIIa resulta, in vivo, de la escisión del zimógeno por diferentes proteasas (FIXa, FXa, FVIIa) en dos cadenas unidas por un puente disulfuro.
- 40

El término "**tratamiento**" o "**tratar**" generalmente designa una mejoría, profilaxis o reversión de una enfermedad o trastorno, o al menos un síntoma, por ejemplo, ralentización de la progresión de una enfermedad o estabilización de un síntoma. También se incluye el retraso en la aparición de una enfermedad o trastorno, o al menos un síntoma.

- 45 El término "**prevención**" o "**prevenir**" designa una reducción del riesgo de desarrollar o adquirir una enfermedad o trastorno específico.

Para los fines de la presente invención, por "**paciente**" o "**sujeto**", se entiende cualquier mamífero, y más particularmente los seres humanos, hombres o mujeres, de cualquier edad, incluidos los niños.

El término "**composición farmacéutica**" hace referencia a preparaciones que permiten la actividad biológica de los ingredientes activos y que no contienen ningún componente adicional que sea tóxico para los sujetos a los que se administra la composición.

Factor VII transgénico

El término "**Factor VII**" o "**FVII**" incluye los polipéptidos que comprenden la secuencia 1-406 del factor VII humano de tipo salvaje (como se describe en la patente U. S. 4.784.950), o FVII derivado de otra especie (por ejemplo, bovino, porcino, canino, murino). Comprende además variaciones alélicas naturales del Factor VII que pueden existir, y cualquier forma o grado de glicosilación u otra modificación postraducciona. El término "Factor VII" también incluye variantes del FVII que tienen la misma o mayor actividad biológica en relación con la actividad de la forma salvaje, incluyendo estas variantes principalmente los polipéptidos que difieren del FVII salvaje por la inserción, delección o sustitución de uno o varios aminoácidos.

A menos que se indique lo contrario, en la presente descripción, el término "Factor VII" se refiere indistintamente al FVII no escindido (zimógeno) o al Factor VII activado (FVIIa).

Por tanto, el FVIIa está compuesto por una cadena ligera de 152 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 20 kDa y una cadena pesada de 254 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa unidas entre sí por un único puente disulfuro (Cys135-Cys262).

Por "**factor VII recombinante**", se entiende cualquier factor VII resultante de la ingeniería genética y resultante de la expresión del gen correspondiente en cualquier microorganismo, planta o planta transgénica. Por microorganismo, se entiende cualquier sistema bacteriano, fúngico, viral o celular. El factor VII recombinante también puede producirse a partir de células eucariotas cultivadas tales como células vegetales o de mamíferos, por ejemplo, células animales o humanas.

Por "**factor VII transgénico**", se entiende cualquier factor VII recombinante obtenido a partir de un animal transgénico para el factor VII.

Por "**animal transgénico**", se entiende cualquier animal no humano que presenta una modificación de su genoma destinada a permitir la expresión de una proteína de interés (en este caso, el factor VII). La modificación del genoma puede resultar de la alteración, modificación o inserción de un gen. Esta modificación puede deberse a la acción de agentes alteradores o mutágenos convencionales o llevarse a cabo mediante mutagénesis dirigida. La modificación del genoma también puede resultar de la inserción de un gen o de genes o el reemplazo de un gen o genes en su forma salvaje o mutada. El animal transgénico puede elegirse de forma no limitativa entre conejo, cabra, vaca, camello, hámster, ratón, rata, caballo, cerda, dromedario, oveja, llama. En una realización particular, es posible elegir un animal que no exprese la $\alpha 1,3$ -galactosiltransferasa.

Por la expresión "**actividad biológica del factor VIIa**", se entiende la capacidad de FVIIa de generar trombina, por ejemplo, en la superficie de las plaquetas activadas. La actividad del factor VII se puede evaluar de diferentes maneras. La actividad biológica de FVIIa se puede cuantificar, por ejemplo, midiendo la capacidad de una composición de FVII para promover la coagulación de la sangre utilizando plasma deficiente en FVII y tromboplastina, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. No. 5.997.864. En este ensayo, la actividad biológica se evalúa en relación con una muestra de control y se convierte en "unidades de FVII" en comparación con un suero humano estándar combinado que contiene 1 unidad/ml de actividad del Factor VII. Alternativamente, la actividad biológica del factor VII se puede cuantificar (i) midiendo la capacidad del Factor VIIa para producir factor Xa en un sistema que comprende factor tisular (FT) incluido en una membrana lipídica y Factor X (Persson et al. J. Biol. Chem. 272: 19919-19924, 1997); (ii) midiendo la hidrólisis del factor X en un sistema acuoso; (iii) midiendo la unión física de FVIIa al FT mediante resonancia de plasmón superficial (Persson, FEBS letts, 413:359-363, 1997), (iv) midiendo la hidrólisis de un sustrato sintético o (v) midiendo la generación de trombina en un sistema in vitro independiente de FT.

En una realización preferida, el FVII aquí descrito es un polipéptido cuya secuencia peptídica puede ser la del FVII humano natural, es decir, la secuencia presente en los seres humanos que no presentan trastornos relacionados con el FVII. Tal secuencia se describe en el documento EP 0 200 421.

Ventajosamente, la secuencia del FVII utilizada en la invención es la secuencia SEQ ID NO: 1.

Por "**sinergia**", o "**efecto sinérgico**" se entiende preferentemente un efecto de la combinación de dos productos que es superior a 2 veces la suma de los efectos de cada uno de los productos tomados por separado. Según la presente invención, se obtiene un efecto sinérgico cuando el uso de un FVIIa transgénico en combinación con un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X permite obtener un efecto superior a 2 veces la suma del efecto obtenido con un FVIIa transgénico solo y el efecto obtenido con un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X solo, sobre al menos un parámetro de generación de trombina. El parámetro de generación de trombina se elige entre la altura del pico, la velocidad o el potencial de trombina endógena (PTE).

En una realización particular, el FVIIa se administra a una concentración inferior o igual a 105 nM, preferentemente inferior a 100 nM.

En una realización particular, el anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X se administra a una concentración inferior a 600 nM, preferentemente inferior a 550 nM, preferentemente inferior a 500 nM, preferentemente inferior a 450 nM, preferentemente inferior a 400 nM, preferentemente inferior a 350 nM., preferentemente inferior a 325 nM.

En una realización particular, el factor VII se obtiene a partir de la leche de un animal transgénico.

Un método para producir una proteína recombinante en la leche de un animal transgénico puede comprender las siguientes etapas: una molécula de ADN sintético que comprende un gen que codifica una proteína de interés (aquí, por ejemplo, FVII humano), estando este gen bajo el control de un promotor de una proteína secretada naturalmente en la leche, se integra en un embrión de un mamífero no humano. Luego, el embrión se coloca en una hembra de mamífero de la misma especie. Una vez que el mamífero resultante del embrión se ha desarrollado lo suficiente, se induce la lactancia del mamífero y luego se recoge la leche. La leche contiene entonces el FVII de interés secretado por el animal transgénico.

En la solicitud de patente EP0527063 se proporciona un ejemplo de preparación de proteínas en la leche de una hembra de mamífero distinta de un ser humano, cuya enseñanza se puede utilizar para la producción del factor VII de la invención.

La secreción del factor VII por las glándulas mamarias, permitiendo su secreción en la leche del mamífero transgénico, implica el control de la expresión del factor VII de manera dependiente del tejido. Dichos métodos de control son bien conocidos por los expertos en la técnica. El control de la expresión se lleva a cabo utilizando secuencias que permiten la expresión de la proteína hacia un tejido particular. Se trata principalmente de secuencias promotoras de WAP, beta-caseína, beta-lactoglobulina y secuencias de péptidos señal, siendo la lista no limitativa.

En una realización preferida, el factor VII según la invención se produce en la leche de conejos transgénicos.

De manera particularmente ventajosa, la expresión en las glándulas mamarias del conejo se realiza bajo el control del promotor de la beta-caseína bien conocido por el experto en la técnica. En particular, se fabrica un plásmido que contiene el promotor de la beta-caseína introduciendo una secuencia que comprende el promotor del gen de la beta-caseína, siendo producido este plásmido de manera que pueda recibir un gen extraño puesto bajo la dependencia de este promotor. El gen que codifica el FVII humano se integra y se coloca bajo el control del promotor de beta-caseína. El plásmido que contiene el promotor y la secuencia que codifica la proteína de interés se digiere con enzimas de restricción para liberar el fragmento de ADN que contiene el promotor de beta-caseína y la secuencia del FVII humano. Tras la purificación, los fragmentos se introducen, mediante microinyección, en el pronúcleo masculino de embriones de conejo de tipo salvaje. Luego, los embriones se cultivan antes de transferirlos al oviducto de hembras de tipo salvaje preparadas hormonalmente. Cuando estas hembras dan a luz, la descendencia se evalúa mediante PCR para determinar los animales transgénicos. El número de copias del transgén y su integridad se revelan mediante la técnica Southern a partir del ADN extraído de los conejos transgénicos obtenidos. La concentración de FVII humano expresado en la leche de crías femeninas transgénicas se evalúa mediante ensayos inmunoenzimáticos.

