



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 010 346**

⑯ Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)
A61K 38/24 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2013 E 20204439 (2)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024 EP 3791890**

⑮ Título: **Factores de coagulación de acción prolongada y usos de los mismos**

⑯ Prioridad:

14.02.2012 US 201213372540

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2025

⑯ Titular/es:

OPKO BIOLOGICS LTD. (100.00%)
16 Ashlegan Street
Kiryat Gat, 8211804, IL

⑯ Inventor/es:

**FIMA, UDI EYAL y
HART, GILI**

⑯ Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 010 346 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

Factores de coagulación de acción prolongada y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a los usos médicos de los polipéptidos que comprenden un péptido del carboxilo terminal (CTP) de la gonadotropina coriónica unido al carboxilo terminal de un factor de coagulación.

10

Antecedentes de la invención

El desarrollo de la terapia de reemplazo con factores de coagulación ha transformado las vidas de muchos individuos con hemofilia. La hemofilia es un grupo de trastornos genéticos hereditarios que deteriora la capacidad del cuerpo para controlar la formación de coágulos o coagulación de la sangre. Los pacientes con hemofilia no producen cantidades adecuadas de proteínas del Factor VIII o el Factor IX, que son necesarias para una eficaz coagulación de la sangre. En los pacientes hemofílicos graves incluso una lesión pequeña puede dar como resultado una pérdida de sangre que se prolonga durante días o semanas, y puede no ocurrir la curación completa, lo que conduce a un posible daño permanente y debilitante de las articulaciones y otros órganos, y a la muerte prematura.

Un tipo de hemofilia, la hemofilia B, es un trastorno hemorrágico unido al cromosoma X provocado por una mutación en el gen del Factor IX (FIX), que resulta en una deficiencia de la actividad procoagulante del FIX. Los pacientes con hemofilia B tienen hemorragias espontáneas en el tejido blando y hemartrosis recurrentes que frecuentemente conducen a una artropía paralizante. El tratamiento actual para estos pacientes incluye una administración intravenosa del FIX recombinante. Sin embargo, los aspectos de costo y aclaramiento relativamente rápido del FIX de la circulación hacen que el desarrollo de un FIX de acción prolongada sea una tarea desafiante.

30

La disponibilidad comercial del FVIII y el FIX ha conducido a un mejor control de los episodios de hemorragias con peligro para la vida. Muchos pacientes reciben terapia profiláctica, que reduce el riesgo de hemorragia y sus complicaciones asociadas. Sin embargo, una proporción significativa de pacientes (10-30 %) desarrollan anticuerpos inhibitorios contra FVIII y FIX administrados de manera exógena. La administración del FVIIa, que es un producto de derivación, puede inducir homeostasis y proporcionar un tratamiento eficaz para los pacientes con Ac inhibitorios.

El FVIIa recombinante (NovoSeven®) está disponible comercialmente y se aprobó en 1996 para el tratamiento de episodios de hemorragia en los pacientes de hemofilia con inhibidores. Sin embargo, el rFVIIa se aclara rápidamente con un tiempo de vida media terminal de 2,5 horas. Como resultado, los pacientes generalmente requieren infusiones múltiples y frecuentes (2-3 dosis administradas en intervalos de 2-3 horas) para lograr la homeostasis adecuada después de un sangrado ligero a moderado. En consecuencia, existe mucho interés en el desarrollo de una forma de acción prolongada del FVIIa que prolongaría la duración de la actividad hemostática después de una dosis única y permitiría una dosificación mucho menos frecuente. Un FVIIa de acción prolongada aumentaría, además, la factibilidad de una terapia profiláctica a largo plazo.

45

Actualmente se desarrollan diversas tecnologías para prolongar el tiempo de vida media del FVIIa. Sin embargo, el reto es lograr una prolongación del tiempo de vida media de esta proteína a la vez que se conserve su actividad biológica y asegurar que las modificaciones no induzcan una inmunogenicidad significativa.

50

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un factor de coagulación modificado con el péptido del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP), que consiste en un factor de coagulación y tres CTP unidos al carboxilo terminal del factor de coagulación y en donde el factor de coagulación modificado con CTP es: a. un polipéptido del factor IX (FIX) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31 o de los aminoácidos 47-545 de la sec. con núm. de ident.: 31; b. un polipéptido del factor VII (FVII) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 25 o de los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25; o c. un polipéptido de Factor VII activado (FVIIa) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 39-528 de 25; para su uso en el tratamiento de la hemofilia A en un sujeto humano.

En una realización, al menos una de las CTP unidas está glicosilada.

65

En una realización, un CTP está unido al factor de coagulación a través de un enlazador.

En una realización, el enlazador es un enlace peptídico.

En una realización, durante la activación, el polipéptido FVII se escinde en R152 dando lugar a dominios de cadena pesada y ligera que se mantienen unidos por un único puente disulfuro.

5 En una realización, los dominios de cadena pesada y ligera se separan y migran como bandas separadas de pesos moleculares 55 kDa y 25 kDa.

10 En una realización, el factor de coagulación modificado con CTP se administra al sujeto en forma de una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la administración es una vez a la semana.

15 En una realización, el factor de coagulación modificado con CTP se administra por vía subcutánea o intravenosa.

En una realización, el sujeto es un sujeto hemofílico o un sujeto que padece una deficiencia de vitamina K o una enfermedad hepática.

20 En una realización, el sujeto es un niño.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, ejemplos y figuras. Debe comprenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención se proporcionan a manera de ilustración 25 solamente, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

30 Figura 1A. Presenta un gráfico de barras que muestra las células de cosechas limitadas, diluidas, transfectadas y seleccionadas con variantes de FIX-CTP y FIX-CTP-CTP en presencia de vitamina K3 a 5 µg/ml. El nivel de FIX se cuantificó mediante el uso del estuche de ELISA para el FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. núm. FIX-AG RUO), y la concentración de proteínas calculada (µg/ml) es el promedio de dos ejecuciones independientes. La Figura 1B muestra fotomicrografías de un gel de SDS-PAGE del 35 reconocimiento con Ac para FIX; la fotomicrografía A representa el reconocimiento de un anticuerpo anti-FIX en una transferencia Western; la fotomicrografía B representa el reconocimiento de un anticuerpo anti-y carboxilación en una transferencia Western. El carril 1 en A-B se cargó con una muestra que contenía FIX recombinante, el carril 2 en A-B se cargó con una muestra que contenía cosechas de FIX-CTP. El carril 3 en A-B se cargó con una muestra que contenía una cosecha de FIX-(CTP)₂.

40 Figura 2. Presenta un gráfico que muestra la actividad cromogénica comparativa de cosechas de FIX-CTP y FIX-(CTP)₂ (medida mediante la concentración EC₅₀) en comparación con rhFIX (American Diagnostics).

45 Figura 3. Presenta un gráfico que muestra el perfil PK de rhFIX, de la cosecha de FIX-CTP-CTP y de la cosecha de FIX-CTP.

50 Figura 4. Presenta un gráfico de barras que muestra el nivel del antígeno FIX en las cosechas de FIX-CTP y las cosechas de FIX-CTP-CTP y la proteína purificada FIX-CTP-CTP según se determinó mediante el uso del estuche de ELISA para el FIX humano (Affinity Biologicals; cat. núm. FIX-AG RUO). La concentración de proteínas calculada (µg/ml) es el promedio de dos ejecuciones independientes.

55 Figura 5. Muestra fotomicrografías de geles de SDS-PAGE del reconocimiento con Ac para FIX. La fotomicrografía A representa una tinción con azul de Coomassie; la fotomicrografía B representa el reconocimiento de un anticuerpo anti-FIX en una transferencia Western; la fotomicrografía C representa el reconocimiento de un anticuerpo anti-y carboxilación en una transferencia Western. El carril 1 en A-C se cargó con una muestra que contenía FIX-(CTP)₂. El carril 2 en A-C se cargó con una muestra que contenía FIX-(CTP)₂ no unido. El carril 3 en A-C se cargó con una muestra que contenía una elución concentrada de FIX-(CTP)₂.

60 Figura 6. Presenta un gráfico que muestra la actividad cromogénica de FIX-(CTP)₂ (concentración de la muestra/D.O.) en comparación con el plasma mezclado normal humano y rhFIX (American Diagnostics).

Figura 7. Presenta un gráfico que muestra el perfil PK de FIX-CTP-CTP purificado, rhFIX, cosecha de FIX-CTP-CTP, y cosecha de FIX-CTP.

65 Figura 8. Muestra transferencias Western con anticuerpos anti-CTP y anti-gamma carboxilación del FIX

fusionado a tres, cuatro o cinco CTP. Las cosechas de FIX-CTP₃, FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅ se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precisión plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante inmunotransferencia Western con el uso del Ac políclonal anti-CTP (Adar Biotech Production) o Ac anti-Gla (American Diagnostica).

5 Figura 9. Muestra una detección con azul de Coomassie de FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, y FIX-CTP₅. Después de un proceso de purificación con la utilización de una columna de jacialina (purificación por inmunoafinidad de las proteínas glicosiladas), FIX-CTP₃, FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅ se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precisión Plus (Bio-Rad). El gel de SDS-PAGE se 10 tiñó mediante el colorante azul de Coomassie para la detección de las muestras.

15 Figura 10. Muestra la actividad cromogénica del FIX. Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de FIX-CTP₃, FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅ completamente purificados (columna HA) frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica, que está disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). Todas las muestras se diluyeron en serie y la potencia 20 se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia que consistió en plasma normal humano.

25 Figura 11. Muestra el perfil farmacocinético (PK) comparativo de FIX-CTP₃, FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅. La concentración del FIX en las muestras de plasma se cuantificó mediante el uso de estuches de Elisa para FIX humano (Affinity Biologicals). Se calculó el perfil farmacocinético y es la media de 3 animales en cada punto de tiempo. Los tiempos de vida media terminal se calcularon mediante el uso del programa informático PK Solutions 2.0.

30 Figura 12. Muestra el análisis de FIX-CTP₃ por SDS-PAGE - Coomassie SDS-PAGE. La proteína enriquecida γ-carboxilada FIX-CTP₃, rhFIX y rFIXa (FIX activado) se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis del SDS-PAGE y Coomassie se realizó mediante la tinción del gel con el reactivo azul de Commasie (800 ng de proteína) (figura 12A). Se realizó una inmunotransferencia Western mediante el uso de 100 ng de proteína con Ac políclonal anti-FIX humano (figura 12B), anticuerpo monoclonal anti-gamma carboxilación humana (American Diagnostics Cat #499, 3570) (figura 12C), Ac políclonal anti-propéptido de FIX (figura 12D), y Ac políclonal anti-CTP (figura 12E).

35 Figura 13: Muestra la actividad cromogénica de FIX-CTP₃. Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de la cosecha de FIX-CTP₃ y de la proteína enriquecida γ-carboxilada FIX-CTP₃, frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica, disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). La cosecha de FIX-CTP₃ y la proteína se diluyeron en serie, y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación 40 de referencia que consistió en plasma normal humano.

45 Figura 14: Muestra el tiempo de coagulación de manera comparativa. Se realizó un ensayo de aPTT (tiempo de trombina parcial activada) *in vitro* que comparó la actividad de coagulación del FIX-CTP₃ con BeneFIX. Las proteínas se diluyeron en serie y se adicionaron al plasma agotado de FIX humano, y se evaluó el tiempo de coagulación.

50 Figura 15. Muestra el perfil PK comparativo de FIX-CTP₃. La concentración del FIX se cuantificó mediante el uso de estuches de ELISA para FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO). El perfil farmacocinético se calculó para cada proteína y es la media de 3 animales en cada punto de tiempo.

55 Figura 16. Muestra los parámetros del perfil de actividad. En paralelo al muestreo de PK, los animales deficientes del FIX administrados con BeneFIX® o FIX-CTP₃, las muestras plasmáticas citratadas, se evaluaron en cuanto a su actividad de coagulación mediante el ensayo de aPTT, que se tradujo a % de actividad. El % de actividad en cada punto de muestreo se calculó como el tiempo de coagulación actual/tiempo de coagulación del plasma mezclado de ratones normales * 100.

60 Figura 17. Muestra los parámetros de un primer reto de sangrado. Los ratones deficientes de FIX se administraron con una única inyección intravenosa de 100 UI/Kg de BeneFIX® o rFIX-CTP₃. La vena de la cola se comprimió ligeramente 48 horas después de la dosificación y se evaluaron el tiempo de sangrado por la vena de la cola (TVBT) y la intensidad del sangrado (DO de hemoglobina). Un segundo reto de sangrado se realizó 15 minutos después de alcanzar la homeostasis, y se midieron los mismos parámetros.

65 Figura 18. Muestra los parámetros de un segundo reto de sangrado. Una vez que el primer sangrado descrito en la leyenda de la figura 19 se detuvo espontánea o manualmente, un segundo reto de sangrado se realizó 15 minutos después del primero, y se volvieron a medir el tiempo y la intensidad del sangrado.

Figura 19. Muestra un diagrama que ilustra la construcción de rFVII-CTP (A), la construcción de rFVII-CTP-

CTP (B), la construcción de rFIX-CTP (C), y la construcción de rFIX-CTP-CTP (D).

Figura 20A. Presenta un gráfico de barras que muestra cosechas de células limitadas diluidas transfectadas con clones y seleccionadas con variantes de FVII-CTP en presencia de vitamina K3 a 5 µg/ml. El nivel de FVII se cuantificó mediante el uso de ELISA para FVII (AssayPro).

Figura 20B. Presenta un gráfico de barras que muestra cosechas de células limitadas, diluidas, transfectadas y seleccionadas con variantes de FVII-CTP en presencia de 5 µg de vitamina K3. actividad. La actividad de FVII se cuantificó mediante el uso de un ensayo de actividad cromogénica de FVII (AssayPro).

Figura 20C. Presenta un gráfico de barras que muestra cosechas de células limitadas diluidas transfectadas y seleccionadas con variantes de FVII-CTP en presencia de 5 µg de vitamina K3. La actividad específica del FVII se calculó para cada versión mediante la división del valor de la actividad por la concentración de FVII de la cosecha.

Figura 20D. Presenta un gráfico que muestra el perfil PK de FVII, las cosechas de FVII-CTP-CTP y FVII-CTP.

Figura 21. Muestra transferencias Western del FVII fusionado a tres, cuatro y cinco CTP, detectado mediante el uso de anticuerpos anti-FVII, anti-CTP y anti-gamma carboxilación. Las cosechas de FVII-CTP₃, FVII-CTP₄, y FVII-CTP₅ se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % (expedeon) mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante inmunotransferencia Western con el uso de Ac anti-FVII, Ac polyclonal anti-CTP (Adar Biotech Production) o Ac anti-Gla (American Diagnostica).