En una realización particular, el factor VII útil en la invención se obtiene mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- (a) inserción de una secuencia de ADN que comprende un gen que codifica el factor VII en un embrión de mamífero no humano, estando dicho gen bajo el control transcripcional del promotor de beta-caseína,
- (b) transferencia de embriones obtenidos en la etapa a) al oviducto de hembras de mamífero no humano para que se desarrolle hasta convertirse en un mamífero no humano adulto,
- (c) inducción de la lactancia en el mamífero adulto no humano obtenido en la etapa b) de tipo hembra o en una hembra descendiente de este mamífero no humano en donde el gen y el promotor están presentes en su genoma,
- (d) recogida de la leche de dicho mamífero no humano, y
- (e) purificación del FVII presente en la leche recogida.

El FVII transgénico útil aquí exhibe un punto isoeléctrico sustancialmente homogéneo.

Por "**punto isoeléctrico**" o "**pI**", se entiende el pH para el cual la carga elemental neta de la molécula de factor VII o factor VIIa es cero, es decir el pH al cual la molécula es eléctricamente neutra (forma zwitteriónica). El punto isoeléctrico del factor VII según la invención se puede medir implementando una técnica bien conocida por los expertos en la técnica, tal como el enfoque isoeléctrico o enfoque iso-eléctrico ("IEF"). Esta técnica electroforética permite la separación de proteínas en función de su punto isoeléctrico. Consiste en una migración, inducida por una corriente eléctrica uniforme, de proteínas en un gradiente de pH hasta que alcanzan un pH equivalente a su punto isoeléctrico específico, momento en el cual dejan de migrar ya que su carga neta es cero. Los geles IEF se utilizan para determinar

el punto isoeléctrico de una proteína determinada.

Por "**sustancialmente homogéneo**", se entiende que al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 % de las moléculas de factor VII en la composición tienen un punto isoeléctrico incluido en una diferencia de unidades de pH inferior o igual a 1,2. En otra realización de la invención, al menos el 50 %, preferentemente al menos el 55 %, preferentemente el 60 % de las moléculas de factor VII transgénico de la composición tienen un punto isoeléctrico incluido en una diferencia de unidades de pH inferior a 1, preferentemente inferior a 0,5. En otra realización preferida, al menos el 50 %, preferentemente al menos el 55 %, preferentemente el 60 % de las moléculas de factor VII de la composición tienen un punto isoeléctrico comprendido en una desviación de unidades de pH de 0,4.

Por "**formas de N-glicano**", se entiende el conjunto de las formas de N-glicano presentes en los dos sitios de N-glicosilación del factor VII de la invención. Se dice que las formas de N-glicano están monocargadas si su carga total es igual a 1. Para los fines de la presente invención, se entiende por "carga" un grupo fosfato, un grupo sulfato o una molécula de ácido siálico. Por tanto, las formas de N-glicano se denominan monocargadas si contienen solo un grupo fosfato o un grupo sulfato o una molécula de ácido siálico. A diferencia del término "monocargado", el término "bicargado" significa que la carga total que llevan las formas N-glicano es igual a 2, es decir, que presentan dos cargas elegidas entre un grupo fosfato, un grupo sulfato y/o una molécula de ácido siálico. En otras palabras, las formas de N-glicano bicargadas poseen una molécula de ácido siálico y un grupo fosfato, o una molécula de ácido siálico y un grupo sulfato, o dos moléculas de ácido siálico, o dos grupos fosfato, o dos grupos sulfato, o un grupo fosfato y un grupo sulfato. El término "tricargado" significa que la carga total que llevan las formas de N-glicano es igual a 3, es decir, que presentan tres cargas elegidas entre un grupo fosfato, un grupo sulfato y/o una molécula de ácido siálico. En otras palabras, las formas de N-glicano tricargadas poseen una molécula de ácido siálico y un grupo fosfato y un grupo sulfato, o dos moléculas de ácido siálico y un grupo fosfato, o dos moléculas de ácido siálico y un grupo sulfato, o un grupo de ácido siálico y dos grupos fosfato, o un grupo de ácido siálico y dos grupos sulfato, o un grupo fosfato y dos grupos sulfato, o un grupo sulfato y dos grupos fosfato o tres moléculas de ácido siálico, o tres grupos fosfato, o tres grupos sulfato. El término "neutro" significa que las formas de N-glicano no contienen ninguna carga.

La carga de las formas de N-glicano del factor VII según la invención se puede medir implementando una técnica bien conocida por los expertos en la técnica, en particular mediante cromatografía en fase líquida de ultra alta resolución que tiene una resina de intercambio aniónico acoplada a la detección por fluorescencia. (AEX-UPLC/FD). Este método permite separar las diferentes formas de N-glicano según su carga aparente (véase, en particular, Hermentin et al, Glycobiology, vol. 6, no. 2, 1996). En el marco de la cromatografía de intercambio aniónico, se utiliza una resina cargada positivamente como fase estacionaria. Estas resinas cargadas positivamente están constituidas generalmente por un polímero o gel reticulado sobre el que se injertan grupos cargados positivamente. En una realización ventajosa de la invención, se utiliza una columna de intercambio aniónico débil del tipo aminopropilo.

En el caso de la composición de factor VII según la invención, parece que entre todas las formas de N-glicano del factor VII de la composición, al menos el 50 % de las formas de N-glicano, al menos el 60 % de las formas de N-glicano, preferentemente al menos el 65 %, preferentemente al menos el 70 %, preferentemente al menos el 75 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, preferentemente al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, son monocargadas. En una realización preferida, las moléculas de factor VII que presentan formas de N-glicano monocargadas representan entre el 50 % y el 95 % de las moléculas de factor VII de la composición, preferentemente entre el 50 % y el 90 % de las moléculas de factor VII de la composición, preferentemente entre el 50 % y el 80 % de las moléculas de factor VII de la composición, preferentemente entre el 50 % y el 70 % de las moléculas de factor VII de la composición, preferentemente entre el 50 % y el 65 % de las moléculas de factor VII de la composición, preferentemente entre el 50 % y el 60 % de las moléculas de factor VII de la composición.

El punto isoeléctrico sustancialmente homogéneo de la composición del factor VII de la combinación según la invención resulta de la combinación de las propiedades de glicosilación y γ -carboxilación de las moléculas de FVII que lo componen.

El factor VII transgénico útil aquí presenta características de modificaciones postraduccionales. Se trata en particular de modificaciones de la glicosilación, tales como, por ejemplo, dos sitios de N-glicosilación con un nivel nulo o muy bajo de Gal α 1,3Gal en la composición de FVII, o incluso lo suficientemente bajo como para no ser inmunogénico. Por el contrario, el FVII descrito aquí no es un FVII plasmático, es decir, no es un producto purificado a partir de plasma humano o animal. Más particularmente, el FVII transgénico útil aquí presenta modificaciones postraduccionales, así como dos sitios de O-glicosilación con restos de glucano definidos, una γ -carboxilación y puentes disulfuro específicos.

El FVIIa útil aquí puede contener varias modificaciones postraduccionales: los primeros nueve o diez ácidos glutámicos N-terminales están γ -carboxilados, Asp₆₃ está parcialmente hidroxilado, Ser₅₂ y Ser₆₀ están O-glicosiladas y portan respectivamente los restos de Glucosa(Xilosa)₀₋₂ y Fucosa, Asn₁₄₅ y Asn₃₂₂ están N-glicosiladas principalmente por estructuras complejas biantenarias monosialiladas.

Ventajosamente, las moléculas de factor VII transgénico útiles aquí presentan, al menos el 80 % de ellas, una γ -carboxilación en nueve residuos de ácido glutámico. En otra realización, al menos el 85 % de dichas moléculas presentan una γ -carboxilación en nueve residuos de ácido glutámico. En otra realización, entre el 85 % y el 100 %, al menos el 90 % de dichas moléculas presentan una γ -carboxilación en nueve residuos de ácido glutámico.

preferentemente entre el 90 % y el 100 %, preferentemente entre el 95 % y el 100 % de dichas moléculas presentan una γ -carboxilación en nueve residuos de ácido glutámico. Ventajosamente, la tasa de γ -carboxilación en el residuo de ácido glutámico 35 (Glu 35) de las moléculas de factor VII de la composición es inferior al 20 %. En otra realización, la tasa de γ -carboxilación del residuo Glu35 es inferior al 15 %, preferentemente inferior al 10 %, preferentemente inferior al 5 %.

El resto Gal α 1,3Gal es una estructura compuesta por dos galactosas unidas en α 1,3. Está ubicado en el extremo de las antenas de oligosacáridos de estructuras unidas en N. Este resto es conocido por su inmunogenicidad. Se prefiere así producir un FVII o un FVIIa cuyo nivel de estructuras Gal α 1,3Gal sea nulo o tan bajo que no pueda distinguirse del ruido de fondo obtenido mediante las mediciones realizadas por los equipos de análisis actualmente disponibles. Esta expresión designa de manera equivalente cualquier FVII transgénico cuyo nivel de Gal α 1,3Gal sea cercano al del FVII plasmático. Ventajosamente, el nivel de Gal α 1,3Gal de la composición de FVII aquí descrita no es inmunogénico para los seres humanos. Además, el FVII útil aquí comprende preferentemente, como el FVII humano, dos sitios de N-glicosilación, en las posiciones 145 y 322, y 2 sitios de O-glicosilación, en las posiciones 52 y 60. En un sitio de N-glicosilación, las cadenas de oligosacáridos se unen a una asparagina (unido a N). En un sitio de O-glicosilación, las cadenas de oligosacáridos se unen a una serina. Los restos unidos a estos aminoácidos serán diferentes para cada proteína de la composición. Sin embargo, podemos cuantificar, para toda la composición, el nivel de cada resto de glicano, o incluso de cada azúcar.

Los porcentajes de los diversos glicanos proporcionados en la presente solicitud no tienen en cuenta la O-glicosilación.

Preferentemente, la composición de FVII se caracteriza porque, entre todos los restos de glicano del FVII de la composición, al menos el 40 % son formas de glicano monosialiladas, biantenarias. En otra realización, las formas monosialiladas biantenarias están presentes al menos en un 50 %. En otra realización, las formas monosialiladas biantenarias están presentes al menos en un 60 %, preferentemente al menos un 65 %, preferentemente al menos un 70 %.

Ventajosamente, las formas de glicano monosialiladas, biantenarias, del FVII son mayoritarias. La composición del FVII se caracteriza porque al menos algunos de los ácidos siálicos del factor VII implican enlaces α 2-6.

Ventajosamente, al menos el 65 % de los ácidos siálicos del FVII implican enlaces α 2,6. De manera muy ventajosa, al menos el 70 %, incluso el 80 % y, en particular, al menos el 90 % de los ácidos siálicos del FVII implican enlaces α 2,6.

De manera particularmente preferida, todos los ácidos siálicos implican enlaces α 2,6, es decir, todos los ácidos siálicos están unidos a la galactosa mediante un enlace α 2,6. La composición de FVII descrita aquí puede comprender además ácidos siálicos con enlaces α 2-3.

Según realizaciones de la invención, del 65 % al 100 % de los ácidos siálicos del FVII implican enlaces α 2,6. Más preferiblemente, del 70 % o del 80 % al 100 % de los ácidos siálicos del FVII implican enlaces α 2,6.

Ventajosamente, entre las formas de glucano monosialilado biantenario de FVII, la mayoría de las formas de glicano no están fucosiladas.

Preferentemente, estas formas de glicano monosialilado biantenario no fucosilado están presentes en el FVII de la composición en una tasa superior al 20 %. Ventajosamente, esta tasa es superior al 25 %, o incluso superior al 40 %. De manera particularmente ventajosa, la tasa de fucosilación de la composición de FVII está comprendida entre el 20 % y el 50 %. En una realización, esta tasa puede ser inferior al 20 %.

En una realización particular, al menos el 10 %, preferentemente al menos el 15 %, preferentemente al menos el 20 %, preferentemente al menos el 25 % de las formas de N-glicano de los factores VII de la composición son altas en manosa/híbrido.

De forma preferida, el perfil de glicosilación descrito aquí proporciona al FVII una actividad biológica y estabilidad mejoradas. Las composiciones de factor VII que presentan un punto isoeléctrico sustancialmente homogéneo, facilitan la etapa de formular a un pH óptimo, preferentemente a un pH óptimo de $6,0 \pm 0,2$, evitando estas composiciones farmacéuticas la precipitación de FVII. En efecto, se sabe que en el punto isoeléctrico de una molécula tenderán a agregarse y precipitar. Las moléculas de factor VII utilizadas en la composición de la invención tienen un punto isoeléctrico comprendido entre 6,6 y 7,0. Esto da como resultado una mejor estabilidad de la composición de factor VII, particularmente cuando se formula a un pH inferior al punto isoeléctrico, y en particular a pH 6,0. La mejora de la estabilidad de la composición del factor VII permite evitar las interacciones electrostáticas responsables de los fenómenos de precipitación y agregación de tipo soluble e insoluble, así como evitar la pérdida de materias primas y por tanto una reducción del rendimiento, lo que da lugar a una pérdida de cantidad de principio activo y por tanto potencialmente a una pérdida de actividad.

En una realización preferida, el FVII transgénico es producido por el conejo en su leche, permitiendo obtener una composición en donde cada molécula de factor VII de la composición presenta dos sitios de N-glicosilación. Preferentemente, todas las moléculas de FVII de la composición, tienen un nivel de restos de glicano Gal α 1,3Gal inferior al 4 %, o incluso cero. Así, ventajosamente, el FVII transgénico producido por el conejo no posee un resto de

glicano Gal α 1,3Gal.

El FVII puede purificarse a partir de la leche mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un método para purificar una proteína de interés de la leche, tal como se describe en la patente US 6.268.487, puede comprender las siguientes etapas que consisten en: a) someter la leche a filtración tangencial sobre una membrana de porosidad suficiente para formar un retenido y un permeado, conteniendo el permeado la proteína exógena, b) someter el permeado a un dispositivo de captura por cromatografía de modo que se desplace la proteína exógena y se obtiene un efluente, c) combinar el efluente y el retenido, d) repetir las etapas a) a c) hasta que el FVII se separe de los lípidos, de las micelas de caseína, y se recupere el FVII.

Ventajosamente, el FVII de la invención se encuentra en forma activada. En una realización, el FVII puede activarse in vitro mediante los factores Xa, VIIa, IIa, IXa o Xlla. Típicamente, el FVII también puede activarse durante su proceso de purificación, en particular mediante el paso por columnas de cromatografía cargadas positivamente.

Anticuerpos multiespecíficos

Por "**anticuerpo multiespecífico**" se entiende cualquier anticuerpo que posee al menos dos sitios de unión específicos para al menos dos antígenos diferentes, o epítomos diferentes del mismo antígeno. El término "específico" significa que el anticuerpo tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, sustancialmente sin reacción cruzada con otro antígeno. De manera ventajosa, el anticuerpo presenta, con respecto a cada antígeno, una constante de afinidad K_d de al menos 10⁻⁶ M, preferentemente al menos 10⁻⁷ M, preferentemente al menos 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M, o 10⁻¹⁰ M.

Por tanto, los anticuerpos útiles en la invención tienen la capacidad de unirse específicamente tanto al factor de coagulación IX como al factor de coagulación X en forma activada o no activada. El anticuerpo usado en la invención, que posee la capacidad de unirse específicamente tanto al factor de coagulación IX como al factor de coagulación X, posee preferiblemente la capacidad de actuar como sustituto del factor VIII (FVIII), lo que significa que el anticuerpo promueve la activación del FX por FIXa.

Tales anticuerpos multiespecíficos, preferentemente biespecíficos, pueden obtenerse mediante diversos métodos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante conjugación química, o utilizando cuadromas, que resultan de la fusión entre dos hibridomas que producen dos anticuerpos monoclonales diferentes; o por recombinación genética.

Los polinucleótidos que codifican tales anticuerpos pueden insertarse así en vectores de expresión y expresarse en células u organismos huésped adaptados mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

Los anticuerpos útiles aquí pueden tener un formato muy simple, contruidos a partir de fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) de dos o más anticuerpos, asociados mediante un conector peptídico adecuado. Por "Fv" se entiende el fragmento de anticuerpo más pequeño que conserva las propiedades de reconocimiento y unión al antígeno. Un fragmento "Fv" es un dímero (dímero V_H + V_L) constituido por una región variable (V_H) portada por una cadena pesada (H) y una región variable (V_L) adyacente portada por una cadena ligera (L).

Alternativamente, se puede tratar de anticuerpos de longitud completa, que contienen preferentemente una región Fc. Son posibles varios formatos. Por ejemplo, en un primer formato, se fusionan fragmentos scFv de un anticuerpo A a los extremos (en general, N-terminales) de las cadenas pesadas de un anticuerpo B. El anticuerpo resultante tiene un único tipo de cadena pesada, que contiene los dominios V_H, CH1, CH2 y CH3 del anticuerpo B y los dominios V_H y V_L del anticuerpo A, y un único tipo de cadena ligera que contiene los dominios V_L y CL del anticuerpo B (Qu et al. Blood, 111, 2211-2219, 2008). En un segundo formato, la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo A están asociadas a la cadena pesada y a la cadena ligera de un anticuerpo B. En su caso, se pueden introducir mutaciones, por ejemplo, del tipo "botón en ojales" (Ridgway et al, Protein Eng, 9, 617-21, 1996; patente US 7.695.936) para evitar discrepancias.

A menos que se indique lo contrario, en la presente descripción, el término "Factor IX" se refiere indistintamente al Factor IX no activado o al Factor IX activado (FIXa).

A menos que se indique lo contrario, en la presente descripción, el término "Factor X" se refiere indistintamente al Factor X no activado o al Factor X activado (FXa).

Un anticuerpo que reconoce (i) FIX y/o FIXa, y (ii) FX y/o FXa se puede obtener principalmente según los métodos descritos en las solicitudes de patente WO2005/035756, WO2006/109592 o WO2012/067176.