Figura 22. Muestra la actividad de FVII - actividad cromogénica. Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de FVII-CTP₃, FVII-CTP₄ y FVII-CTP₅ purificados en HA (fracción altamente gamma carboxilada) frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica, disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). Todas las muestras se diluyeron en serie y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia que consistió en plasma normal humano.

Figura 23. Muestra un primer perfil farmacocinético (PK) comparativo-FVII 3, 4 y 5 CTP. FVII-CTP₃, FVII-CTP₄ y FVII-CTP₅ (grupos A, B y C, respectivamente) se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague Dawley (seis ratas por tratamiento) en una dosis de 250 µg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 3 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72 y 96 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. FVII-CTP₅ demostró un perfil superior en comparación con las otras dos versiones.

Figura 24. Muestra un segundo perfil PK comparativo-FVII 3, 4 y 5 CTP. FVII-CTP₃, FVII-CTP₄ y FVII-CTP₅ después de la selección del FVII y el proceso de purificación en HA (grupos A, B y C, respectivamente) se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague Dawley (tres ratas por sustancia) en una dosis de 29,45 µg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital a las 0,083, 0,5, 2, 8, 24, 48 y 72 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Figura 25. Muestra un diagrama esquemático del proceso de purificación de FVII-CTP₃. El lote 31 se produjo para el estudio de PK/PD. El lote 38 se produjo para el estudio de supervivencia.

Figura 26. Muestra un SDS -PAGE y transferencia Western de FVII Final y FVIIa. Se cargaron 10 µg (lote 31) o 5 µg (lote 38) en cada carril de SDS-PAGE teñido con Coomassie. Se cargó 1 µg de proteína en cada carril de la transferencia Western. 1. Polipéptido FVII-CTP₃; 2. Cadena pesada, que incluye 3x CTP; 3. Cadena ligera. Los tres anticuerpos detectaron FVII. La cadena pesada de FVIIa se detectó mediante α-CTP, y la cadena ligera se detecta tanto con α-FVII como con α-Gla.

Figura 27. Muestra que la actividad cromogénica de FVII-CTP₃ aumenta como resultado de la purificación en una columna de hidroxiapatita (HA) cerámica. Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de la cosecha de FVII-CTP₃, de las fracciones durante el proceso, y del FVII-CTP₃ purificado frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica, disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). La cosecha de FVII-CTP₃ y la proteína se diluyeron en serie y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia de plasma normal humano.

Figura 28. Muestra el perfil PK de FVIIa-CTP₃ frente a NovoSeven® en ratones deficientes de FVIII. FVIIa-CTP₃ se produjo después de la selección de FVII, el proceso de purificación en HA y la activación. FVIIa-CTP₃ o NovoSeven® se administró en una única inyección intravenosa a los ratones hemofílicos FVIII-/. Las

muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital a las 0,083, 0,5, 2, 8, 24, 48 y 72 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis, y se estableció un perfil PK basado en la actividad de coagulación del FVIIa mediante el uso de un estuche comercial STACLOT.

5 Figura 29. Muestra que se produjo FVIIa-CTP3 después de la selección de FVII, el proceso de purificación en HA y la activación. FVIIa-CTP3 o NovoSeven® se administró en una única inyección intravenosa a los ratones hemofílicos FVIII-/-. Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital a las 0,083, 0,5, 2, 8, 24, 48 y 72 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. Los parámetros de generación de trombina se evaluaron durante el experimento de PK, y se evaluaron parámetros como la cantidad máxima hasta el pico, la cantidad de trombina hasta un punto de tiempo y la velocidad de generación de trombina.

10 Figura 30. Muestra las curvas de supervivencia de los ratones hemofílicos después del corte de la vena de la cola (TVT). El TVT se realizó (A) a los 15 min, (B) 24 horas o (C) 48 horas después de la administración. La supervivencia de los ratones se observó durante 24 horas después del TVT y se registró en cada hora durante las primeras 12 horas, y después de 24 horas. La Figura 33D resume la supervivencia de los ratones según se registró 24 horas después del TVT. Los datos del grupo control (vehículo) es la suma de los 3 experimentos con 5 ratones/experimento.

15 Figura 31. Muestra las inmunotransferencias de FVII - 3- CTP y FVII- 5 CTP. A) con transferencia para GLA. B) con transferencia para FVIIa. C) con transferencia para CTP.

20 Figura 32. Muestra un perfil PK comparativo-FVII 3 y 5 CTP- a partir de la purificación en columna Select y HA (FVIIS frente a FVII HA).

Figura 33. Muestra un perfil PK comparativo-FVII 3 y 5 CTP-El segundo estudio (IV frente a SC).

25 Figura 34. Muestra las curvas de supervivencia de los ratones hemofílicos después del corte de la vena de la cola (TVT). El TVT se realizó 12 horas después de la administración SC. La supervivencia de los ratones se observó durante 24 horas después del TVT y se registró en cada hora durante las primeras 12 horas, y después de 24 horas.

30 Figura 35. Muestra el perfil PK de MOD-5014 frente a NovoSeven® después de la administración IV o SC. A) muestra la administración IV; B) muestra la administración SC.

Figura 36. Muestra el perfil PK de MOD-5014 (Clon 61 #75, #81) frente a NovoSeven® después de una sola administración SC.

40 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a los usos médicos de los factores de coagulación de acción prolongada. Los factores de coagulación de acción prolongada comprenden tres péptidos del carboxilo terminal (CTP, referidos además como unidades CTP) de la gonadotropina coriónica humana (hCG). Se describe que el CTP actúa como un protector contra la degradación del factor de coagulación, aumenta la C_{máx} de un factor de coagulación, aumenta el T_{máx} de un factor de coagulación, aumenta el tiempo de vida media en circulación de un factor de coagulación, y/o mejora la potencia de los factores de coagulación.

50 La invención además proporciona un factor de coagulación modificado por un péptido carboxilo terminal (CTP) de la gonadotropina coriónica que consiste en un factor de coagulación, y tres CTP unidos al carboxilo terminal de dicho factor de coagulación, en el que dicho factor de coagulación modificado con CTP es: a. un polipéptido del Factor IX (FIX) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 o de los aminoácidos 47-545 de la SEQ ID NO: 31, b. un polipéptido del Factor VII (FVII) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 o de los aminoácidos 39-528 de la SEQ ID NO: 25; o un polipéptido de Factor VII activado (FVIIa) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 39-528 de SEQ ID NO: 25; para su uso en el tratamiento de la hemofilia A en un sujeto humano.

55 El factor de coagulación VII (FVII) es una glicoproteína de 444 aminoácidos (50 KDa) secretada por los hepatocitos al torrente sanguíneo como una proenzima inactiva. Tras un daño tisular y exposición a la sangre circulante, el FVII forma un complejo con el factor tisular (TF) que es una verdadera proteína receptora del FVII y se expresa por diversas células localizadas en las capas más profundas de la pared del vaso. La formación de este complejo FVII-TF conduce a la activación del FVII. El FVII activado (FVIIa) inicia la vía de coagulación extrínseca mediante la activación del Factor IX y el Factor X.

60 FVII pertenece a un grupo de glicoproteínas dependientes de la vitamina K, asociadas con el sistema de

coagulación. Además del FVII, este grupo consiste en el Factor IX, el Factor X, la Proteína C y la protrombina. Estas proteínas tienen similares organizaciones de los dominios y se sintetizan como precursores con un propéptido N-terminal seguido por una secuencia de aminoácidos madura. El propéptido contiene un sitio de entrada para la gammacarboxilasa que convierte ácidos glutámicos (Glu) en ácidos gamma carboxi glutámicos (Gla). Este dominio es seguido por dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF), una región de conexión (CR) y un dominio C-terminal de serina proteasa. Antes de la secreción, el propéptido del FVII se escinde para formar una glicoproteína del FVII, zimógeno monocatenario de 406 aminoácidos. Después de la secreción, la proteína puede activarse como un heterodímero de dos cadenas unidas por enlaces disulfuro, FVIIa, mediante escisión en la CR. La concentración plasmática del FVII es 10 nM y aproximadamente el 1 % circula en la forma activa en los individuos saludables.

El factor IX (FIX) es una glicoproteína de 415 aminoácidos (55 KDa); pertenece a un grupo de glicoproteínas dependientes de la vitamina K, asociadas con el sistema de coagulación. El FIX tiene una organización de los dominios similar al factor FVII, el Factor X, la Proteína C y la protrombina que se sintetizan como precursores con un propéptido N-terminal seguido por una secuencia de aminoácidos madura.

El FIX se secreta como una molécula monocatenaria que experimenta complejas modificaciones postranscripcionales, muchas de las cuales son críticas para sus propiedades bioquímicas y farmacocinéticas. Entre todas las modificaciones postranscripcionales, 12 residuos de ácido glutámico cerca del amino terminal del FIX que se gamma carboxilan mediante la gamma carboxilasa dependiente de la vitamina K son las más cruciales. La carboxilación es necesaria para la interacción del FIX con las superficies fosfolipídicas y para una actividad óptima del FIX. El propéptido amino terminal sirve como un sitio de reconocimiento para la gamma carboxilasa y, por lo tanto, después de la gamma carboxilación, se escinde por la serina proteasa del aparato de Golgi conocida como enzima de escisión de aminoácidos básicos apareados (PACE/Furina). Otras cuatro modificaciones postranscripcionales podrían ocurrir en el aparato de Golgi: sulfación de la tirosina 155, fosforilación de la serina 158, O-glicosilación en Ser 63 y en 61 y finalmente, N-glicosilación en Asn 157 y 16, pero se demostró que no son necesarias para la actividad adecuada del FIX.

El FIX circula en el plasma (concentración promedio de 5 µg/ml) como un zimógeno inactivo monocatenario. Tras la escisión proteolítica en dos enlaces peptídicos: Arg 145 y Arg 180 mediante uno o dos activadores fisiológicos, el complejo FVIIa-TF o FIXa, el péptido de activación se elimina, lo que convierte al FIX en una enzima completamente activa que consiste en una cadena ligera y pesada que se mantienen unidas mediante un único enlace disulfuro. La cadena ligera N-terminal contiene el ácido gamma carboxiglutámico no catalítico (Gla) y dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico, mientras que la cadena pesada C-terminal contiene el dominio catalítico de la molécula, similar a la tripsina. El FIXa solo se caracteriza por poca actividad catalítica. Sin embargo, cuando está en forma de complejos con FVIII, su actividad proteolítica aumenta en 4-5 órdenes de magnitud hacia su sustrato natural FX.

En consecuencia, se describen en la presente un método para prolongar el tiempo de vida media biológica o mejorar el área bajo la curva (AUC) de un factor de coagulación, que comprende la etapa de unir tres CTP al carboxilo terminal del factor de coagulación, para prolongar así el tiempo de vida media biológica o mejorar el AUC del factor de coagulación. Se describe en la presente un método para prolongar el tiempo de vida media biológica o un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) del FVII o FVIIa, que comprende la etapa de unir tres CTP al carboxilo terminal del FVII o FVIIa, para prolongar así el tiempo de vida media biológica o mejorar el AUC del FVII o FVIIa.

La presente solicitud también describe un método para prolongar el tiempo de vida media biológica de un polipéptido del factor IX (FIX), que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX, para prolongar así el tiempo de vida media biológica de dicho polipéptido del FIX.

La solicitud también describe un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) de un polipéptido del factor IX (FIX), que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX, para mejorar así el AUC de dicho polipéptido del FIX. La presente solicitud también describe un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) de un polipéptido del factor VIIa (FVIIa), que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa, para mejorar así el AUC de dicho polipéptido de FVIIa.

En una realización, el factor de coagulación es el Factor VIIa (FVIIa). En otra realización, el factor de coagulación es el Factor VII (FVII). En otra realización, el factor de coagulación es el Factor IX (FIX).

En una realización, el factor de coagulación es una glicoproteína.

En otra realización de la invención, el factor de coagulación es una proteína recombinante. En otra

realización, el factor de coagulación es una glicoproteína recombinante. En otra realización, el factor de coagulación comprende un péptido señal.

- 5 En una realización, la presente invención proporciona un polipéptido del factor IX (FIX) modificado con CTP que consiste en un polipéptido del FIX y tres péptidos del carboxilo terminal (CTP) de la gonadotropina, unidos al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX modificado con CTP.

10 En otra realización, el factor de coagulación se sintetiza como un precursor con un propéptido N-terminal. En otra realización, el factor de coagulación como se usa en la presente está en una forma proenzimática inactiva. En otra realización, el factor de coagulación se produce en hepatocitos. En otra realización, el factor de coagulación comprende un sitio de entrada para la gammacarboxilasa que convierte ácidos glutámicos (Glu) en ácidos gamma carboxi glutámicos (Gla). En otra realización, el factor de coagulación como se usa en la presente es un factor de coagulación disponible comercialmente.

- 15 Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor VII comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

- 20 Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor VII comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MYSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLLELRPGSLERECKE
EQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSQGDQCCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCPLPAFE
GRNCETHKDDQLICVNENGCEQYCSDDHTGKRSRCHEGYSLLADGVSCPTV
PCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLVNGAQLCGGTLINTIWVVS
AAHCFDKIKNWRNLJAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPTSYVPGTTNHDIALLRL
HQPVVLTDHVVPCLPERTFERTLAFVRFSLYSGWCGQLLDRCATALELMVLNVPRL
MTQDCLQOSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTCI
VSGWGOOCATVGHFGVYTRVSOYIEWLOKLMRSEPPGIVLLRAPFP (SEC. CON NUM DE IDENT. 9)

- 25 Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor VII comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLLELRPGSLERECKE
EQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGOSCKDQLQSYICFCLPAFE
GRNCETHKDDQLICVNENGCEQYCSDHTGKRSRRCHEGYSLLADGVSCTPTVEY
PCGKIPILEKRNAASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTJINTIWWVS
AAHCDFKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIIPSTYVPGTTNHDIALLRL
HQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAIVVRFLSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRL
MTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCA GYSDGSKDSCKGDSGCPHATHYRGTWYLTGI
VSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPPP*GCGR (SEC. CON
NÚM. DE IDENT.: 10).

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor VII-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor VII-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MVSQALRLCLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKE
EQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFCLPAFE
GRNCETHKDDQLICVNENGCEQYCSDHTGTRSCRCHEGYSSLADGVSCPTV
PCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLVNGAQLCGGTINTIWV
AAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVHIPSTYVPGTTNHDIAL
HQPVVLTDHVVPCLPRTESERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMV
MTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCA GYSDGSKDSCKGDGGPHATHYRGTW
VSWGQGCATVGHFGYYTRYSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSKAPPSL
PSRLPGPSDTPILPQ* (SEC. CON NÚM. DE IDENT. :13).