En una realización preferida, dicho anticuerpo es emicizumab. La producción de este anticuerpo se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente WO2018047813 o la solicitud de patente EP1688488.

Composiciones farmacéuticas y posologías

El factor VII y los anticuerpos pueden formularse en forma de composiciones farmacéuticas separadas o combinarse dentro de la misma composición farmacéutica. En el caso de administración por separado, el FVII y los anticuerpos se pueden formular de una manera adecuada para la administración según vías diferentes o idénticas.

Así, el FVII se puede administrar, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular.

El anticuerpo también se puede administrar, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular.

Una composición de Factor VII puede ser, por ejemplo, tal como la descrita en la solicitud de patente WO2010/149907.

Así, en una realización ejemplar, la composición comprende:

- 5 - factor VII, preferentemente en forma de factor VIIa;
- arginina, eventualmente en forma de hidrocloreuro;
- isoleucina;
- lisina;
- glicina;
- 10 - citrato trisódico o cloruro de calcio;
- y, en su caso, polisorbato 80 o polisorbato 20.

Más particularmente, la composición puede comprender:

- factor VII, preferentemente en forma de factor VIIa;
- de 10 a 40 g/l de arginina, eventualmente en forma de hidrocloreuro;
- 15 - de 4,2 a 6,6 g/l de isoleucina;
- de 0,6 a 1,8 g/l de lisina;
- de 0,6 a 1,8 g/l de glicina;
- de 0 a 0,2 g/l de citrato trisódico o de 1 a 2 g/l de cloruro de calcio;
- y, en su caso, de 0 a 0,5 g/l de polisorbato 80.

20 La composición de FVII, que eventualmente también comprende al menos un anticuerpo multiespecífico como se describe aquí, se puede almacenar en forma líquida o en forma sólida, típicamente obtenida por desecación. Las concentraciones divulgadas aquí anteriormente se determinan con respecto a las composiciones en forma líquida, antes del secado o después de la reconstitución en forma de preparación inyectable.

25 La desecación es un proceso de eliminación de agua en una etapa avanzada. Se trata de una deshidratación cuyo objetivo es eliminar la mayor cantidad de agua posible. Este fenómeno puede ser natural o forzado. Esta desecación se puede realizar mediante las técnicas de liofilización, atomización y criatomización.

El método preferido de obtención de la forma sólida de la composición para uso farmacéutico aquí descrito es la liofilización.

30 Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de liofilización, véase, por ejemplo, [Wang et al, Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, International Journal of Pharmaceutics, Vol. 203, p. 1-60, 2000].

Son posibles otros procedimientos apropiados para reducir el grado de humedad o el contenido de agua de la composición. Preferentemente, el grado de humedad es inferior o igual al 3 % en peso, preferentemente inferior o igual al 2,5 %, preferentemente inferior o igual al 2 %, preferentemente inferior o igual al 1,5 %.

35 La composición sólida, preferentemente en forma liofilizada, se puede disolver en agua para las preparaciones inyectables (o "agua para inyección o WFI"), para obtener una formulación para uso terapéutico.

La formulación inyectable puede administrarse por vía parenteral (intravenosa, subcutánea, intramuscular), en una cantidad apreciada por el médico. No se excluye la administración de la forma líquida (antes de la desecación) o de la forma sólida, por cualquier vía y cualquier medio apropiados.

40 La dosificación de FVII útil en la invención se puede determinar de forma apropiada según el tipo de formulación, el método de administración, la edad y el peso del paciente, los síntomas del paciente, la gravedad de la enfermedad, etc.

La dosis de FVII a administrar según la invención puede elegirse ventajosamente entre 270 µg/kg y 2,70 µg/kg. Preferentemente, la dosis de FVII a administrar es inferior a 270 µg/kg de peso corporal, preferentemente es inferior

a 225 µg/kg de peso corporal, preferentemente es inferior a 180 µg/kg de peso corporal, preferentemente es inferior a 135 µg/kg de peso corporal, preferentemente es inferior a 90 µg/kg de peso corporal, preferentemente es inferior a 45 µg/kg de peso corporal, preferentemente es inferior a 9 µg/kg, preferentemente es inferior a 5,4 µg/kg, preferentemente es inferior a 2,7 µg/kg.

- 5 Una composición de anticuerpos multiespecíficos, tal como el anticuerpo emicizumab, es, por ejemplo, como las descritas en las solicitudes de patente WO2017/188356 y WO2018/047813.

Así, en una realización ejemplar, la composición es una composición líquida.

En una realización ejemplar, la composición comprende:

- anticuerpo biespecífico del factor IX y del factor X,
- 10 - un tensioactivo como poloxámero 188 o polisorbato 20
- tampón de histidina - ácido aspártico
- arginina

Más particularmente, la composición puede comprender:

- de 20 mg/mL a 180 mg/mL de anticuerpos biespecíficos del factor IX y del factor X,
- 15 - de 0,2 mg/mL a 1 mg/mL de poloxámero 188,
- tampón de histidina-ácido aspártico de 10 mM a 40 mM
- arginina de 100 mM a 300 mM,

a un pH comprendido entre 4,5 y 6,5

- 20 La dosificación de la composición de anticuerpo multiespecífico, tal como el anticuerpo emicizumab, útil en la invención, se puede determinar apropiadamente según el tipo de formulación, el método de administración, la edad y peso del paciente, los síntomas del paciente, la gravedad de la enfermedad., etc. La dosis de anticuerpo puede ser, por ejemplo, de 0,3 a 5 mg/kg, preferentemente como máximo 3 mg/kg una vez a la semana durante un periodo de iniciación, que puede durar, por ejemplo, 4 semanas, seguido de una dosis de mantenimiento, que es preferentemente más reducida, por ejemplo, 1,5 mg/kg una vez a la semana. Preferentemente, la dosis de anticuerpo administrada es
- 25 inferior a 5 mg/kg de peso corporal, preferentemente es inferior a 3 mg/kg de peso corporal, preferentemente es inferior a 1,5 mg/kg de peso corporal, preferentemente es inferior a 1 mg. /kg de peso corporal, preferentemente es inferior a 0,5 mg/kg de peso corporal, preferentemente es inferior a 0,1 mg/kg de peso corporal, preferentemente es inferior a 0,05 mg/kg de peso corporal.

- 30 La composición de anticuerpo útil en la invención se puede administrar a un paciente por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, transdérmica, subcutánea, intraarticular, sublingual, intrasinoval, oral o por inhalación. Preferentemente, se prefiere la vía intravenosa o la vía subcutánea.

Según una realización particular, el factor VII y el anticuerpo se administran simultáneamente al paciente.

Según otra realización particular, el factor VII y el anticuerpo se administran por separado a un paciente, preferentemente de forma secuencial.

35 *Indicaciones terapéuticas*

La combinación aquí descrita permite prevenir o tratar los trastornos de la coagulación, principalmente las hemofilias que presentan una deficiencia del factor VIII (hemofilia de tipo A, preferentemente hemofilia A adquirida).

Preferentemente, los pacientes son pacientes que presentan una hemofilia de tipo A, con anti-Factor VIII.

- 40 La combinación aquí descrita permite prevenir o tratar trastornos de la coagulación, principalmente deficiencias del factor VII.

La combinación aquí descrita permite asociar el efecto rápido del FVII que activa la vía extrínseca de la cascada de la coagulación y el efecto prolongado de los anticuerpos multiespecíficos aquí descritos que activan la vía intrínseca de la cascada de la coagulación. La combinación permite ofrecer una mejor atención a los pacientes.

Ejemplos:**Ejemplo 1: Purificación y extracción de FVII transgénico**

El procedimiento de purificación y extracción del factor VII implementado en este ejemplo es el descrito en la solicitud EP12305882. Las etapas de este procedimiento se describen a continuación. La leche de conejos transgénicos se obtiene a partir de la línea de conejos transgénicos. La leche de conejos transgénicos congelada se descongela y se concentra en forma de un combinado de leche de conejos transgénicos.

El combinado de leche de conejos transgénicos así obtenido se somete a continuación a una etapa de clarificación utilizando un filtro en profundidad que tiene una porosidad de 0,2 µm, con el fin de eliminar los lípidos y los compuestos insolubles. La leche así clarificada se somete luego a una etapa de inactivación viral mediante tratamiento con un disolvente de tipo detergente, por ejemplo, polisorbato 80 o fosfato de tri-n-butilo a 25 °C ± 2 °C durante al menos dos horas. Un tratamiento de este tipo permite inactivar eficazmente principalmente los virus y, en particular, los virus del tipo de virus sin cubierta. La leche clarificada y viralmente inactivada se somete luego a una etapa de cromatografía de afinidad utilizando un ligando de afinidad específico para el factor VII/factor VIIa. El eluato de factor VII obtenido al final de esta etapa de cromatografía se somete luego a una etapa de ultrafiltración y de formulación, lo que permite obtener un concentrado de factor VII intermedio que tiene una pureza del 95 %.