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor VII-CTP-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor VII-CTP-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MVSQALRLCLLGLQQCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLFELRPGSLERECKE
EQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGSCKDQLQSYICFCLPAFE
GRNCETHKDDQLICVNENGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLAGVSCTPTVEY
PCGKIPILEKRNAASKPQGRIVGGKVCVKGECPWQVLLVNGAQLCGGTLINTIWVVS
AAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVHPSTYVPGITNHDIALJRL
HQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLPRL
MTQDCLQQRKVGDSPNITEYMFCAAGYSDGSKDSCKGDGGPHATHYRGTWYLTI
VSWGQQCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAFPSSSSKAPPPSLPS
PSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ** (SEC. CON NÚM. DE
IDENT.: 15).

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor VII-CTP-CTP-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

En otra realización, la secuencia de aminoácidos del Factor VII-CTP-CTP-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MVSQALRLCLLLGLQQCLAAVFVHQEEAHGLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKE
EQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCDKQLQSYICFCIPLAFAE
GRNCETHKDDQLICVNENGCEQYCSDDHTGTKRSCRCHEGYSLADGVSCPTPTVEY
PCGKIPILEKRNAASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVS
AAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPTSTYVPGTINHDIALI RL
HQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLA FVRESLVSGWGQLLDRGATALELMVNVPR L
MTQDCLQQRKVGDSPNITEYMFCA GYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYL TGI
VSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSKAPPPSLPS
PSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGP
SDTPILPQ*** (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 25).

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor VII-(CTP)₄ (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor VII-(CTP)₄ (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

LEDMVSQLRLICLILGLQGCLAAVFTQEEAHGVLHRRRRANAFLLELRPGSLERE
CKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSQGDQCASSPCQNGSCKDQLQSYICFCCLP
AEGRNCETHKDDQLICVNENGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPT
VEYPCCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIW
VVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIAL
LRLHQPVVLTDHVVPCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVILNV
PRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCA GYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYL
TGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSKAPPPS
LPSPSRILPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRILPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRILP
GPSDTPILPO>G (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 27).

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor VII-(CTP)₅ (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor VII-(CTP)₅ (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

LEDMVSQALRLCLLLGLQGCLAAVFTQEEAHGVLHRRRRANAFLLELRPGSLERE
CKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLP
AEGRNCETHKDDQLICVNENGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLADGVSCTPT
VEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VN G AQLCGGT LINTIW
VVSAAHCPDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVII P STYVPGITNHDIAL
LRLHQPVVLT D H VVPLCLPERTF SERTLA F VRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVNV
PRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTwYL
TGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAFPFSSSKAPPPS
LPSPSRLPQPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLP
GPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL
PQ**GS (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 29).

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor IX comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor IX comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MQRVNMMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQG
NLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTIEFWKQYVDGQCESNPCLNGGSCKDDINSY
ECWCPEGFEGKNCELDVTCNIKNORCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCE
PAVPFFCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVYVNSTEAEIILDNTIQSTQSNDFTRVVG
GEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIYNEKWIYTAAHCVETGVKITVVAGEHNIE
ETEHTEQKRNVIRIIPHINYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIF
LKPGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGPHE
GGRDSCQGDSGGPVITVEGTSFLTGHSWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKT
KLT* (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 17).

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor IX-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

Se describe, además, que la secuencia de aminoácidos del Factor IX-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MQRVNMMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQG
NLERECMEEKCSPEEAREVFENTERTIEFWKQYVDGDQCESNPCLNOGSCKDDINSY
ECWCPFGPEGKNCEDVTCNIKNGRCEQFCRNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCE
PAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVYVNSTEAEIHDNITQSTQSNDFTRVVG
GEDAKPGQFPWQVVLNGKVDACCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIE
ETEHTEQKRNVIRIIPHINYNAAINKYNHDIALLEDEPLVLSYVTPICIAKEYTNIF
LKGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLOQLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHE
GGRDSCQGDSCGGPHVTEVEGTSFLTGHSWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKT
KLTSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ** (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 19).

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor IX-CTP-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

5

Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor IX-CTP-CTP (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MQRVNMMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQG
NLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTIEFWKQYVDGDOCESNPCLNGGSKDDINSY
ECWCPCFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCE
PAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVPPDVYVNSTEAEIILDNITQSTQSFDTRVVG
GEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIE
ETEHTEQKRNVIRIIPHNNYNAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADEKEYTNIF
LKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKEFIYNNMFCAGFHE
GGRDSCQGDSCGGPHVTEVEGTSFLTGHSWGESECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKT
KLTSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ**
(SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 21).

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor IX-(CTP)₃ (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

5

En otra realización, la secuencia de aminoácidos del Factor IX-(CTP)₃ (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

10

MQRVNMMIAESPGGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQG
NLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSY
ECWCPIFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCE
PAVPFFCGRVSQSQTSLTRAEEAVFPDVYVNSTEAEIILDNITQSTQSFNDFTRVVG
GEDAKPGQFWQVVLNGKVDAPCOGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIE
ETEHTEQKRNVIRPHHNNAINKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIADKEYTNIF
LKPGSGYVSGWGRVPHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNMPCAGPHE
GGRDSCQGDSCGPHTVEVEGTSFLTGHISWGEECAMKGKYGIYTKVSRVNWKEKT
KLTSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSS
KAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ>>> (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 31).

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor IX-(CTP)₄ (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor IX-(CTP)₄ (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

SRVDPAMQRVMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKL
 EEPVQGNLERECMEEKCSPEEAREVPENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSC
 KDDINSYECWCPPGFEKGNCEDVTCKNIKNGRCEQPKCKNSADNKVVCSCTEGYRLA
 ENQKSCEPAVPPCGRVSQSQTSLTRAEEAVFPDVYVNSTEAEITLDNITQSTQSE
 DPTRVVGGEDAQPQQFWQVVLNGKVDACFGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRNVIRIPIHHNNAIAINKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIA
 KEYTNIFLKPGSGYVSGWGRVPHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMF
 CAGFHEGGRDSCQCDSOGPHVTEVEGTSFLTGHSWGEECAMKGKYGIYTKVSRV
 WIKEKTKLTSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL
 PQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ**GSA

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica al Factor IX-(CTP)₅ (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

10 Se describe que la secuencia de aminoácidos del Factor IX-(CTP)₅ (unido al carboxilo terminal) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

RVDPMQRVNMMMAESPLGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKL
EEPVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTIEFWKQYVDGDOCESNPCLNGGSC
KDDINSYECWCPPGFEKGKNCEDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLA
ENQKSCSEPAVPPCGRVSQSQTSLTRAEAVFVFDVYVNSTEAEIILDNTQSTQSFN
DFTRVVGGEDAKPOQFPWQVVLNOKVDAFCGGSIVNEKWIVTAACVETGVKITVV
AGEHNIEETEHTTEQKRNVIRIPIHHNNAIAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAD
KEYTNIFLKPGSGYVSGWGRVPHKGRSALVHQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMF
CAGFHEOGRDSCQGDSCGCPHYTEVEGTSFLTGHSWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVN
WIKEKTKLTSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL
PQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSK
APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ**GSAA (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 35).

En otra realización, puede añadirse furina a una célula que expresa el factor de coagulación-CTP de la invención. Se describe que la furina aumenta la eficiencia de la producción de un factor de coagulación-CTP 5 de la invención en una célula. En otra realización, la furina se cotransfecta con el vector que comprende la secuencia codificante del factor de coagulación-CTP de la invención. En otra realización, la furina está codificada por un vector separado. En otra realización, la furina y un factor de coagulación-CTP están codificados por un vector. En otra realización, la secuencia codificante de furina se inserta en pCI-DHFR. En otra realización, la secuencia codificante de furina se modifica genéticamente en pCI-dhfr/smal+NotI, 10 Furina/AsisI F.I.+NotI.

Se describe que la secuencia de ácido nucleico que codifica la furina comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

Se describe que la secuencia de aminoácidos de furina comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFL
 NLGQIFCDYYHFWRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKRDVY
 QEPTDPKFPQWYLSGVQTQDNLNVKAAWAAGYTGIGIVVSILDGIEKNHPDLAGN
 YDPGASFDVNDQDPDPQPRYTQMNNDNRHGTRCAGEVAAVANNGVCGVGVAYNAR
 IGGVRMLDGEVTDAVEARSLGLNPNNHIIYSASWGPEDDGKTVDGPARLAEEAFFRG
 VSQGRGGLGSIVVWASGNNGREHDSNCDCGYTSIYTLSISSATQFGNVPWYSEACS
 STIATTYSSGNQNEKQIVTTDLRQKCTESHTGTSASAPLAAGIIALTLEANKNLTWRD
 MQHLVVQTSKPAHLNANDWATNGVGRKVSHSYGYGLLADAGAMVALAQNWTIV
 PQRKCHDILTEPKDICKRLEVRKTVTACLGEPNHTRLEHAQARLTLSSYNRRGDLAIH
 LVSPMGTRSTLLAARPHDYSADGFNDWAFMTTHSWDEDPSGEWVLEIENTSEANNY
 GTLTKEPLVLYGTAPEGLPVPPPESSGCKTLTSSQACVCEEGPSLHQKSCVQHCPPGP
 APQVLDTHYSTENDVETIRASVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPHASLDPVEQTC
 RQSQSSRESPPQQQPPRLPPEVAGQRLRAGLLPSHLPEVVAGLSCAFIVLVFTVFLV
 LQLRSGPSFROVKVYTMDROLISYKGLPPEAWQEECPSDSEEDERGRGERTAFIKDQSA
 L. (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 23).

5 Debe entenderse que las composiciones para su uso según la presente invención que comprenden los elementos o etapas como se describen en la presente pueden consistir en esos elementos o etapas, o en otra realización, consisten en esos elementos o etapas. En algunas realizaciones, el término "comprender" se refiere a la inclusión del agente activo indicado, tal como el factor de coagulación modificado con CTP, así como a la inclusión de otros agentes activos, y portadores, excipientes, emolientes, estabilizadores farmacéuticamente aceptables, etcétera, como se conocen en la industria farmacéutica. En algunas 10 realizaciones, el término "que consiste esencialmente en" se refiere a una composición, cuyo único ingrediente activo es el ingrediente activo indicado, sin embargo, pueden incluirse otros compuestos que son para estabilizar, preservar, etcétera, la formulación, pero no están implicados directamente en el efecto terapéutico del ingrediente activo indicado. En algunas realizaciones, el término "que consiste esencialmente en" puede referirse a componentes que facilitan la liberación del ingrediente activo. En algunas realizaciones, el término "que consiste" se refiere a una composición, que contiene el ingrediente activo y un vehículo o 15 excipiente farmacéuticamente aceptables.

20 En una realización, la presente invención utiliza un factor de coagulación recombinante como se describió anteriormente. En una realización, la presente invención utiliza un factor de coagulación modificado genéticamente como se describió anteriormente. En una realización, el factor de coagulación modificado genéticamente como se describió anteriormente se refiere como un factor de coagulación modificado con CTP.

25 En una realización, los CTP que se unen al carboxilo terminal del factor de coagulación se unen en tandem al carboxilo terminal.

30 En una realización, un factor de coagulación modificado genéticamente como se describe en la presente tiene una actividad biológica equivalente o mejorada en comparación con el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra realización, un factor de coagulación modificado genéticamente como se describe en la presente tiene medidas farmacológicas equivalentes o mejoradas en comparación con el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra realización, un factor de coagulación modificado genéticamente como se describe en la presente tiene una farmacocinética equivalente o mejorada en comparación con el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra realización, un factor de coagulación modificado genéticamente como se describe en la presente tiene una farmacodinámica equivalente o mejorada en comparación con el factor de coagulación sin modificación con CTP.

35 En una realización, el factor de coagulación de la presente invención puede ser útil para prevenir o tratar un trastorno de la coagulación.

40 En una realización, el sujeto a tratar es un sujeto hemofílico. En una realización, la hemofilia es la hemofilia B. En una realización, la hemofilia es hemofilia grave, que, en una realización, describe la hemofilia en la cual los niveles del factor de coagulación son 0-1 %. En otra realización, la hemofilia es hemofilia moderada, que, en una realización, describe la hemofilia en la cual los niveles del factor de coagulación son 1-5 %. En otra realización, la hemofilia es hemofilia ligera, que, en una realización, describe la hemofilia en la cual los niveles del factor de coagulación son 5-50 %.

Los factores de coagulación de la presente invención pueden ser útiles para prevenir o tratar un trastorno de la coagulación en un sujeto.

5 En otras realizaciones, el factor de coagulación modificado genéticamente puede reducir la cantidad de infusiones necesarias para un paciente, reducir las dosis necesarias para un paciente, o una combinación de estas.

10 En una realización, el factor de coagulación IX que comprende 3 CTP en tándem en su carboxilo terminal muestra un mejor perfil PK a la vez que mantiene su actividad de coagulación frente a la cosecha de FIX-CTP-CTP, la cosecha de FIX-CTP o rhFIX. En una realización, el tiempo de vida media de eliminación de rFIX-CTP3 es de 2,5 a 4 veces mayor que para rFIX en ratas y en ratones deficientes de FIX. En la presente se describe que la administración de rFIX-CTP3 prolongó significativamente el efecto de procoagulación en ratones deficientes de FIX durante al menos 76 horas después de la dosificación. En la presente se describe además que la administración de rFIX-CTP3 produjo un mayor pico de actividad que rFIX en ratones deficientes de FIX. En la presente se describe, además, que el factor de coagulación IX que comprende 2 CTP en tándem en su carboxilo terminal muestra un mejor perfil PK a la vez que mantiene su actividad de coagulación frente a la cosecha de FIX-CTP o rhFIX y que el factor de coagulación IX que comprende 2 CTP en tándem en su carboxilo terminal muestra un aumento de 3 veces en el tiempo de vida media y un AUC 4,5 veces mayor en comparación con rhFIX.

15 En otra realización de la invención, la administración subcutánea (SC) da como resultado una mayor biodisponibilidad del FVII modificado con CTP en comparación con el FVII recombinante. Se describe que el tiempo de vida media es más prolongado y la biodisponibilidad (AUC SC/AUC IV) es mayor después de la administración SC de FVIIa-CTP3 y 5 en comparación con la administración SC de NovoSeven®. Se describe que MOD-5014 y MOD-5019 inyectados por vía subcutánea muestran una mejor supervivencia de los ratones en comparación con el FVII recombinante (NovoSeven®) (véase el Ejemplo 8 más adelante).

20 En otra realización, los términos "péptido CTP", "péptido del carboxilo terminal" y "secuencia de CTP" se usan indistintamente en la presente. En otra realización, el péptido del carboxilo terminal es un CTP de longitud completa.

25 En otra realización, un péptido señal se une al amino terminal del CTP, como se describe en el documento US 7,553,940.

30 En otras realizaciones, el término factor de coagulación modificado genéticamente se refiere a la secuencia de aminoácidos de un factor de coagulación maduro. En otras realizaciones, el término factor de coagulación modificado genéticamente se refiere a la secuencia de aminoácidos del factor de coagulación que incluye su secuencia señal o péptido señal.

35 En otra realización, "secuencia señal" y "péptido señal" se usan indistintamente en la presente. En otra realización, "secuencia" cuando hace referencia a una molécula polinucleotídica puede referirse a una parte codificante. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

40 En la presente se describe que un factor de coagulación modificado genéticamente que comprende al menos un CTP como se describe en la presente tiene una mayor actividad biológica in vivo en comparación con el mismo factor de coagulación sin al menos un CTP. En una realización, la actividad biológica mejorada se deriva del tiempo de vida media más prolongado del factor de coagulación modificado genéticamente a la vez que mantiene al menos alguna actividad biológica. En otra realización, la actividad biológica mejorada se deriva de la actividad biológica mejorada que resulta de la modificación con CTP. En otra realización, la actividad biológica mejorada se deriva tanto de un tiempo de vida media más prolongado como de una mejor funcionalidad del factor de coagulación modificado con CTP.

45 Como se describe en la presente, al menos una secuencia CTP en el extremo carboxilo terminal del factor de coagulación proporciona mayor protección contra la degradación de un factor de coagulación, proporciona mayor protección contra el aclaramiento, proporciona un tiempo de aclaramiento prolongado, aumenta su Cmáx, aumenta su Tmáx, y/o prolonga su T $\frac{1}{2}$.

50 En otra realización, un factor de coagulación conjugado de esta invención se usa de la misma manera que un factor de coagulación conjugado no modificado. En otra realización, un factor de coagulación conjugado de esta invención tiene un mayor tiempo de vida media en circulación y tiempo de residencia en el plasma, menor aclaramiento, y una actividad clínica in vivo aumentada. En otra realización, debido a las propiedades mejoradas del factor de coagulación conjugado como se describe en la presente, este conjugado se administra menos frecuentemente que la forma no modificada del mismo factor de coagulación.

55 En otra realización, una disminución en la frecuencia de administración dará como resultado una mejor

estrategia de tratamiento, que, en una realización, conducirá a una mayor satisfacción del paciente lo que conduce a mejores resultados del tratamiento, así como una mejor calidad de vida del paciente. En otra realización, en comparación con los conjugados convencionales de factores de coagulación, se ha encontrado que los conjugados que tienen el peso molecular y la estructura de enlazador de los conjugados de esta invención tienen una mejor potencia, mejor estabilidad, elevados niveles de AUC, y mayor tiempo de vida media en circulación.

5 En una realización, el factor de coagulación modificado con CTP para su uso de acuerdo a la invención está en la forma de una composición farmacéutica que comprende un portados farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad con eficacia terapéutica del factor de coagulación conjugado. En una realización, una cantidad con eficacia terapéutica de un factor de coagulación conjugado se determina según factores como la afección específica que se trata, la afección del paciente que se trata, así como los otros ingredientes en la composición.

10 15 En otra realización, un factor de coagulación conjugado es útil en la terapia profiláctica de la Hemofilia, reduciendo así el riesgo de hemorragias y complicaciones asociadas. En otra realización, un factor de coagulación conjugado es útil en el tratamiento de sujetos con hemofilia, reduciendo el riesgo de desarrollar anticuerpos inhibidores de factores de coagulación administrados exógenamente. En otra realización, un factor de coagulación conjugado es útil en el tratamiento de sujetos afectados de hemofilia, induciendo así la 20 homeostasis.

25 En una realización, un factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención tiene usos terapéuticos. En otra realización, un factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención tiene usos profilácticos.

30 35 40 45 En otra realización, un factor de coagulación conjugado como se describe en la presente es útil en el tratamiento de sujetos que padecen de hemorragia excesiva o hematomas o que tienen un prolongado tiempo de protrombina (PT) o tiempo de tromboplastina parcial (PTT). En otra realización, un factor de coagulación conjugado para su uso de acuerdo a la invención es útil en el tratamiento de sujetos que tienen una afección adquirida que provoca hemorragias, como la deficiencia de vitamina K o enfermedad hepática. En otra realización, un factor de coagulación conjugado como se describe en la presente es útil en el tratamiento de sujetos que tienen deficiencias en factores de coagulación que se adquieren (debido a otras enfermedades) o se heredan, ligeras o graves, permanentes o temporales. En otra realización, un factor de coagulación conjugado es útil en el tratamiento de sujetos que tienen deficiencias adquiridas debido a enfermedades crónicas, como una enfermedad hepática o cáncer; a una afección aguda como la coagulación intravascular diseminada (DIC), que utiliza factores de coagulación a una velocidad rápida; o a una deficiencia de la vitamina K o un tratamiento con un antagonista de la vitamina K como la warfarina (la producción de los factores II, VII, IX y X requiere de vitamina K). En otra realización, un factor de coagulación conjugado como se describe en la presente es útil en el tratamiento de sujetos que padecen de una enfermedad que provoca desequilibrios en la coagulación tales como: una enfermedad hepática, uremia, un cáncer, un trastorno de la médula ósea, una exposición al veneno de serpiente, una deficiencia de vitamina K, una terapia anticoagulante, una ingestión accidental del anticoagulante warfarina, múltiples transfusiones de sangre (las unidades almacenadas de sangre pierden algunos de sus factores de coagulación), o una combinación de estos.

50 55 60 65 En otra realización, las composiciones de la presente invención son útiles en el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A con inhibidores del FVIII o FIX y en pacientes con hemofilia adquirida; prevención de hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con hemofilia A con inhibidores del FVIII o FIX y en pacientes con hemofilia adquirida; tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con deficiencia congénita de FVII y prevención de hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con deficiencia congénita de FVII. En otra realización, las composiciones de la presente invención son útiles en el tratamiento o prevención de hemorragias musculares. En otra realización, las composiciones de la presente invención son útiles en el tratamiento o prevención de hemorragias articulares. En otra realización, las composiciones de la presente invención son útiles para proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de epistaxis y hemorragias de las encías, hemorragias de las mucosas, hemorragias en el sistema nervioso central. En otra realización, las composiciones de la presente invención son útiles para proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de hemorragias gastrointestinales o cerebrales. En otra realización, las composiciones de la presente invención son útiles para proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de hemorragias leves de baja frecuencia. En otra realización, las composiciones de la presente invención son útiles para proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de hemorragias moderadas de baja frecuencia. En otra realización, las composiciones de la presente invención son útiles para proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de hemorragias leves de alta frecuencia. En otra realización, las composiciones de la presente invención son útiles para proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de hemorragias moderadas de alta frecuencia.

70 En una realización, las composiciones de la presente invención proporcionan tratamiento terapéutico o

profiláctico de la hemofilia asintomática. En otra realización, las composiciones de la presente invención proporcionan tratamiento terapéutico o profiláctico de la hemofilia leve a moderada. En otra realización, las composiciones de la presente invención proporcionan tratamiento terapéutico o profiláctico de la hemofilia grave.

5 En una realización, las composiciones para su uso de acuerdo a la presente invención proporcionan tratamiento terapéutico o profiláctico de la hemorragia, que, en una realización, es una hemorragia incontrolable y, en otra realización, hemorragia intracerebral. En otra realización, las composiciones para su uso de acuerdo a la presente invención proporcionan tratamiento terapéutico o profiláctico de coagulopatías
10 neonatales; enfermedad hepática grave; procedimientos quirúrgicos de alto riesgo; pérdida de sangre por trauma; trasplante de médula ósea; trombocitopenias y trastornos de la función plaquetaria; reversión urgente de la anticoagulación oral; deficiencias congénitas de los factores V, VII, X, y XI; enfermedad de von Willebrand, en una realización, enfermedad de von Willebrand con inhibidores del factor de von Willebrand.

15 En una realización, el sujeto es macho. En otra realización el sujeto es hembra. En una realización, el sujeto es un niño, en otra realización, un adolescente, en otra realización, un adulto o, en otra realización, un sujeto anciano. En otra realización, el sujeto es un sujeto pediátrico, en otra realización, un sujeto geriátrico.

20 Un [(CTP) n >1-factor de coagulación] como se describe en la presente puede comprender un factor de coagulación de longitud completa o un fragmento activo de este conectado por medio de un enlace peptídico en su carboxilo terminal a al menos una unidad de CTP, sin CTP en su amino terminal. Un [(CTP) n >1-factor de coagulación] como se describe en la presente puede comprender, además, un factor de coagulación o un fragmento activo de este conectado por medio de un enlace peptídico a al menos una unidad de CTP que se conecta a una unidad de CTP adicional por medio de un enlace peptídico sin CTP en su amino terminal. En
25 otra realización, una molécula de ácido nucleico codifica un factor de coagulación modificado genéticamente que comprende al menos un CTP unido a su extremo C-terminal y sin CTP en su amino terminal.

30 En otra realización, el CTP se une al factor de coagulación por medio de un enlazador. En otra realización, el enlazador que conecta la secuencia CTP al factor de coagulación es un enlace covalente. En otra realización, el enlazador que conecta la secuencia CTP al factor de coagulación es un enlace peptídico. En otra realización, el enlazador que conecta la secuencia CTP al factor de coagulación es un enlace peptídico sustituido. En otra realización, la secuencia CTP comprende: DPRFQDSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL
35 (sec. con núm. de ident.: 1). En otra realización, la secuencia CTP comprende: SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (sec. con núm. de ident.: 2). En otra realización, la secuencia CTP comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias expuestas en la sec. con núm. de ident.: 1 y la sec. con núm. de ident.: 2.

40 En otra realización, el péptido del carboxilo terminal (CTP) de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos a partir del aminoácido 112 a la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana, como se expone en la sec. con núm. de ident.: 1. En otra realización, la secuencia CTP de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos a partir del aminoácido 118 a la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana, como se expone en la sec. con núm. de ident.: 2. En otra realización, la secuencia CTP además comienza a partir de cualquier posición entre las posiciones 112-118 y termina en la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana. En algunas realizaciones, la secuencia del péptido CTP es de 28, 29, 30, 45 31, 32, 33 o 34 aminoácidos de longitud y comienza en la posición 112, 113, 114, 115, 116, 117 o 118 de la secuencia de aminoácidos del CTP.

50 En otra realización, el péptido CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo por 1-5 sustituciones de aminoácidos conservadoras como se describe en la patente de EE.UU. núm. 5,712,122. En otra realización, el péptido CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo por 1 sustitución de aminoácidos conservadora. En otra realización, el péptido CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo por 2 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra realización, el péptido CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo por 3 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra realización, el péptido CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo por 4 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra realización, el péptido CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo por 5 sustituciones de aminoácidos conservadoras.

60 En otra realización, la secuencia de aminoácidos del péptido CTP de la presente invención es al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %, o al menos 98 % homóloga a la secuencia de aminoácidos del CTP nativo o un péptido de este.

65 En otra realización, el polinucleótido que codifica al péptido CTP de la presente invención es al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %, o al menos 98 % homólogo a la secuencia de ADN del CTP nativo o un fragmento codificante del péptido de esta.

En una realización, al menos una de las secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica puede estar truncada. En otra realización, 2 de las secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica están truncadas. En otra realización, las 3 secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica están truncadas. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 10 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 3. La sec. con núm. de ident.: 3 comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (AA): SSSSKAPPPSLP.

En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 10 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4. En una realización, la sec. con núm. de ident.: 4 comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (AA): SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ.

En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 11 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 12 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 8 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4 o la sec. con núm. de ident.: 3. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 13 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 14 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 6 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4 o la sec. con núm. de ident.: 3. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 5 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4 o la sec. con núm. de ident.: 3.

En una realización, al menos una de las secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica está glicosilada. En otra realización, 2 de las secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica están glicosiladas. En otra realización, las 3 secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica están glicosiladas.

En una realización, la secuencia CTP de la presente invención comprende al menos un sitio de glicosilación. En una realización, la secuencia CTP comprende 2 sitios de glicosilación. En una realización, la secuencia CTP comprende 3 sitios de glicosilación. En una realización, la secuencia CTP comprende 4 sitios de glicosilación. En una realización, una o más de las secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica están completamente glicosiladas. En otra realización, una o más de las secuencias de aminoácidos del CTP de la gonadotropina coriónica están parcialmente glicosiladas. En una realización, parcialmente glicosilado indica que uno de los sitios de glicosilación del CTP está glicosilado. En otra realización, dos de los sitios de glicosilación del CTP están glicosilados. En otra realización, tres de los sitios de glicosilación del CTP están glicosilados.

En algunas realizaciones, la modificación de la secuencia del CTP es ventajosa porque permite el uso de menores dosificaciones. En algunas realizaciones, la modificación de las secuencias del CTP es ventajosa porque permite menos dosificaciones. En algunas realizaciones, la modificación de las secuencias del CTP es ventajosa porque permite un efecto seguro, de acción prolongada.

En algunas realizaciones, "polipéptido", "factor de coagulación modificado genéticamente" o "proteína" como se usan en la presente, abarca polipéptidos nativos (productos de degradación, polipéptidos sintetizados sintéticamente o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, polipéptidos sintetizados sintéticamente), así como peptoides y semipeptoides que son análogos de polipéptidos, que tienen, en algunas realizaciones, modificaciones que hacen que los polipéptidos que comprenden un factor de coagulación sean incluso más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar a las células.

Como se usa en la presente, los términos "aminoácido" o "secuencia de aminoácidos" se entiende que incluyen los 20 aminoácidos de origen natural; los aminoácidos frecuentemente modificados postraduccionalmente *in vivo*, que incluyen, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosforeonina; y otros aminoácidos inusuales que incluyen, , ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. En una realización, "aminoácido" incluye D- y L-aminoácidos.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención se utilizan en agentes terapéuticos que requieren que los polipéptidos que comprenden un factor de coagulación estén en una forma soluble. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más aminoácidos polares naturales o no naturales, que incluyen serina y treonina que son capaces de aumentar la solubilidad del polipéptido debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.

En algunas realizaciones, los factores de coagulación modificados genéticamente de la presente invención se sintetizan bioquímicamente tal como mediante el uso de técnicas estándar en fase sólida. En algunas realizaciones, estos métodos bioquímicos incluyen síntesis exclusiva en fase sólida, síntesis parcial en fase sólida, condensación de fragmentos, o síntesis clásica en solución.

En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteínas recombinantes para generar los factores de coagulación modificados genéticamente de la presente invención. En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de polipéptidos relativamente largos (por ejemplo, más largos que 18-25 aminoácidos). En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la 5 generación de grandes cantidades de los factores de coagulación modificados genéticamente de la presente invención. En algunas realizaciones, las técnicas recombinantes se describen por Bitter y otros, (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier y otros (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89, Brisson y otros (1984) Nature 310:511-514, Takamatsu y otros (1987) EMBO J. 6:307-311, Coruzzi y otros (1984) EMBO J. 10 3:1671-1680 y Brogli y otros, (1984) Science 224:838-843, Gurley y otros (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565 y Weissbach y Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, pp 421-463.