El concentrado de factor VII intermedio se somete luego a una etapa de filtración usando un filtro que tiene una porosidad de 0,1 µm a 0,2 µm seguido de una etapa de nanofiltración en filtros que tienen una porosidad de 20 nm y luego 15 nm. El producto así obtenido y que contiene el factor VII se somete luego a una etapa de cromatografía tipo gel Q Sepharose XL, luego a una etapa de cromatografía tipo CHT-I seguida de una cromatografía tipo SEC Superdex 200. Luego, el concentrado de factor VII así obtenido se somete a una etapa de estabilización y luego a una filtración sobre un filtro que tiene una porosidad de 0,2 µm.

El procedimiento así descrito permite obtener un concentrado de factor VII que tiene una pureza de aproximadamente el 99,9995 %.

Ejemplo 2: Comparación del potencial trombogénico de Novoseven®, Sevenfact® y Hemlibra®

Un experto en la técnica puede medir el potencial trombogénico de Novoseven®, Sevenfact® y Hemlibra® (también llamado Emicizumab) llevando a cabo el siguiente protocolo.

Reactivos:

- calibrador de trombina (Stago)
- reactivo PPP 5 pM (Stago)
- reactivo PPP bajo (Stago)
- CK-Prest (Stago)
- Fluo-tampón (Stago)
- Fluo-sustrato (Stago)
- Plasma deficiente en FVIII (Siemens)
- Sevenfact®/Factor VII transgénico producido en conejos 1 mg/ml (LFB)
- PNP (Crio pep)
- Novoseven® (NovoNordisk)
- Hemlibra®/Emicizumab (Roche / Genentech / Chugai)

Método:

La prueba de generación de trombina consiste en activar la coagulación ex vivo ya sea con una mezcla de factor tisular y fosfolípidos (TF/PL) o mediante el uso de cefalina y luego medir la concentración de trombina generada a lo largo del tiempo.

- Medición del potencial trombogénico de Novoseven® después de la inducción de la coagulación con TF/PL:

La prueba de generación de trombina se realiza en 80 µL de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita el plasma de hemofilia A en presencia de 20 µL de reactivo PPP (Stago) que contiene 0,5 pM de factor tisular (TF) y 4 µM de fosfolípidos (PL). La reacción se inicia mediante la adición de 20 µL de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el comienzo de la medición de la generación de trombina.

La dosis terapéutica de FVIIa es de 270 µg/kg, que corresponde a 6 µg/ml de FVIIa en plasma, suponiendo una recuperación del 100 %. La prueba de generación de trombina se realiza con dosis de Novoseven® de 0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL y 6 µg/mL, en presencia de TF 0,5 pM / PL 2 µM (inductor de la coagulación).

- 5 • Medición del potencial trombogénico de Novoseven® después de la inducción de la coagulación con cefalina:

La prueba de generación de trombina se realiza en 80 µL de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita el plasma de hemofilia A en presencia de 20 µL de cefalina (CK-Prest reconstituido con 5 mL de H₂O destilada).

La reacción se inicia mediante la adición de 20 µL de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el comienzo de la medición de la generación de trombina.

- 10 La prueba de generación de trombina se realiza con dosis de Novoseven® de 0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL y 6 µg/mL, en presencia de 20 µL de cefalina (inductor de la coagulación).

- Medición del potencial trombogénico de Sevenfact® después de la inducción de la coagulación con TF/PL:

La prueba de generación de trombina se lleva a cabo en 80 µL de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita el plasma de hemofilia A en presencia de 20 µL de reactivo PPP (Stago) que contiene 0,5 pM de factor tisular (TF) y 4 µM de fosfolípidos (PL).

- 15 La reacción se inicia mediante la adición de 20 µL de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el comienzo de la medición de la generación de trombina.

La prueba de generación de trombina se realiza con dosis de Sevenfact® de 0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL y 6 µg/mL, en presencia de TF 0,5 pM / PL 2 µM (inductor de la coagulación).

- 20 • Medición del potencial trombogénico de Sevenfact® después de la inducción de la coagulación con cefalina:

La prueba de generación de trombina se lleva a cabo en 80 µL de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita el plasma de hemofilia A en presencia de 20 µL de cefalina (CK-Prest reconstituido con 5 mL de H₂O destilada).

La reacción se inicia mediante la adición de 20 µL de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el comienzo de la medición de la generación de trombina.

- 25 La prueba de generación de trombina se realiza con dosis de Sevenfact® de 0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL y 6 µg/mL, en presencia de 20 µL de cefalina.

- Medición del potencial trombogénico de Hemlibra® después de la inducción de la coagulación con TF/PL:

La prueba de generación de trombina se lleva a cabo en 80 µL de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita el plasma de hemofilia A en presencia de 20 µL de reactivo PPP (Stago) que contiene 0,5 pM de factor tisular (TF) y 4 µM de fosfolípidos (PL).

- 30 La reacción se inicia mediante la adición de 20 µL de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el comienzo de la medición de la generación de trombina.

Hemlibra® (Roche / Genentech / Chugai, EE. UU.), un anticuerpo biespecífico que imita la función del FVIII, se utiliza en una concentración máxima de 50 µg/mL que es la concentración detectada en el paciente bajo tratamiento (Oldenburg et al. NEJM, 2017). La prueba de generación de trombina se realiza con dosis de Hemlibra® de 0 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL y 50 µg/mL, en presencia de TF 0,5 pM / PL 4 µM (inductor de la coagulación).

- 35 • Medición del potencial trombogénico de Hemlibra® después de la inducción de la coagulación con cefalina

La prueba de generación de trombina se lleva a cabo en 80 µL de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita el plasma de hemofilia A en presencia de 20 µL de cefalina (CK-Prest reconstituido con 5 mL de H₂O destilada).

- 40 La reacción se inicia mediante la adición de 20 µL de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el comienzo de la medición de la generación de trombina.

La prueba de generación de trombina se realiza con dosis de Hemlibra® de 0 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL y 50 µg/mL, en presencia de 20 µL de cefalina.

- 45 Para todas estas pruebas, la aparición de fluorescencia se mide en un fluorímetro Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) a una longitud de onda de excitación de 390 nm y a una longitud de emisión de 460 nm. Luego, los trombinogramas (curvas que representan la intensidad de la fluorescencia a lo largo del tiempo) se analizan utilizando el software Thrombinoscope™, que convierte el valor de fluorescencia en nM de trombina mediante un cálculo comparativo.

Se realiza la generación de trombina y se registran y comparan variables clave para evaluar la potencia de diferentes medicamentos: potencial de trombina endógena (ETP), altura del pico, tiempo de latencia y velocidad.

Ejemplo 3: Evaluación de los potenciales trombogénicos sinérgicos de Novoseven® y Hemlibra® o SevenFact® y Hemlibra®

- 5 El experto en la técnica puede medir el potencial trombogénico de las combinaciones de Novoseven®/Hemlibra® y Sevenfact®/Hemlibra® realizando el siguiente protocolo.

Reactivos:

Los reactivos, el sistema de automatización y el protocolo experimental en plasma deficiente en FVIII son idénticos a los descritos en el Ejemplo 2.

Método:

- Medición del potencial trombogénico de la combinación Novoseven® + Hemlibra® después de la inducción de la coagulación con TF/PL:

- 15 La prueba de generación de trombina se lleva a cabo en 80 µL de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita el plasma de hemofilia A en presencia de 20 µL de reactivo PPP (Stago) que contiene 0,5 pM de factor tisular (TF) y 4 µM de fosfolípidos (PL).

La reacción se inicia mediante la adición de 20 µL de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el comienzo de la medición de la generación de trombina.

- 20 La prueba de generación de trombina se lleva a cabo en presencia de TF 0,5 pM / PL 4 µM (inductor de la coagulación) en varias combinaciones de Novoseven®/Hemlibra®. La composición que contiene la mayor cantidad de producto está constituida por 6 µg/mL de Novoseven® y 50 µg/mL de Hemlibra®, como máximo.

El potencial trombogénico obtenido en presencia de la combinación de productos se compara con el potencial de los productos individuales. Para considerar un efecto sinérgico de la combinación de productos, se evalúan dosis más bajas para asegurarse de no saturar la detección de la trombina.

Las composiciones ensayadas contienen:

Combinación	Hemlibra® (µg/mL)	NovoSeven® (µg/mL)
Combinación 1	50	6
Combinación 2	50	5
Combinación 3	40	4
Combinación 4	30	3
Combinación 5	20	2
Combinación 6	10	1

- 25
- Medición del potencial trombogénico de la combinación Novoseven® + Hemlibra® después de la inducción de la coagulación con cefalina

La prueba de generación de trombina se lleva a cabo en 80 µL de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita el plasma de hemofilia A en presencia de 20 µL de cefalina (CK-Prest reconstituido con 5 mL de H₂O destilada).

- 30 La reacción se inicia mediante la adición de 20 µL de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el comienzo de la medición de la generación de trombina.

La prueba de generación de trombina se realiza en presencia de 20 µL de cefalina en varias combinaciones de Novoseven®/Hemlibra®. La composición que contiene la mayor cantidad de producto está constituida por 6 µg/mL de Novoseven® y 50 µg/mL de Hemlibra®, como máximo.