La presente solicitud describe un método para producir un polipéptido del factor IX (FIX) modificado con CTP, que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido del FIX, para producir así un polipéptido del FIX modificado con CTP. 15 La presente solicitud describe un método para producir un polipéptido del factor VIIa (FVIIa) modificado con CTP, que comprende la etapa de unir tres péptidos del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) al carboxilo terminal de dicho polipéptido de FVIIa, para producir así un polipéptido del FVIIa modificado con CTP.

20 En otra realización, los factores de coagulación modificados genéticamente de la presente invención pueden sintetizarse mediante el uso de una molécula polinucleotídica que codifica al polipéptido. En algunas realizaciones, la molécula polinucleotídica que codifica a los factores de coagulación modificados genéticamente de la presente invención se liga a un vector de expresión, que comprende un control de la transcripción de una secuencia reguladora en cis (por ejemplo, secuencia promotora). En algunas 25 realizaciones, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión constitutiva de un factor de coagulación modificado genéticamente, o para dirigir la expresión inducible de los factores de coagulación modificados genéticamente.

30 En una realización, después de la expresión y la secreción, los péptidos señal se escinden de los factores de coagulación modificados genéticamente precursores lo que resulta en los factores de coagulación modificados genéticamente maduros.

35 En algunas realizaciones, los polinucleótidos pueden prepararse mediante el uso de técnicas de PCR, o cualquier otro método o procedimiento conocido por un experto en la técnica. En algunas realizaciones, el procedimiento implica la ligadura de dos secuencias de ADN diferentes (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel y otros, John Wiley & Sons, 1992).

40 En una realización, los polinucleótidos que codifican los factores de coagulación modificados genéticamente se insertan en los vectores de expresión (es decir, una construcción de ácido nucleico) para permitir la expresión del polipéptido recombinante. En una realización, el vector de expresión incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación y la integración en procariotas. En una realización, el vector de expresión incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación y la integración en eucariotas. En una realización, el vector de expresión incluye 45 un vector lanzadera que hace que este vector sea adecuado para la replicación y la integración en procariotas y eucariotas. En algunas realizaciones, los vectores de clonación comprenden secuencias de iniciación de la transcripción y la traducción (por ejemplo, promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y la traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación).

50 Puede usarse una variedad de células procariotas o eucariotas como sistemas de expresión en un huésped para expresar los factores de coagulación. Estas incluyen microorganismos, tales como bacterias transformadas con un ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vector de expresión de ADN cósido que contiene la secuencia codificante del polipéptido; levadura transformada con vectores de expresión recombinante en levaduras que contienen la secuencia codificante del polipéptido; sistemas de 55 células vegetales infectadas con vectores de expresión recombinantes en virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes, como el plásmido Ti, que contiene la secuencia codificante del polipéptido.

60 En algunas realizaciones, se usan sistemas de expresión no bacterianos (por ejemplo, sistemas de expresión en mamíferos, como las células CHO) para expresar los factores de coagulación. En una realización, el vector de expresión usado para expresar los polinucleótidos de la presente invención en células de mamífero es el vector pCI-DHFR que comprende un promotor de CMV y un gen de resistencia a la Noemicita. La construcción del vector pCI-dhfr se describe, según una realización, en el ejemplo 1.

65 En los sistemas bacterianos puede seleccionarse ventajosamente una serie de vectores de expresión en dependencia del uso previsto para el polipéptido expresado. En una realización, se desean grandes

cantidades de polipéptido. Pueden ser convenientes los vectores que dirigen la expresión de altos niveles del producto proteico, posiblemente como una fusión con una secuencia señal hidrofóbica, que dirige el producto expresado hacia el periplasma de las bacterias o el medio de cultivo donde el producto proteico se purifica fácilmente. Ciertas proteínas de fusión se modifican genéticamente con un sitio de escisión específico para ayudar a recuperar el polipéptido. Los vectores que pueden adaptarse a dicha manipulación incluyen la serie 5 pET de los vectores de expresión de *E. coli* [Studier y otros, Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990)].

Se pueden usar sistemas de expresión en levaduras y una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles puede usarse en levaduras como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 10 núm.: 5,932,447. También pueden usarse los vectores que promueven la integración de secuencias de ADN foráneo en el cromosoma de levadura.

El vector de expresión puede incluir, además, secuencias de polinucleótidos adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de numerosas proteínas a partir de un único ARNm tal como un sitio interno de 15 entrada al ribosoma (IRES) y secuencias para la integración genómica del promotor-polipéptido químérico.

Los vectores de expresión adecuados para mamíferos incluyen pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, 20 pNMT81, que están disponibles de Invitrogen, pCI que está disponible de Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles de Strategene, pTRES que está disponible de Clontech, y sus derivados.

En la presente invención se usan vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus de eucariotas tal como los retrovirus. Los vectores de SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. Se describe, además, que los vectores derivados del virus de papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus 25 de Epstein Bar incluyen pHEBO y p205. Otros vectores ilustrativos incluyen pMSG, pAV009/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV-40, promotor tardío de SV-40, promotor de metalotioneína, promotor del virus de tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de la polihedrina, u otros promotores que han demostrado su eficacia para la expresión en células eucariotas.

30 En algunas realizaciones, los vectores virales recombinantes son útiles para la expresión *in vivo* de los factores de coagulación ya que ofrecen ventajas tales como la infección lateral y la especificidad dirigida. En una realización, los vectores virales se producen de manera que no son capaces de propagarse lateralmente; su característica puede ser útil si el propósito deseado es introducir un gen específico solamente en un 35 número localizado de células diana.

Pueden usarse diversos métodos para introducir el vector de expresión a las células. Dichos métodos se describen generalmente en Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor 40 Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang y otros, Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega y otros, Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa y otros [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e 45 infección con vectores virales recombinantes. Además, véase las patentes de EE.UU. núms. 5,464,764 y 5,487,992 para los métodos de selección positiva-negativa.

Se apreciará que aparte de contener los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica al polipéptido), la construcción de expresión de la presente invención puede incluir, además, secuencias modificadas genéticamente para optimizar la estabilidad, la 50 producción, la purificación, el rendimiento o la actividad del polipéptido expresado.

En algunas realizaciones, las células transformadas se cultivan en condiciones eficaces, que permitan la expresión de grandes cantidades de factores de coagulación recombinantes modificados genéticamente. En 55 algunas realizaciones, las condiciones de cultivo eficaces incluyen medios eficaces, condiciones del biorreactor, temperatura, pH y oxígeno que permitan la producción de proteínas. En una realización, un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el cual se cultiva una célula para producir el polipéptido recombinante de la presente invención. En algunas realizaciones, un medio típicamente incluye una solución acuosa que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables, y sales, minerales, metales y otros nutrientes adecuados, como las vitaminas. En algunas realizaciones, las células pueden cultivarse en 60 biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas Petri. En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno adecuados para una célula recombinante. La determinación de las condiciones de cultivo está dentro de la experiencia de un experto en la técnica.

65 En dependencia del sistema de vector y huésped usado para la producción, los factores de coagulación modificados genéticamente resultantes de la presente invención lo mismo permanecen dentro de la célula

recombinante, se secretan hacia el medio de fermentación, se secretan hacia un espacio entre dos membranas celulares, tal como el espacio periplasmático en *E. coli*; o son retenidos en la superficie externa de una membrana celular o viral.

- 5 En una realización, después de un tiempo predeterminado en cultivo, se lleva a cabo la recuperación del factor de coagulación recombinante modificado genéticamente.

La frase "recuperar el factor de coagulación recombinante modificado genéticamente" que se usa en la 10 presente puede referirse a recolectar todo el medio de fermentación que contiene el polipéptido y no necesariamente implica etapas adicionales de separación o purificación.

En una realización, los factores de coagulación modificados genéticamente de la presente invención se 15 purifican mediante el uso de una variedad de técnicas estándar de purificación de proteínas, tales como, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía por interacciones hidrofóbicas, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía con concanavalina A, cromatoenfoque y solubilización diferencial.

En una realización, para facilitar la recuperación, la secuencia codificante expresada puede modificarse 20 genéticamente para codificar el factor de coagulación modificado genéticamente de la presente invención y un resto escindible fusionado. En una realización, una proteína de fusión puede diseñarse de manera que el polipéptido se pueda aislar fácilmente mediante cromatografía de afinidad; por ejemplo, mediante inmovilización en una columna específica para el resto escindible. En una realización, un sitio de escisión se 25 modifica genéticamente entre el factor de coagulación modificado genéticamente y el resto escindible y el polipéptido puede liberarse de la columna cromatográfica mediante el tratamiento con una enzima o agente adecuados que escindan específicamente la proteína de fusión en este sitio [por ejemplo, véase Booth y otros, Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); y Gardella y otros, J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].

En una realización, el factor de coagulación modificado genéticamente de la presente invención se recupera 30 en una forma "sustancialmente pura".

En una realización, la frase "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la 35 proteína en las aplicaciones descritas en la presente.

En una realización, el factor de coagulación modificado genéticamente de la presente invención puede sintetizarse, además, mediante el uso de sistemas de expresión *in vitro*. En una realización, los métodos de síntesis *in vitro* se conocen bien en la técnica y los componentes del sistema están disponibles comercialmente.

En algunas realizaciones, los factores de coagulación recombinantes modificados genéticamente se 40 sintetizan y purifican; su eficacia terapéutica puede analizarse *in vivo* o *in vitro*. En una realización, las actividades de unión de los factores de coagulación recombinantes modificados genéticamente pueden determinarse mediante el uso de diversos ensayos como conoce el experto en la técnica.

En la presente se describe que el factor de coagulación modificado genéticamente puede proporcionarse al 45 individuo *per se*. En una realización, el factor de coagulación modificado genéticamente de la presente invención puede proporcionarse al individuo como parte de una composición farmacéutica donde se mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los 50 ingredientes activos descritos en la presente con otros componentes químicos como los portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En otra realización, "ingrediente activo" se refiere a la secuencia polipeptídica de interés, que es responsable 55 del efecto biológico.

La descripción proporciona preparaciones combinadas donde "una preparación combinada" define especialmente un "estuche de partes" en el sentido de que las parejas de combinación como se definió anteriormente pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas 60 con cantidades características de las parejas de combinación, es decir, de manera simultánea, concurrente, separada o secuencial. Las partes del estuche de partes pueden administrarse después, por ejemplo, simultánea o cronológicamente escalonadas, o sea, en puntos de tiempo diferentes y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del estuche de partes. La relación de las cantidades totales de las parejas de combinación puede administrarse en la preparación combinada. La preparación combinada 65 puede variarse, por ejemplo, para hacer frente a las necesidades de una subpoblación de pacientes que se va a tratar o a las necesidades del paciente individual en el cual las diferentes necesidades pueden deberse

a una enfermedad en particular, a la severidad de una enfermedad, la edad, el sexo, o el peso corporal como puede realizar fácilmente un experto en la técnica.

5 En otra realización, las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" que se usan indistintamente se refieren a un portador o un diluyente que no provoca una irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. En estas frases se incluye un adyuvante. En una realización, uno de los ingredientes incluidos en el portador farmacéuticamente aceptable puede ser por ejemplo polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio intervalo de solubilidad tanto en medios orgánicos como acuosos (Mutter y otros (1979)).

10 10 En otra realización, "excipiente" se refiere a una sustancia inerte que se añade a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. En una realización, los excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados celulósicos, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

15 15 Las técnicas para la formulación y la administración de fármacos se encuentran en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

20 20 Esta invención contempla varias realizaciones de los intervalos de dosificación. La dosificación del factor de coagulación modificado genéticamente de la presente invención, en una realización, está en el intervalo de 0,005-100 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,005-5 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,01-50 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,1-20 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,1-10 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,01-5 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,001-0,01 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,001-0,1 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,1-5 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,5-50 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,2-15 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,8-65 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 1-50 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 5-10 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 8-15 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 10-20 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 20-40 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 60-120 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 12-40 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 40-60 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 50-100 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 1-60 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 5-10 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 55-65 mg/día.

40 40 En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 50-500 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 50-150 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 100-200 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 150-250 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 200-300 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 250-400 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 300-500 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 350-500 mg/día.

45 45 En una realización, la dosificación es 20 mg/día. En una realización, la dosificación es 30 mg/día. En una realización, la dosificación es 40 mg/día. En una realización, la dosificación es 50 mg/día. En una realización, la dosificación es 0,01 mg/día. En otra realización, la dosificación es 0,1 mg/día. En otra realización, la dosificación es 1 mg/día. En otra realización, la dosificación es 0,530 mg/día. En otra realización, la dosificación es 0,05 mg/día. En otra realización, la dosificación es 50 mg/día. En otra realización, la dosificación es 10 mg/día. En otra realización, la dosificación es 20-70 mg/día. En otra realización, la dosificación es 5 mg/día.

55 55 En una realización, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es 1-5 mg/día. En una realización, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es 1-3 mg/día. En otra realización, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es 2 mg/día.

60 60 En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/día. En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/2 días. En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/3 días. En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/4 días. En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/5 días. En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/6 días. En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/semana. En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/9 días. En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/11 días. En otra realización, la dosificación es 1-90 mg/14 días.

65 65 En otra realización, la dosificación del factor de coagulación es 10-50 mg/día. En otra realización, la dosificación es 10-50 mg/2 días. En otra realización, la dosificación es 10-50 mg/3 días. En otra realización, la dosificación es 10-50 mg/4 días. En otra realización, la dosificación es 10-50 microgramos mg/5 días. En

otra realización, la dosificación es 10-50 mg/6 días. En otra realización, la dosificación es 10-50 mg/semana. En otra realización, la dosificación es 10-50 mg/9 días. En otra realización, la dosificación es 10-50 mg/11 días. En otra realización, la dosificación es 10-50 mg/14 días.

- 5 En otra realización, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se formula en una forma de dosificación intranasal. En otra realización, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se formula en una forma de dosificación inyectable. En otra realización, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0,0001 mg a 0,6 mg. En otra realización, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0,001 mg a 0,005 mg. En otra realización, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0,005 mg a 0,01 mg. En otra realización, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0,01 mg a 0,3 mg. En otra realización, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0,2 mg a 0,6 mg. En otra realización, el factor de coagulación está libre de CTP en su amino terminal.

Se describe que un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 1-100 microgramos, o en una dosis en el intervalo de 10-80 microgramos, o en una dosis en el intervalo de 20-60 microgramos, o en una dosis en el intervalo de 10-50 microgramos, o en una dosis en el intervalo de 40-80 microgramos, o en una dosis en el intervalo de 10-30 microgramos, o en una dosis en el intervalo de 30-60 microgramos.

25 En otra realización, un polipéptido que comprende el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0,2 mg a 2 mg, o en una dosis en el intervalo de 2 mg a 6 mg, o en una dosis en el intervalo de 4 mg a 10 mg, o en una dosis en el intervalo de 5 mg y 15 mg.

En una realización, la dosificación del FIX modificado con CTP comprende el 50 % de la cantidad de FIX administrado en la dosificación recomendada del FIX recombinante (por ejemplo, Benefix®, Wyeth o Mononine®, CSL Behring) a los pacientes durante el mismo periodo de tiempo. En una realización, la dosificación del FVIIa modificado con CTP comprende el 50 % de la cantidad de FVIIa administrado en la dosificación recomendada del FVIIa recombinante (por ejemplo, NovoSeven®) a los pacientes durante el mismo periodo de tiempo. En una realización, la dosificación del FVII modificado con CTP comprende el 50 % de la cantidad de FVII administrado en la dosificación recomendada del FVII recombinante a los pacientes durante el mismo periodo de tiempo. Por ejemplo, si NovoSeven® se administra a una dosis de 90 mcg/kg cada dos horas a un paciente pre- o postoperatorivamente (es decir, 7,65 mg cada dos horas o 45,9 mg en seis dosis en un periodo de 12 horas, para un paciente de 85 kg), un factor de coagulación modificado con CTP de la presente invención puede administrarse a una dosis que es el 50 % de la dosis de FVIIa recombinante en 12 horas de un paciente (es decir, a una dosis de 23 mg administrados una vez en un periodo de 12 horas).

En otra realización, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es de manera que contiene el 45 % de la cantidad del factor de coagulación que se administra cuando se usa el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra realización, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es de manera que contiene el 10 % de la cantidad del factor de coagulación que se administra cuando se usa el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra realización, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es de manera que contiene el 25 % de la cantidad del factor de coagulación que se administra cuando se usa el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra realización, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es de manera que contiene el 35 % de la cantidad del factor de coagulación que se administra cuando se usa el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra realización, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es de manera que contiene el 75 % de la cantidad del factor de coagulación que se administra cuando se usa el factor de coagulación sin modificación con CTP. En otra realización, la dosificación del factor de coagulación modificado con CTP es de manera que contiene el 100 % de la cantidad del factor de coagulación que se administra cuando se usa el factor de coagulación sin modificación con CTP. Sin embargo, incluso si la dosificación contiene la misma cantidad del factor de coagulación (por ejemplo, FIX) que el factor de coagulación sin modificación con CTP, todavía es ventajosa para los sujetos en el hecho de que se administrará menos frecuentemente debido a su mayor tiempo de vida media en comparación con los factores de coagulación recombinantes.

60 En otra realización, una cantidad con eficacia terapéutica de un factor de coagulación conjugado está entre 50-500 UI por kg de peso corporal administrada una vez al día a una vez a la semana para FIX o 10 µg/Kg-500 µg/Kg para FVIIa. En otra realización, una cantidad con eficacia terapéutica de un factor de coagulación conjugado es 150-250 UI por kg de peso corporal, administrada una vez al día. En otra realización, una composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación conjugado se formula a una concentración eficaz para la administración mediante diversos medios a un paciente humano.

- En una realización, FIX se administra en una cantidad eficaz para llevar la actividad del Factor IX circulante a 20-30 UI/dl en un sujeto. En otra realización, FIX se administra en una cantidad eficaz para llevar la actividad del Factor IX circulante a 25-50 UI/dl en un sujeto. En otra realización, FIX se administra en una cantidad eficaz para llevar la actividad del Factor IX circulante a 50-100 UI/dl en un sujeto. En otra realización, FIX se administra en una cantidad eficaz para llevar la actividad del Factor IX circulante a 100-200 UI/dl en un sujeto. En otra realización, FIX se administra en una cantidad eficaz para llevar la actividad del Factor IX circulante a 10-50 UI/dl en un sujeto. En otra realización, FIX se administra en una cantidad eficaz para llevar la actividad del Factor IX circulante a 20-100 UI/dl en un sujeto.
- En una realización, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto semanalmente. En otra realización, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto dos veces a la semana. En otra realización, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto bisemanalmente (una vez cada dos semanas). En otra realización, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto dos veces al mes. En otra realización, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto una vez al mes. En otra realización, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto diariamente. En otra realización, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto cada dos días.
- En otra realización, el factor de coagulación modificado con CTP se administra a un sujeto una vez cada tres días, una vez cada cuatro días, una vez cada cinco días, una vez cada seis días, una vez cada 7-14 días, una vez cada 10-20 días, una vez cada 5-15 días, o una vez cada 15-30 días.
- Se describe que, la presente invención proporciona una manera para reducir la frecuencia requerida de dosificación de un polipéptido del factor IX (FIX) o de un polipéptido del factor VIIa (FVIIa).
- Se describe que la invención da como resultado aumentar la satisfacción en el uso de la terapia con factores de coagulación. El término satisfacción comprende adherencia. Se describe, además, que la invención aumenta la satisfacción de los pacientes con necesidad de una terapia con factores de coagulación mediante la reducción de la frecuencia de administración del factor de coagulación. Se describe, además, que la reducción en la frecuencia de administración del factor de coagulación se logra debido a las modificaciones con CTP que hacen que el factor de coagulación modificado con CTP sea más estable. Se describe, además, que la reducción en la frecuencia de administración del factor de coagulación se logra como resultado de aumentar el T_½ del factor de coagulación. Se describe, además, que la reducción en la frecuencia de administración del factor de coagulación se logra como resultado de aumentar el tiempo de aclaramiento o reducir la velocidad de aclaramiento del factor de coagulación.
- Se describe que, la reducción en la frecuencia requerida de administración del factor de coagulación se logra como resultado de aumentar la medida de AUC del factor de coagulación.
- En otra realización, la presente invención muestra que las composiciones proporcionadas en la presente sorprendentemente se absorben más eficazmente hacia el torrente sanguíneo después de la administración SC (véase los ejemplos 7-9 en la presente). La posibilidad de administrar el FVIIa por vía subcutánea constituye una ventaja ya que puede usarse para aplicaciones profilácticas. Además, es mucho más fácil que los pacientes se inyecten ellos mismos las inyecciones subcutáneas, y son una ventaja cuando los pacientes son muy jóvenes y sus venas son pequeñas y difíciles de encontrar.
- La administración oral, en una realización, comprende una forma de dosificación unitaria que comprende tabletas, cápsulas, pastillas, tabletas masticables, suspensiones, emulsiones y similares. Dichas formas de dosificación unitaria comprenden una cantidad segura y eficaz del factor de coagulación deseado de la invención, cada una de las cuales es, en una realización, de aproximadamente 0,7 o 3,5 mg a aproximadamente 280 mg/70 kg, o en otra realización, aproximadamente 0,5 o 10 mg a aproximadamente 210 mg/70 kg. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de las formas de dosificación unitaria para la administración peroral se conocen bien en la técnica. En algunas realizaciones, las tabletas comprenden típicamente adyuvantes farmacéuticamente compatibles convencionales como diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, manitol, lactosa y celulosa; aglutinantes como almidón, gelatina y sacarosa; desintegrantes como almidón, ácido algínico y croscarmelosa; lubricantes como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. En una realización, los deslizantes como el dióxido de silicio pueden usarse para mejorar las características de flujo de la mezcla en polvo. En una realización, pueden añadirse agentes colorantes, tal como los colorantes FD&C para la apariencia. Los agentes edulcorantes y saborizantes, tales como aspartamo, sacarina, mentol, menta y saborizantes de frutas, son adyuvantes útiles para las tabletas masticables. Típicamente las cápsulas comprenden uno o más diluyentes sólidos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, la selección de los componentes portadores depende de consideraciones secundarias como el gusto, el costo y la estabilidad en almacenaje, que no son críticos para los propósitos de esta invención, y puede realizarse fácilmente por un experto en la técnica.

En una realización, la forma de dosificación oral comprende un perfil de liberación predefinido. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende unas tabletas, cápsulas, pastillas o tabletas masticables de liberación prolongada. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende tabletas, cápsulas, pastillas o tabletas masticables de liberación lenta. En una realización, la forma de dosificación oral comprende tabletas, cápsulas, pastillas o tabletas masticables de liberación inmediata. En una realización, la forma de dosificación oral se formula según el perfil de liberación deseado del ingrediente activo farmacéutico como conoce un experto en la técnica.

10 Las composiciones perorales, en algunas realizaciones, comprenden soluciones, emulsiones, suspensiones líquidas, y similares. En algunas realizaciones, los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de tales composiciones se conocen bien en la técnica. En algunas realizaciones, las composiciones orales líquidas comprenden de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,933 % del compuesto o compuestos deseados, o en otra realización, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 15 10 %.

20 En algunas realizaciones, las composiciones para uso médico de esta invención comprenden soluciones o emulsiones, que pueden ser soluciones o emulsiones acuosas que comprenden una cantidad segura y eficaz de los compuestos de la presente invención y opcionalmente, otros compuestos, previstos para una administración intranasal tópica. En algunas realizaciones, las composiciones h comprenden de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 10,0 % en p/v de un compuesto objetivo, con mayor preferencia de aproximadamente 00,1 % a aproximadamente 2,0, que se usa para la administración sistémica de los compuestos mediante la vía intranasal.

25 En otra realización, el factor de coagulación modificado con CTP puede inyectarse en el músculo (inyección intramuscular), o puede inyectarse debajo de la piel (inyección subcutánea), o puede inyectarse en el músculo, o puede inyectarse en la piel, o puede administrarse por medio de administración sistémica, o puede administrarse por inyección intravenosa. En otra realización, la administración puede ser administración parenteral, pulmonar, oral, tópica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, 30 subcutánea, intranasal, transnasal, intraocular, oftálmica, epidural, bucal, rectal, transmucosal, intestinal o parenteral, que incluye inyecciones intramedulares, así como administración intratecal o intraventricular directa.

35 En otra realización, la preparación se administra de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, por medio de la inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente.

En una realización, la vía de administración puede ser enteral. En otra realización, la vía puede ser conjuntival, transdérmica, intradérmica, intraarterial, vaginal, rectal, intratumoral, paracancerel, transmucosal, intramuscular, intravascular, intraventricular, intracranial, intranasal, sublingual, o una combinación de estas.

40 En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por inyección intravenosa, intraarterial, o intramuscular de una preparación líquida. En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En una realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa, y se formulan por lo tanto en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intraarterial y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intramuscular, y se formulan por lo tanto en una forma adecuada para la administración intramuscular.

50 Además, en otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran de manera tópica a las superficies corporales, y se formulan por lo tanto en una forma adecuada para la administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, ungüentos, cremas, lociones, gotas y similares. Para la administración tópica, los compuestos de la presente invención se combinan con un agente o agentes terapéuticos adecuados adicionales, preparados y aplicados como soluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un portador farmacéutico.

60 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se fabrican mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, producción de grajeas, levigación, emulsión, encapsulado, atrapamiento o liofilización.

65 En una realización, las composiciones farmacéuticas para usar según la presente invención se formulan de una manera convencional mediante el uso de uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en las preparaciones, las cuales pueden usarse farmacéuticamente. En una realización, la formulación depende de la vía de administración escogida.

- En una realización, los inyectables de la invención se formulan en soluciones acuosas. En una realización, los inyectables de la invención se formulan en tampones fisiológicamente compatibles como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón de solución salina fisiológica. En algunas realizaciones, para la administración transmucosal, en la formulación se usan penetrantes adecuados para la barrera que se va a penetrar. Dichos penetrantes generalmente se conocen en la técnica.
- En una realización, las preparaciones descritas en la presente se formulan para una administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección por bolo o infusión continua. En algunas realizaciones, las formulaciones para inyección se presentan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis con opcionalmente, un conservante adicionado. En algunas realizaciones, las composiciones son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.
- Las composiciones comprenden, además, en algunas realizaciones, conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal y similares; agentes quelantes, como edetato de sodio y otros; tampones como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad como cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerina, manitol y otros; antioxidantes como ácido ascórbico, acetilcistina, metabisulfito de sodio y otros; agentes aromáticos; agentes de ajuste de la viscosidad, tales como polímeros, que incluyen celulosa y derivados de esta; y polivinil alcohol y ácidos y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas según se necesite. Las composiciones comprenden, además, en algunas realizaciones, anestésicos locales u otros activos. Las composiciones pueden usarse como aerosoles, neblinas, gotas y similares.
- En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos, en algunas realizaciones, se preparan como suspensiones adecuadas para inyección basadas en aceite o agua. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen, en algunas realizaciones, aceites grasos como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección contienen, en algunas realizaciones, sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. En otra realización, la suspensión contiene, además, estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.
- En otra realización, el compuesto activo puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat y otros, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez- Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pp. 353-365 (1989); Lopez- Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; J. E. Diederichs y al., *Pharm. /nd.* 56 (1994) 267- 275).
- En otra realización, la composición farmacéutica suministrada en un sistema de liberación controlada se formula para la infusión intravenosa, bomba osmótica implantable, parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración. En una realización, se usa una bomba (véase Langer, más arriba; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald y otros, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek y otros, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos. Aún en otra realización, un sistema de liberación controlada puede colocarse próximo al blanco terapéutico, por ejemplo, el cerebro, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, más arriba, vol. 2, pp. 115-138 (1984). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (*Science* 249: 1527-1533 (1990)).
- En algunas realizaciones, el ingrediente activo está en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, solución a base de agua, estéril, libre de pirógenos, antes del uso. Las composiciones se formulan, en algunas realizaciones, para la administración por atomización e inhalación. En otra realización, las composiciones están contenidas en un contenedor con medios de atomización adheridos.
- En una realización, la preparación de la presente invención se formula en composiciones rectales tal como supositorios o enemas de retención, mediante el uso, por ejemplo, de bases convencionales de supositorios tal como manteca de cacao u otros glicéridos.
- En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas adecuadas para usar en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos se contienen en una cantidad eficaz para lograr el propósito deseado. En algunas realizaciones, una cantidad con eficacia terapéutica significa una cantidad de ingredientes activos eficaces para usar en la prevención, alivio o mejoría de los síntomas de una enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se trata.
- En una realización, la determinación de una cantidad con eficacia terapéutica está dentro de la habilidad de los expertos en la técnica.

Algunos ejemplos de sustancias que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables o componentes de estos son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa, y 5 metilcelulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; lubricantes sólidos, tales como ácido esteárico y estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, tales como aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de theobroma; polioles tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido algínico; emulsionantes, tales como los emulsionantes de la marca Tween™; agentes humectantes, tales como lauril sulfato de sodio; agentes 10 colorantes; agentes saborizantes; agentes de formación de tabletas, estabilizadores; antioxidantes; conservantes; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; y soluciones tampón de fosfato. La elección de un portador farmacéuticamente aceptable para usarse junto con el compuesto se determina básicamente por la manera en que el compuesto se va a administrar. Si el compuesto objetivo es para inyectar, en una 15 realización, el portador farmacéuticamente aceptable es solución salina fisiológica, estéril, con un agente de suspensión compatible con la sangre, cuyo pH se ha ajustado a aproximadamente 7,4.