- 35 El potencial trombogénico obtenido en presencia de la combinación de productos se compara con el potencial de los productos individuales. Para considerar un efecto sinérgico de la combinación de productos, se evalúan dosis más bajas para asegurarse de no saturar la detección de la trombina.

Las composiciones ensayadas contienen:

Combinación	Hemlibra® (µg/mL)	NovoSeven® (µg/mL)
Combinación 1	50	6
Combinación 2	50	5
Combinación 3	40	4
Combinación 4	30	3
Combinación 5	20	2
Combinación 6	10	1

- Medición del potencial trombogénico de la combinación Sevenfact® + Hemlibra® después de la inducción de la coagulación con TF/PL

- 5 La prueba de generación de trombina se lleva a cabo en 80 µL de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita el plasma de hemofilia A en presencia de 20 µL de reactivo PPP (Stago) que contiene 0,5 pM de factor tisular (TF) y 4 µM de fosfolípidos (PL).

La reacción se inicia mediante la adición de 20 µL de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el comienzo de la medición de la generación de trombina.

- 10 La prueba de generación de trombina se lleva a cabo en presencia de TF 0,5 pM / PL 4 µM (inductor de la coagulación) en varias combinaciones de Sevenfact®/Hemlibra®. La composición que contiene la mayor cantidad de producto está constituida por 6 µg/mL de Sevenfact® y 50 µg/mL de Hemlibra®, como máximo.

El potencial trombogénico obtenido en presencia de la combinación de productos se compara con el potencial de los productos individuales. Para considerar un efecto sinérgico de la combinación de productos, se evalúan dosis más bajas para asegurarse de no saturar la detección de la trombina.

15

Las composiciones ensayadas contienen:

Combinación	Hemlibra® (µg/mL)	Sevenfact® (µg/mL)
Combinación 1	50	6
Combinación 2	50	5
Combinación 3	40	4
Combinación 4	30	3
Combinación 4	20	2
Combinación 6	10	1

- Medición del potencial trombogénico de la combinación Sevenfact® + Hemlibra® después de la inducción de la coagulación con cefalina

- 20 La prueba de generación de trombina se lleva a cabo en 80 µL de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita el plasma de hemofilia A en presencia de 20 µL de cefalina (CK-Prest reconstituido con 5 mL de H₂O destilada).

La reacción se inicia mediante la adición de 20 µL de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el comienzo de la medición de la generación de trombina.

- 25 La prueba de generación de trombina se realiza en presencia de 20 µL de cefalina en varias combinaciones de Sevenfact®/Hemlibra®. La composición que contiene la mayor cantidad de producto está constituida por 6 µg/mL de Sevenfact® y 50 µg/mL de Hemlibra®, como máximo.

El potencial trombogénico obtenido en presencia de la combinación de productos se compara con el potencial de los productos individuales. Para considerar un efecto sinérgico de la combinación de productos, se evalúan dosis más bajas para asegurarse de no saturar la detección de la trombina.

30

Las composiciones ensayadas contienen:

Combinación	Hemlibra® (µg/mL)	Sevenfact® (µg/mL)
Combinación 1	50	6
Combinación 2	50	5
Combinación 3	40	4
Combinación 4	30	3
Combinación 5	20	2
Combinación 6	10	1

Para todas estas pruebas, la aparición de fluorescencia se mide en un fluorímetro Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) a una longitud de onda de excitación de 390 nm y a una longitud de emisión de 460 nm. Luego, los trombobinogramas (curvas que representan la intensidad de la fluorescencia a lo largo del tiempo) se analizan utilizando el software Thrombinoscope™, que convierte el valor de fluorescencia en nM de trombina mediante un cálculo comparativo.

Se considera, por ejemplo, un efecto sinérgico cuando al menos uno de los parámetros calculados a partir de la prueba de generación de trombina para una combinación dada es superior a la suma de cada uno de estos parámetros obtenidos con los componentes solos, descontando el ruido de fondo del experimento.

Ejemplo 4: Comparación del potencial de Sevenfact™, de Hemlibra® y de la combinación de los dos en plasma de hemofilia A:

Reactivos:

- calibrador de trombina (Stago)
- reactivo PRP 1pM TF (Stago)
- reactivo MP 4 µM PL (Stago)
- Fluo-tampón (Stago)
- Fluo-sustrato (Stago)
- Sevenfact™: Factor VII transgénico producido en conejos 1 mg/mL (LFB)
- Hemlibra®: Emicizumab (Roche / Genentech / Chugai)
- Plasma de hemofilia A (Cryopep)
- Owen Koller (Stago)

Método:

La prueba de generación de trombina consiste en activar la coagulación *ex vivo*, por ejemplo, con una mezcla de factor tisular y fosfolípidos (TF/PL), midiendo luego la concentración de trombina generada con el tiempo. Las pruebas de generación de trombina se realizan con 80 µL de plasma de hemofilia A (Cryopep), en presencia de 20 µL de una mezcla de reactivos PRP y MP (Stago) que contiene 0,5 pM de factor tisular y 4 µM de fosfolípidos.

La reacción se inicia mediante la adición de 20 µL de Fluca-kit (sustrato Fluo + CaCl₂), que corresponde al punto de partida para medir la generación de trombina (TG).

La fluorescencia se mide por fluorimetría usando el aparato Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) a una longitud de onda de excitación de 390 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Los trombobinogramas se analizan utilizando el software Thrombinoscope™ que convierte mediante cálculo comparativo la intensidad de fluorescencia en concentración molar de trombina (nM).

Para medir el potencial trombogénico de las dos moléculas, se estudian varios plasmas de hemofilia A. La dosis terapéutica más elevada de FVIIa es 270 µg/kg, que corresponde a 6 µg/ml de FVIIa (o 120 nM) en el plasma. El uso de esta dosis puede considerarse el potencial máximo para la generación de trombina. Según las concentraciones del producto circulante obtenidas en pacientes, también se estudian las concentraciones de Sevenfact™ comprendidas entre 20 y 100 nM. Hemlibra® (Roche / Genentech / Chugai, EE. UU.), un anticuerpo biespecífico que imita la función del FVIII, se utiliza en una concentración máxima de 120 µg/mL. La concentración detectada actualmente en pacientes

bajo tratamiento es de 50 µg/mL (o 300 nM) (Oldenburg et al. NEJM, 2017). Así, Hemlibra® se utiliza aquí a aproximadamente 300 nM (50 µg/mL). Las variables estudiadas para medir el potencial trombogénico de Hemlibra®, de Sevenfact™ son:

- el potencial de trombina endógena (PTE): área bajo la curva que representa la cantidad total de trombina generada,
- altura del pico: concentración máxima de trombina medida, y
- velocidad de generación de trombina: velocidad de formación de trombina.

2 - Resultados

2.1 - Efecto de Sevenfact™ o Hemlibra® sobre plasmas de Hemofilia A

2.1.1 - Evaluación en el lote 1 de plasma de Hemofilia A

En esta matriz se obtienen señales de generación de trombina muy débiles de provenientes de ambos compuestos, independientemente de las concentraciones utilizadas. En efecto, la generación de trombina observada es casi nula para Hemlibra® y Sevenfact™ a concentraciones de 20 y 40 nM. Con 100 nM de Sevenfact™, se observa un pico de generación de trombina muy débil (Tabla 1).

	Sevenfact™ 20nM	Sevenfact™ 40nM	Sevenfact™ 100nM	Hemlibra® 300nM
PTE (nM.min)	125	154,25	128,75	128,25
Pico (nM)	7,105	9,46	16,55	6,41
Velocidad (nM/min)	0,59	0,84	1,64	0,42

Tabla 1: Parámetros de generación de trombina a partir del lote 1 de plasma de Hemofilia A tratado con Sevenfact™ o Hemlibra®

Así, cada molécula utilizada individualmente induce sólo una generación muy débil de trombina.

2.1.2 - Evaluación en el lote 2 de plasma de Hemofilia A

Se analizó un segundo lote de plasma de Hemofilia A. Nuevamente, se observa una generación de trombina muy débil con el uso de Hemlibra® y Sevenfact™, con un pico máximo de generación de trombina a una concentración de 100 nM de Sevenfact™ (Tabla 2).

	Sevenfact™ 20 nM	Sevenfact™ 40 nM	Sevenfact™ 100 nM	Hemlibra® 300 nM
PTE (nM.min)	221,25	280,75	414,25	196
Pico (nM)	9,93	12,84	21,04	8,895
Velocidad (nM/min)	0,7	0,96	1,75	0,51

Tabla 2: Parámetros de generación de trombina a partir del lote 2 de plasma de Hemofilia A tratado con Sevenfact™ o Hemlibra®

En esta matriz, Sevenfact™ y Hemlibra® utilizados por separado tienen un potencial trombogénico débil.

Ejemplo 5: Evaluación del potencial trombogénico sinérgico de la combinación Sevenfact™ + Hemlibra®

1 - Protocolo

Los reactivos, el dispositivo automático y el protocolo experimental en plasma de hemofilia A son idénticos a los descritos en el Ejemplo 2.