Adicionalmente, las composiciones pueden comprender además aglutinantes (por ejemplo acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma de guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil metil celulosa, 20 povidona), agentes desintegrantes (por ejemplo almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma de guar, glicolato de almidón sódico), tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) de varios pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para prevenir la absorción a superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de 25 ácidos biliares), inhibidores de proteasas, tensoactivos (por ejemplo, lauril sulfato de sodio), potenciadores de la permeación, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, glicerol de polietileno), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico, hidroxianisol butilado), estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmel celulosa), agentes que aumentan la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma de guar), edulcorantes (por ejemplo aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo 30 ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, lauril sulfato de sodio), adyuvantes de flujo (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo carbómero, hidroxipropilcelulosa, laurilsulfato sódico), recubrimientos de polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formadores de película (por ejemplo etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

35 Los componentes típicos de los portadores para jarabes, elíxires, emulsiones y suspensiones incluyen etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, sacarosa líquida, sorbitol y agua. Para una suspensión, los agentes de suspensión típicos incluyen metil celulosa, carboximetilcelulosa sódica, celulosa (por ejemplo, Avicel™, RC-591), tragacanto y alginato de sodio; los agentes humectantes típicos incluyen lecitina y sorbitán de óxido de polietileno (por ejemplo, polisorbato 80). Los conservantes típicos incluyen metil parabeno y benzoato de 40 sodio. En otra realización, las composiciones líquidas perorales contienen, además, uno o más componentes tales como edulcorantes, agentes saborizantes y colorantes descritos anteriormente.

45 En algunas realizaciones, la preparación de una cantidad o dosis eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. En una realización, una dosis puede formularse en modelos animales y dicha información puede usarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los seres humanos.

En una realización, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritas en la presente 50 puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. En una realización, los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y en cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para usar en el ser humano. En una realización, las dosificaciones varían en dependencia de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y dosificación 55 puede ser elegida por el médico individual teniendo en cuenta la afección del paciente. (Ver, por ejemplo, Fingl y otros, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", C. 1 p.1].

55 En dependencia de la severidad y la capacidad de respuesta de la afección que se va a tratar, la dosificación puede ser de una única administración o una pluralidad de ellas, donde un curso de tratamiento puede durar de varios días a varias semanas o hasta que se logre la cura o la diminución del estado de la enfermedad.

60 La cantidad de una composición que se va a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se trata, la severidad de la afección, la manera de administración, el criterio del médico responsable, etcétera.

En una realización, las composiciones que incluyen la preparación de la presente invención formulada en un 65 portador farmacéutico compatible se preparan, además, colocadas en un contenedor adecuado, y marcado para el tratamiento de una afección indicada.

- En otra realización, un factor de coagulación como se describe en la presente es una preparación liofilizada (es decir, secada por congelación) en combinación con excipientes orgánicos complejos y estabilizadores tales como agentes tensoactivos no iónicos (es decir, surfactantes), diversos azúcares, polioles orgánicos y/o albúmina sérica humana. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un factor de coagulación liofilizado como se describe en agua estéril para inyección. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un factor de coagulación liofilizado como se describe en PBS estéril para inyección. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un factor de coagulación liofilizado como se describe en NaCl al 0,9 % estéril para inyección.
- 5 En otra realización, la composición farmacéutica comprende el factor de coagulación modificado con CTP como se describe en la presente y portadores complejos como albúmina sérica humana, polioles, azúcares y agentes estabilizantes tensoactivos aniónicos. En otra realización, la composición farmacéutica comprende el factor de coagulación modificado con CTP como se describe en la presente y ácido lactobiónico y un tampón de acetato/glicina. En otra realización, la composición farmacéutica comprende el factor de coagulación modificado con CTP como se describe en la presente y aminoácidos, tal como arginina o glutamato que aumentan la solubilidad de las composiciones de interferón en agua. En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación modificado con CTP, liofilizado, como se describe en la presente y glicina o albúmina sérica humana (HSA), un tampón (por ejemplo, acetato) y un agente isotónico (por ejemplo, NaCl). En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación modificado con CTP, liofilizado, como se describe en la presente y tampón fosfato, glicina y HSA.
- 10 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente se estabiliza cuando se coloca en soluciones tamponadas que tienen un pH entre aproximadamente 4 y 7,2. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación está en una solución tamponada que tiene un pH entre aproximadamente 4 y 8,5. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación está en una solución tamponada que tiene un pH entre aproximadamente 6 y 7. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación está en una solución tamponada que tiene un pH de aproximadamente 6,5. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente se estabiliza con un aminoácido como un agente estabilizante y en algunos casos una sal (si el aminoácido no contiene una cadena lateral cargada).
- 15 25 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente es una composición líquida que comprende un agente estabilizante entre aproximadamente 0,3 % y 5 % en peso el cual es un aminoácido.
- 30 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente proporciona precisión de la dosificación y seguridad del producto. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente proporciona una formulación líquida, estable, biológicamente activa, para usar en aplicaciones inyectables. En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación no liofilizado como se describe en la presente.
- 35 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente proporciona una formulación líquida que permite el almacenamiento durante un periodo de tiempo largo en un estado líquido que facilita el almacenamiento y el envío antes de su administración.
- 40 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra realización, la composición farmacéutica inyectable que comprende un factor de coagulación como se describe en la presente comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra realización, la producción de micropartículas de lípidos mediante congelación por pulverización se describió por Speiser (Speiser y al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54) seguido por nanogranulos de lípidos para la administración peroral (Speiser EP 0167825 (1990)). En otra realización, los lípidos que se usan se toleran bien por el cuerpo (por ejemplo, glicéridos compuestos de ácidos grasos que están presentes en las emulsiones para la nutrición parenteral).
- 45 50 En otra realización, las composiciones para su uso de acuerdo a la presente invención pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un estuche aprobado por la FDA, que contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. En una realización, el envase, por ejemplo, comprende una lámina de metal o plástico, tal como un blister. En una realización, el envase o dispositivo dispensador se acompaña de instrucciones para la administración. En una realización, el envase o dispensador incluye un aviso asociado con el contenedor en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de los productos farmacéuticos, dicho aviso es reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicho aviso, en una realización, es el etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para los fármacos controlados, o el prospecto del producto aprobado.
- 55 60 65

5 Se apreciará que los factores de coagulación para su uso de acuerdo a la presente invención pueden proporcionarse al individuo con agentes activos adicionales para lograr un mejor efecto terapéutico en comparación con el tratamiento con cada agente por sí mismo. En otra realización, se toman medidas (por ejemplo, la dosificación y la selección del agente complementario) para evitar los efectos secundarios adversos que se asocian con las terapias de combinación.

10 Como se conoce generalmente en la técnica, los péptidos y proteínas modificados de la invención pueden acoplarse a marcas, fármacos, agentes de direccionamiento, portadores, soportes sólidos y similares, en dependencia de la aplicación deseada. Las formas marcadas de los agentes biológicos modificados pueden usarse para seguir su destino metabólico; los marcas adecuados para este propósito incluyen, especialmente, marcas con radioisótopos tales como yodo 131, tecnecio 99, indio 111, y similares. Los marcas pueden usarse, además, para mediar la detección de las proteínas o péptidos modificados en sistemas de ensayo; en este caso, también pueden usarse los radioisótopos, así como marcas con 15 enzimas, marcas fluorescentes, marcas cromogénicas y similares. El uso de tales marcas es particularmente útil si el péptido o la proteína es en sí mismo un agente de direccionamiento tal como un anticuerpo o un ligando de un receptor.

20 Pueden emplearse técnicas de unión similares, junto con otras, para acoplar los péptidos y proteínas modificados de la invención a soportes sólidos. Cuando se acoplan, estos péptidos y proteínas modificados pueden usarse después como reactivos de afinidad para la separación de componentes deseados con los que se muestra una reacción específica.

25 Otros objetos, ventajas y características novedosas de la presente invención resultarán evidentes para una persona experta en la técnica luego del análisis de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se expone en la presente descripción y como se reivindica en la sección de reivindicaciones más abajo encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

30 EJEMPLOS

Generalmente, la nomenclatura usada en la presente y los procedimientos de laboratorio utilizados en la 35 presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican ampliamente en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y otros, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y otros, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y otros, "Recombinant ADN", Scientific American Books, Nueva York; Birren y otros (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva 40 York (1998); metodologías como se exponen en las patentes de EE.UU. núms. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y otros (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8va Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi 45 (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la literatura científica y de patentes, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. núms. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 y 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical 50 Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y otros, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales.

55 Ejemplo 1

Generación y utilización del Factor de coagulación IX

60 Clonaje y expresión de la molécula de FIX recombinante:

Los clones del factor IX se construyeron en nuestro vector de expresión en eucariota pCI-neo (Promega, núm. de catálogo E1841). El clon del ORF del factor de coagulación IX de *Homo sapiens* se solicitó a 65 "OriGene" (RC219065). Los cebadores se solicitaron a Sigma-Genosys.

Construcción de 301-1-pCI-neo-p200-11 (Factor IX-ctp x2):

Cebador 101: 5' GTTTAGTGAACCGTCAGAAT 3' (sec. con núm. de ident.: 36)

5 Cebador 103^R: 5' TTGAGGAAGATGTTCGTGTA 3' (contiene el sitio de Sspl del factor IX) (sec. con núm. de ident.: 37)

10 Se realizó una reacción de PCR con el cebador 101 y el cebador 103^R y ADN plasmídico, el clon de ADNc del factor IX (OriGene" RC219065) como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 1085 pb (pcr 10) y se purificó a partir del gel (el fragmento que contenía el amino terminal de la secuencia del factor IX).

Cebador 98: 5' ATTACAGTTGTCGCAGGTGA 3' (sec. con núm. de ident.: 38)

15 Cebador 99^R: 5' GCTGGAGCTAGTGAGCTTGTGTTTCTT 3' (sec. con núm. de ident.: 39)

Cebador 100: 5' GCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCC 3' (sec. con núm. de ident.: 40)

20 Cebador 27^R: 5' TTTCACTGCATTCTAGTTGTGG 3' (sec. con núm. de ident.: 41)

20 Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 98 y el cebador 99^R y ADN plasmídico, el clon de ADNc del factor IX (OriGene", RC219065) como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 540 pb.

25 La segunda reacción se realizó con el cebador 100 y el cebador 27^R y ADN plasmídico de 402-2-p72-3 (hGH-CTP-CTP) como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 258 pb.

30 La última reacción (pcr 3) se realizó con los cebadores 98 y 27^R y una mezcla de los productos de las dos reacciones anteriores como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 790 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se aisló el fragmento de Sspl - EcoRI (TA 3-3).

35 Otra reacción de PCR se realizó (pcr 12) con el cebador 101 y el cebador 27^R y una mezcla de los productos de la pcr 10 y el fragmento de Sspl-EcoRI de la pcr 3 como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 1700 pb (Factor IX-ctp-ctp) y se ligó al vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01) (lig 180).

40 Se encontró un error en la secuencia del factor IX por lo que los fragmentos se volvieron a colocar para formar un inserto del Factor IX-ctp-ctp con la secuencia de ADN correcta.

40 TA- pcr 3-3 se digirió con Sspl y XbaI y se aisló el fragmento grande (vector). TA 180-4 se digirió con Sspl y XbaI y se aisló el fragmento pequeño (inserto) y se ligó al fragmento grande aislado de TA-pcr-3-3digerido con Sspl y XbaI. El nuevo plásmido TA-183-2 se digirió con Sal I y NotI, y se aisló el inserto Factor IX-CTP-CTP (~1575 pb). Este fragmento se insertó en el vector de expresión pCI-neo de eucariotas (digerido con Sal I y Not I) para producir el clon 301-2-p200-11.

Construcción pCI-dhfr -Factor 9- ctpx2 (p223-4): El vector pCI-dhfr (p6-1) se digirió con SmaI y NotI. Factor IX-CTP-CTP (p200-11) se digirió con ASisI F.I. y NotI. Los dos fragmentos se ligaron.

50 Construcción pCI-dhfr Factor 9-ctp x3 (p225-7): El vector pCI-dhfr OXM-CTP×3 (p216-4) se digirió con XbaI y Apal. El factor IX-CTP-CTP (223-4) se digirió con XbaI y Apal. Los dos fragmentos se ligaron.

55 Construcción pCI-dhfr Factor 9-ctp x3 T148A (p243-2): El plásmido p225-7 contenía treonina en la posición 148, dado que la versión más común del FIX contiene alanina en esta posición, la Thr se reemplazó por Ala mediante el uso del método de mutagénesis dirigida a un sitio.

Cebador 75: ctcccagttcaattacagct (sec. con núm. de ident.: 42)

60 Cebador 122r: ggaaaaactgcctcagcacgggtgagc (sec. con núm. de ident.: 43)

Cebador 123: gtgctgaggcagtttcctgtatgtggactat (sec. con núm. de ident.: 44)

Cebador 124r: caacacagtggcagcag (sec. con núm. de ident.: 45)

65 Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 75 y el cebador 122r y ADN plasmídico p225-7 como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~

- 692 pb y se purificó a partir del gel. Una segunda reacción de PCR se realizó con el cebador 123 y el cebador 124r y ADN plasmídico p225-7 como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~237 pb y se purificó a partir del gel. La tercera reacción de PCR de superposición se realizó con los cebadores 75 y 124r, y una mezcla de los productos de las dos reacciones anteriores como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~ 910 pb. Este producto de PCR de superposición se dirigió con XbaI y NsiI y se volvió a ligar al plásmido p225-7 (digerido con XbaI y NsiI) para producir el Factor IX-ctpx3 T148A designado p243-2.
- Construcción FIX-4CTP (p259-4): El fragmento 3,5CTP se aisló a partir de oxym-4CTP (p254-3) mediante las enzimas de restricción Apa1 y XbaI. El fragmento FIX+0,5CTP se aisló a partir de FIX-3CTP (p243-2) con las enzimas de restricción Apa1 y XbaI. Los dos fragmentos se ligaron.
- Construcción FIX-5CTP (p260-18): El fragmento 4,5CTP se aisló a partir de oxym-5CTP (255-1) mediante las enzimas de restricción Apa1 y XbaI. El fragmento FIX+0,5CTP se aisló a partir de FIX-3CTP (p243-2) mediante el uso de las enzimas Apa1 y XbaI. Los dos fragmentos se ligaron.
- Las células Dg44 se sembraron en placas para cultivo de tejidos de 100 mm y se cultivaron hasta una confluencia del 50-60 %. Un total de 2 µg (microgramo) de ADNc de FIX se usó para la transfección de una placa de 100 mm mediante el uso del reactivo FuGene (Roche) en medio libre de proteína (Invitrogen CD Dg44). El medio se eliminó 48 horas después de la transfección y se reemplazó con un medio libre de proteína (Invitrogen CD Dg44) sin nucleósidos y en presencia de 800 µg/ml de G418 (neomicina). Después de 14 días, la población celular transfectada se transfirió a matraces para el cultivo de tejidos T25, y la selección continuó durante otros 10-14 días hasta que las células comenzaron a crecer como clones estables. Se seleccionaron clones con alta expresión. Se usaron aproximadamente 2×10^7 células para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella de rodillo de 1700 cm² (Corning, Corning NY), suplementado con vitamina K3 a 5 ng/ml (menadiona bisulfato de sodio; Sigma). El medio de producción (cosecha) se recogió después de una disminución rápida en la viabilidad celular a aproximadamente 70 %. El medio de producción se clarificó primero y después se concentró aproximadamente 20 veces y se dializó con PBS mediante el uso de un casete de filtración de flujo (10 KDa MWCO; Millipore Corp.).
- Determinación del nivel del antígeno FIX: los niveles de antígeno en la cosecha de FIX-CTP se determinaron mediante el uso del estuche de ELISA para el FIX humano AssayMax (AssayPro-EF1009-1). La concentración de proteínas calculada es el promedio de tres diluciones diferentes en dos ejecuciones independientes (figura 1A, tabla 1).