2 - Resultados

Como se ve en el ejemplo 2, Sevenfact™ y Hemlibra® utilizados individualmente inducen una baja generación de trombina en los plasmas de Hemofilia A. Aquí, se estudia el efecto sinérgico de la combinación Sevenfact™ y Hemlibra®. Se estudian tres concentraciones de Sevenfact™ (20 nM, 40 nM y 100 nM) en presencia de una concentración de Hemlibra® de 300 nM. Se tiene en cuenta un efecto sinérgico si el efecto de la combinación Sevenfact™ + Hemlibra® es al menos 2 veces superior al de la suma de los efectos de Sevenfact™ y Hemlibra® tomado por separado para al menos uno de los parámetros de la prueba de generación de trombina (PTE, pico de generación de trombina y velocidad).

2.1 - Efecto de Sevenfact™ y Hemlibra® en plasmas de Hemofilia A después de la inducción de la coagulación con TF / PL**2.1.1 - Evaluación en el lote 1 de plasma de hemofilia A**

5 Los resultados se presentan en la tabla 3 y la Figura 1. A una concentración muy baja de Sevenfact™ de 20 nM, las relaciones para el PTE (figura 1A), para el pico de trombina (figura 1B) y para la velocidad (figura 1C) de la combinación Sevenfact™ + Hemlibra® son 2,14, 2,95 y 4,19 respectivamente. Por tanto, incluso a la concentración más baja probada, se observa un efecto trombogénico sinérgico.

10 A una concentración de 40 nM, para todos los parámetros probados la relación es superior a 2. La relación obtenida para el PTE es 2,75 (figura 1A), la relación obtenida para el pico de trombina es 3,96 (figura 1B) y la obtenida para la velocidad alcanzó un valor de 6,21 (figura 1C). En otras palabras, la velocidad de formación de trombina se multiplica por 6 cuando Sevenfact™ y Hemlibra® se utilizan en combinación.

15 A una concentración de 100 nM de Sevenfact™ el efecto sinérgico es el más importante. A una concentración de 100 nM, para todos los parámetros probados la relación es superior a 2. La relación obtenida para el PTE es 4,00 (figura 1A) y la relación para el pico de trombina es 4,81 (figura 1B), lo que significa que la concentración máxima de trombina generada es casi 5 veces mayor cuando Hemlibra® y Sevenfact™ se utilizan en combinación. La relación de velocidad correspondiente es 9,58 (figura 1C), lo que significa que la trombina se genera casi 10 veces más rápido cuando Sevenfact™ y Hemlibra® se utilizan en combinación.

Combinaciones					Ratios de combinación/suma				
PTE Sevenfact™ 20 nM+ PTE Hemilbra® 300nM	PTE Sevenfact™ 40nM+ PTE Hemilbra® 300nM	PTE 100 nM Sevenfact™ + PTE 300nM Hemilbra®	PTE (Sevenfact™ 20 nM + Hemilbra® 300nM)	PTE (Sevenfact™ 40 nM + Hemilbra® 300nM)	PTE (Sevenfact™ 100 nM + Hemilbra® 300nM)	Sevenfact™ nM	Sevenfact™ 20 nM	Sevenfact™ 40 nM	Sevenfact™ 100 nM
253,25	282,50	257	543	777,50	1029	2,14	2,75		4,00
Combinaciones					Ratios de combinación/suma				
Pico Sevenfact™ 20 nM + Pico Hemilbra® 300 nM	Pico Sevenfact™ 40 nM + Pico Hemilbra® 300 nM	Pico Sevenfact™ 100 nM+ Pico Hemilbra® 300 nM	Pico (Sevenfact™ 20 nM + Hemilbra® 300nM®)	Pico (Sevenfact™ 40 nM + Hemilbra® 300nM®)	Pico (Sevenfact™ 100 nM + Hemilbra® 300nM®)	Sevenfact™ nM	Sevenfact™ 20 nM	Sevenfact™ 40 nM	Sevenfact™ 100 nM
13,515	15,87	22,965	39,915	62,9	110,565	2,95	3,96		4,81
Combinaciones					Ratios de combinación/suma				
Velocidad Sevenfact™ 20 nM + Velocidad Hemilbra® 300nM	Velocidad Sevenfact™ 40 nM + Velocidad Hemilbra® 300nM	Velocidad Sevenfact™ 100 nM + Velocidad Hemilbra® 300nM)	Velocidad (Sevenfact™ 20 nM + Hemilbra® 300nM)	Velocidad (Sevenfact™ 40 nM + Hemilbra® 300nM)	Velocidad (Sevenfact™ 100 nM + Hemilbra® 300nM)	Sevenfact™ nM	Sevenfact™ 20 nM	Sevenfact™ 40 nM	Sevenfact™ 100 nM
1,01	1,42	2,06	4,24	7,86	19,78	4,19	6,21		9,58

Tabla 3: Parámetros de generación de trombina a partir del lote 1 de plasma de Hemofilia A tratado con la combinación Sevenfact™ + Hemilbra®

En conclusión, para todas las concentraciones de Sevenfact™ probadas, Sevenfact™ y Hemlibra® utilizados en combinación tienen un efecto sinérgico sobre la generación de trombina.

2.1.2 - Evaluación en el lote 2 de plasma de Hemofilia A

5 Los resultados se presentan en la tabla 4 y la Figura 2. A una concentración muy baja de Sevenfact™ de 20 nM, se obtiene una relación de 2,21 para el parámetro PTE (figura 2A), se obtiene una relación de 2,34 para el pico de trombina (figura 2B), y se obtiene una relación de 2,9 para el parámetro de velocidad (figura 2C) de la combinación Sevenfact™ + Hemlibra®. Entonces, incluso con la concentración más baja probada de Sevenfact™, se observa un efecto trombogénico sinérgico.

10 A una concentración de 40 nM, la relación correspondiente al PTE es 2,29 (figura 2A), la correspondiente al pico de trombina es 2,79 (figura 2B) y la relación correspondiente a la velocidad es 3,68 (figura 2C), lo que significa que el uso de Sevenfact™ en combinación con Hemlibra® permite la formación de trombina aproximadamente 4 veces más rápido.

15 Con una concentración de 100 nM de Sevenfact™ el efecto sinérgico es el más importante. A una concentración de 100 nM, la relación correspondiente al pico de generación de trombina es 3,41 (figura 2B) y la correspondiente a la velocidad es 5,63 (figura 2C), lo que significa que la trombina se genera casi 6 veces más rápido y que la concentración de trombina alcanzada se multiplica casi por 4 cuando Sevenfact™ se utiliza en combinación con Hemlibra®.

Combinaciones					Ratios de combinación/suma				
PTE 20 nM Sevenfact™ + PTE Hemibra® 300nM	PTE Siefact™ 40nM + PTE Hemibra® 300nM	PTE Sevenfact™ 100 nM + PTE Hemibra® 300nM	PTE (Sevenfact™ 20 nM + Hemibra® 300nM)	PTE (Sevenfact™ 40 nM + Hemibra® 300nM)	PTE (Sevenfact™ 100 nM + Hemibra® 300nM)	Sevenfact™ 20 nM™	Sevenfact™ 40 nM™	Sevenfact™ 100 nM™	
417,25	476,75	610,25	920,75	1091,25	1275,50	2,21	2,29	2,09	
Combinaciones					Ratios de combinación/suma				
Pico Sevenfact™ 20 nM + Pico Hemibra® 300nM	Pico Sevenfact™ 40 nM + Pico Hemibra® 300nM	Pico Sevenfact™ 100 nM + Pico Hemibra® 300nM	Pico (Sevenfact™ 20 nM + Hemibra® 300nM)	Pico (Sevenfact™ 40 nM + Hemibra® 300nM)	Pico (Sevenfact™ 100 nM + Hemibra® 300nM)	Sevenfact™ 20 nM™	Sevenfact™ 40 nM™	Sevenfact™ 100 nM™	
18,825	21,735	29,935	43,96	60,745	101,975	2,34	2,79	3,41	
Combinaciones					Ratios de combinación/suma				
Velocidad Sevenfact™ 20 nM + Velocidad Hemibra® 300nM	Velocidad Sevenfact™ 40 nM + Velocidad Hemibra® 300nM	Velocidad Sevenfact™ 100 nM + PTE Hemibra® 300nM	Velocidad (Sevenfact™ 20 nM + Hemibra® 300nM)	Velocidad (Sevenfact™ 40 nM + Hemibra® 300nM)	Velocidad (Sevenfact™ 100 nM + Hemibra® 300nM)	Sevenfact™ 20 nM™	Sevenfact™ 40 nM™	Sevenfact™ 100 nM™	
1,21	1,48	2,27	3,52	5,44	12,77	2,9	3,68	5,63	

Tabla 4: Parámetros de generación de trombina del lote 2 de plasma de Hemofilia tratado con la combinación Sevenfact™ + Hemilbra®

En conclusión, para todas las concentraciones de Sevenfact™ probadas, Sevenfact™ y Hemlibra® utilizados en combinación tienen un efecto sinérgico sobre la generación de trombina.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende:
 - a. Factor VII transgénico, y
 - b. un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X.
- 5 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicho factor VII transgénico es un factor VII humano derivado de la producción por células epiteliales de las glándulas mamarias de un mamífero no humano transgénico.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que dicho mamífero transgénico es un conejo.
4. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el anticuerpo es emicizumab.
- 10 5. Producto de combinación que comprende:
 - a. Factor VII transgénico, y
 - b. un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X, para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno de la coagulación en un paciente.
6. Producto de combinación para su uso según la reivindicación 5, en el tratamiento de la hemofilia A.
- 15 7. Producto de combinación para su uso según una de las reivindicaciones 5 o 6, en el tratamiento de la hemofilia A con inhibidores del factor VIII.
8. Producto de combinación para su uso según las reivindicaciones 5 a 7, estando dicho producto de combinación en forma de una composición farmacéutica tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 9. Producto de combinación para su uso según las reivindicaciones 5 a 8, estando dicho factor VIIa y dicho anticuerpo en una forma adecuada para la administración simultánea al paciente.
10. Producto de combinación para su uso según las reivindicaciones 5 a 8, estando dicho factor VIIa y dicho anticuerpo en formas adecuadas para una administración de forma separada a dicho paciente.
11. Kit que comprende
 - Un recipiente que contiene un Factor FVII transgénico; y
 - Otro recipiente que contiene un anticuerpo dirigido contra el factor IX y el factor X.

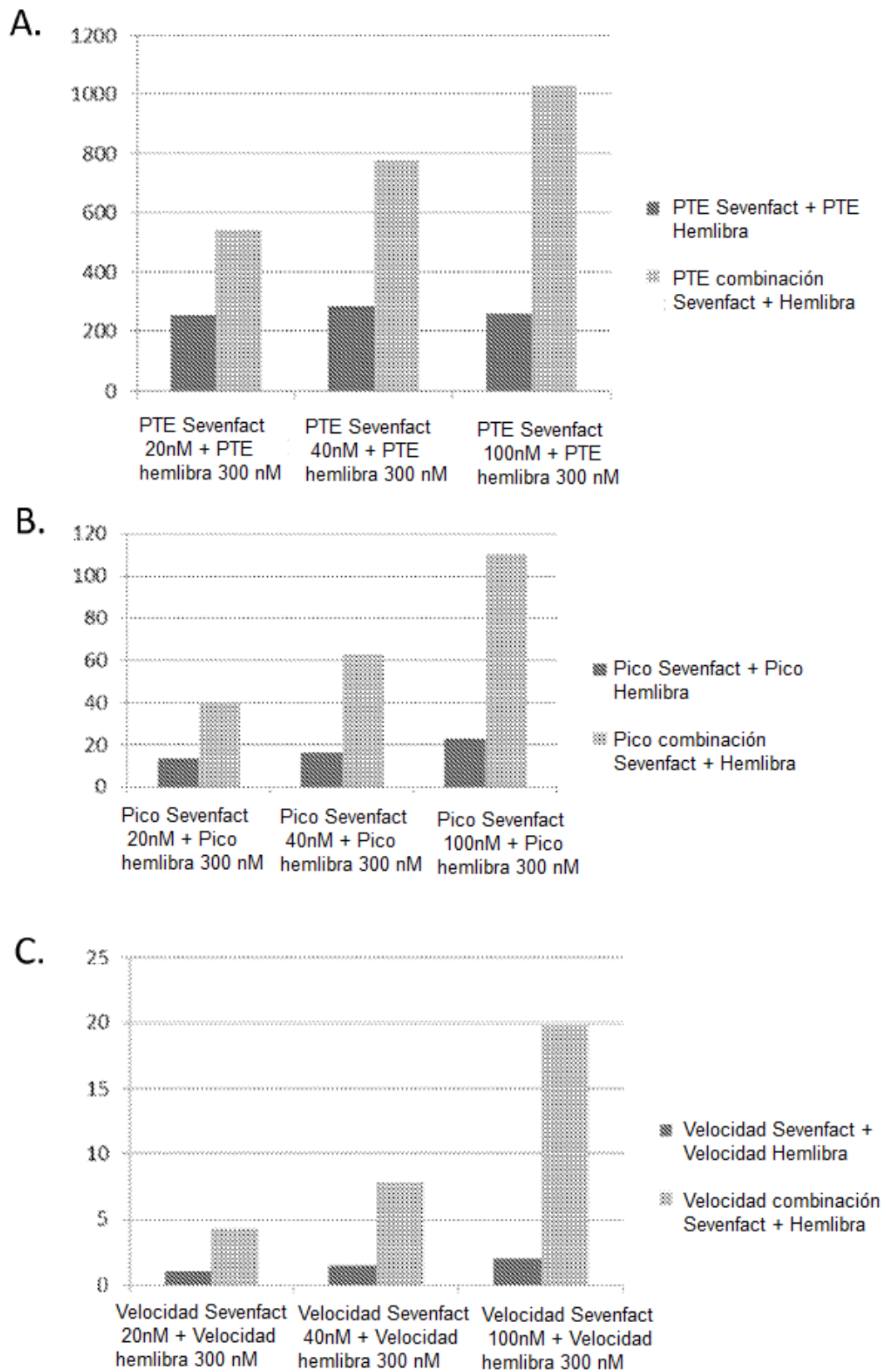


FIGURA 1

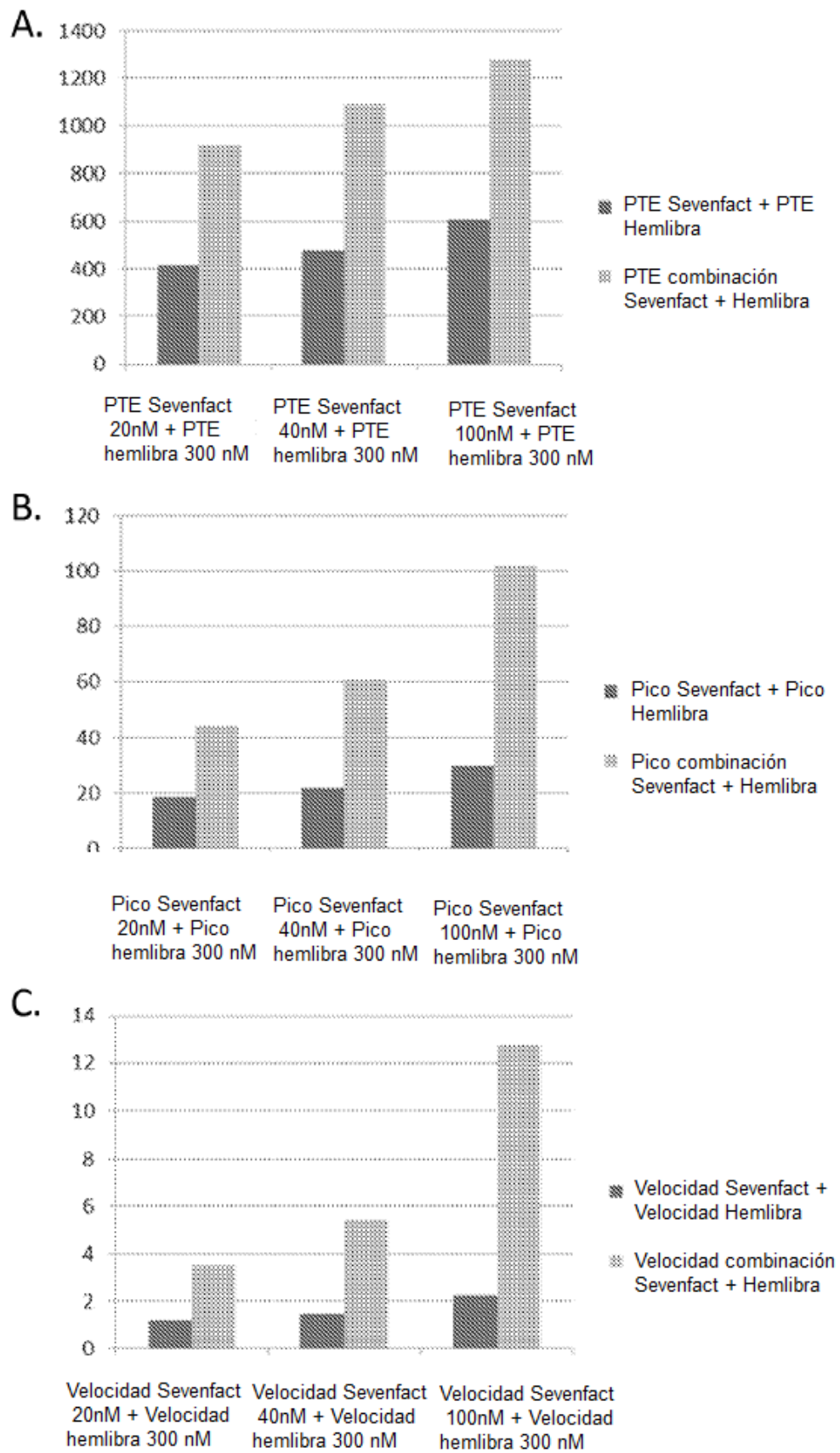


FIGURA 2