Tabla 1: Concentración de proteínas calculada.

	FIX-CTP	FIX-CTP-CTP
Media	41.9	19.2
SD	8.78	3.67
SEM	20.93	10.15

- FIX SDS-PAGE - inmunotransferencia: las cosechas de FIX-CTP o rhFIX purificado (American Diagnostics), 100 ng de proteína, se cargaron en gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante inmunotransferencia Western con el uso del anticuerpo políclonal anti-FIX humano y anticuerpo monoclonal anti-gamma carboxilación humana (American Diagnostics). Como se informó previamente, rhFIX migró a 55 KDa, mientras que FIX fusionado a dos CTP migró a 75 KDa. Ambas variantes de las proteínas FIX-CTP se mostraron estar gamma carboxiladas, una modificación postraduccional esencial para la actividad y la función de FIX (figura 1B).

- Determinación de la actividad cromogénica de FIX: Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de las cosechas de FIX-CTP frente a la proteína rhFIX (American Diagnostics) se realizó mediante el uso del estuche de prueba para la actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). En la presencia de trombina, fosfolípidos, calcio, cantidades en exceso de FXIa activa el FIX muestreado a FXa. FXa forma un complejo enzimático con trombina, FVIIIC activado (suministrado en cantidades en exceso), fosfolípidos, y calcio y activa el Factor X, presente en el sistema de ensayo, a FXa. La actividad se correlaciona directamente con la cantidad de FIX, que es el factor limitante. El FXa generado se mide después mediante su actividad específica sobre un sustrato cromogénico de FXa (pNA). La cantidad de pNA generado es directamente proporcional a la actividad de FXa. rhFIX y las cosechas de FIX-CTP se diluyeron en serie, y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta de las

cosechas de FIX con una preparación de referencia que consistió en rhFIX o plasma humano. La EC50 promedio del FIX fue 21 ng/ml, mientras que la EC50 calculada para la cosecha de FIX-(CTP₂) fue 382 ng/ml, y la EC50 calculada para la cosecha de FIX-CTP fue 1644 ng/ml. Se observó una disminución de aproximadamente 15 veces en la actividad enzimática de la cosecha de FIX-(CTP₂) (figura 2).

5 Actividad de coagulación de FIX (aPTT): El tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) es una medida de la integridad de las vías intrínseca y común de la cascada de coagulación. El aPTT es el tiempo, en segundos, para que el plasma se coagule después de la adición de un activador de la vía intrínseca, fosfolípido y calcio. El reactivo de aPTT se denomina una tromboplastina parcial porque el factor tisular no se incluye con el fosfolípido ya que está con el reactivo protime (PT). El activador inicia el sistema y después tiene lugar el resto de las etapas de la vía intrínseca en presencia de fosfolípido. El intervalo del aPTT de referencia varía entre los diferentes laboratorios, pero usualmente está en el intervalo de 27-34 segundos.

10 15 Lo importante del ensayo fue cuantificar la capacidad de las cosechas de FIX-CTP para restaurar la actividad de coagulación del plasma humano con agotamiento de FIX mediante la adición de rhFIX. Se mezclaron 300 µl de plasma humano deficiente de FIX con 100 µl de rhFIX o las cosechas de FIX-CTP y diluidas en serie. Despues de una incubación de 60 segundos a 37 °C, se añadieron tromboplastina, CaCl₂ y fosfolípidos a la mezcla, y se determinó el tiempo de coagulación en segundos (realizado por American Medical Laboratories). La potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta de las cosechas de FIX con 20 una preparación de referencia que consistió en rhFIX o plasma humano. Una unidad de actividad de FIX corresponde a la concentración del FIX que iguala la actividad de un ml de plasma humano normal. Los resultados de aPTT presentados indican que FIX-(CTP)₂ muestra una reducción de 5,7 veces en su actividad específica de coagulación en comparación con rhFIX (tabla 2). Además, los resultados de aPTT junto con el 25 ensayo de la actividad cromogénica *in vitro* sugieren que la cosecha de FIX-(CTP)₂ tiene una actividad enzimática mejorada frente a la cosecha de FIX-CTP (tabla 2). Una mejor actividad de las proteínas FIX-CTP puede obtenerse después de la optimización del sistema de expresión (es decir cotransfección con furina y optimización de la concentración de vitamina K3 en el medio), que se fortaleció después de la supertransfección con furina (datos no mostrados).

30 Tabla 2 : Actividad de coagulación de FIX

rhFIX(AD) (µg/ml)	PTT(s)	FIX-CTP (µg/ml)	PTT (s)	FIX-CTP-CTP (µg/ml)	PTT (s)
5	31,3	9	45,2	4	47,5
1,25	35,7	2,25	53,3	1	55,9
0,3125	43	0,5625	64,1	0,25	67
0,078125	52,1	0,140625	76,3	0,0625	77,4

35 Estudio farmacocinético: rhFIX (American Diagnostic) y las cosechas de FIX-CTP se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague-Dawley (seis ratas por sustancia) a una dosis de 75 µg/kg de peso corporal (tabla 3).

Tabla 3: Plan de operación del estudio PK

Grupos tratados	Elemento de prueba	Núm. de animales / grupo	Vía de dosificación	Género	Nivel de dosis (µg/kg)	Nivel de dosis (µg por animal)	Vol. inyectado (µl)	Con. (µg/ml)	*Puntos de tiempo (horas después de la dosis)
1	rFIX	6	IV	M	75	15	500	30	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, 72.
2	rFIX-CTP	6	IV	M	75	15	500	30	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, 72.
3	rFIX-CTP-CTP	6	IV	M	75	15	1000	15	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48, 72.

Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 3 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 1,5, 4, 8, 24, 48 y 72 horas después de la dosificación. El plasma se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. La concentración del FIX se cuantificó mediante ensayo ELISA específico para FIX (AssayPro). Se calculó un perfil farmacocinético para cada proteína y representa la media de 3 animales en cada punto de tiempo (figura 3). Los tiempos de vida media terminal se calcularon mediante el uso del programa informático PK solutions 2.0. La tabla 4 resume las concentraciones observadas de FIX en los diferentes puntos de tiempo de muestreo.

10 Tabla 4 : Concentraciones de FIX observadas

Tiempo (h)	FIX-AD (ng/ml)	FIX-CTP (ng/ml)	FIX-CTP-CTP (ng/ml)
0,083	1506,7	1477,5	1914,8
0,5	1949,8	1150,1	1830,1
1,5	2189,4	1009,0	1264,3
4	733,90	709,33	1000,00
8	319,80	167,20	1234,67
24	BLQ	54,625	230
48	BLQ	BLQ	120,9

15 El perfil PK y el resumen de los tiempos de vida media terminal se resumen en la tabla 5. Las cosechas de FIX-CTP muestran mejores valores de $T_{1/2\beta}$ en comparación con rhFIX (aumentos de 2 y 5 veces, respectivamente). Dado que en la recolección de la dosificación del FIX, las concentraciones séricas en el animal del FIX a las 24 horas estaban por debajo del límite de cuantificación (BLQ), no se calcularon otros parámetros PK.

20 Tabla 5 : Resumen de los parámetros PK

Producto	Tiempo de vida media terminal (h)	Relación (FIX-(CTP)x/rhFIX)
rhFIX (American Diagnostics)	2,62	-
FIX-CTP	5,55	2,11
FIX-CTP (FIX-CTP-CTP)	12,9	4,92

25 En este estudio, se describió un novedoso enfoque para prolongar el tiempo de vida media del FIX mientras que se retiene la potencia terapéutica. La adición de un péptido CTP a una proteína activa tiene un potencial perjudicial al interferir con la actividad de la proteína. Por lo tanto, la generación de un FIX-CTP recombinante activo mediante la adición de una secuencia CTP en el extremo C-terminal del FIX es inesperada.

30 Caracterización de un FIX-CTP-CTP purificado por inmunoafinidad

35 Purificación del FIX-CTP-CTP

40 Para evaluar una proteína en un contenido de alto grado con aumento de la actividad cuyo perfil PK imita y puede extrapolarse a un entorno clínico, FIX-CTP-CTP es un FIX modificado con 2 unidades de CTP en tandem en su carboxilo terminal. FIX-CTP-CTP se purificó mediante el uso de un anticuerpo monoclonal unido a la matriz contra residuos y carboxiglutamilo (Gla) presentes en la región N-terminal del FIX (American Diagnostics Cat. # 3570MX). El anticuerpo monoclonal se unió a sefarosa CL-4B. La cosecha de FIX-CTP-CTP a una concentración de 88 µg/ml se dializó contra Tris 20 mM, NaCl 150 Mm y EDTA 10 mM a pH =7,4. La velocidad de carga fue 0,5 ml/min, la elución se realizó mediante el uso de Tris-HCl 20 Mm, NaCl 350 mM y CaCl 50 mM, y la fracción no unida se recicló cinco veces. Finalmente, la fracción de elución se dializó con PBS, se mezcló bien y se concentró.

45 Determinación del nivel del antígeno FIX: los niveles de las cosechas de FIX-CTP, las cosechas de FIX-(CTP)₂, y la proteína purificada FIX-(CTP)₂ se determinaron mediante el uso del estuche de ELISA para el FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. #FIX-AG RUO). La concentración de proteínas calculada (µg/ml) es el promedio de dos ejecuciones independientes (figura 4, tabla 6).

50 Tabla 6 : Concentración de proteínas calculada

	FIX-CTP	FIX-CTP-CTP	FIX-CTP-CTP (purificada)
Nivel del Ag FIX (µg/ml)	125,78	88,53	172,9

SD	17,28	21,31	2,63
%CV	13,74	24,08	1,52

Adicionalmente, FIX-CTP-CTP se cuantificó mediante el ensayo de Bradford. La concentración calculada fue 202 µg/ml, que es similar a la concentración obtenida por el ELISA para FIX humano.

5 Transferencias de SDS-PAGE: la cosecha de FIX-CTP-CTP, la fracción no unida y la proteína purificada, se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis del SDS-PAGE Coomassie se realizó mediante tinción del gel con el reactivo azul de Coommasie (800 ng de proteína). Se realizó una inmunotransferencia Western con 100 ng de proteína, anticuerpo políclonal anti-FIX humano (Ac), y Ac monoclonal anti-gamma carboxilación humana (American Diagnostics Cat #499 y #3570). El procedimiento de purificación por inmunoafinidad enriqueció 10 significativamente la porción FIX-CTP-CTP mientras que se redujeron las impurezas (figura 5).

15 Secuenciación del N-terminal: La proteína purificada FIX-CTP-CTP se separó mediante SDS-PAGE en Tris-glicina al 12 % y posteriormente se electrotransfirió a una membrana de PVDF. La banda de interés se cortó y se colocó sobre un filtro de fibra de vidrio tratada Biobrene, purificado. El análisis de la secuencia N-terminal se llevó a cabo mediante degradación de Edmann con el uso de un secuenciador de proteína líquida por pulsos equipado con un sistema de microgradientes de HPLC 140 C. La secuenciación del N-terminal reveló que FIX-CTP-CTP es una mezcla de proteínas escindidas completas e incompletas del propéptido. Se demostró que la escisión no adecuada del propéptido reduce la actividad de coagulación del FIX. Mediante 20 cotransfección con furina, el proceso de escisión del propéptido puede mejorarse.

25 Determinación de la actividad cromogénica de FIX: Se realizó una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de la proteína purificada FIX-CTP-CTP frente a rhFIX (American Diagnostics) y una mezcla de plasma humano normal mediante el uso del estuche de prueba de la actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). En la presencia de trombina, fosfolípidos y calcio, cantidades en exceso de FXIa activan FIX a FXa. FXa forma un complejo enzimático con trombina (suministrada en cantidades en exceso), fosfolípidos y calcio activan el Factor X, presente en el sistema de ensayo, a FXa. La actividad se correlaciona directamente con la cantidad de FIX, que es el factor limitante. El FXa generado se midió por su actividad específica sobre un sustrato cromogénico de FXa (pNA). La cantidad de pNA generada fue directamente proporcional a la actividad de FXa. rhFIX, plasma humano y FIX-CTP-CTP se diluyeron en serie, y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta (figura 6). La EC₅₀ promedio de rhFIX fue 68,74 ng/ml mientras que la EC₅₀ calculada de FIX-CTP-CTP fue 505 ng/ml. Se observó una disminución de aproximadamente 7 veces en la actividad enzimática de FIX-CTP-CTP frente a FIX recombinante y una disminución de 16,5 veces frente al plasma normal humano bien mezclado. Esta actividad reducida puede explicarse por la escisión inadecuada del propéptido N-terminal, 30 que se identificó mediante análisis del N-terminal.

35 Actividad de coagulación de FIX (aPTT): El tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) es una medida de la integridad de las vías intrínseca y común de la cascada de coagulación. El aPTT es el tiempo (medido en segundos) necesario para que el plasma coagule después de la adición de un activador de la vía intrínseca, fosfolípido y calcio.

40 El ensayo cuantificó la capacidad de la proteína FIX-CTP-CTP para restaurar la actividad de coagulación del plasma humano con agotamiento del FIX mediante la adición de rhFIX. 300 µl de plasma humano deficiente de FIX se mezcló con 100 µl de rhFIX, FIX-CTP-CTP (los CTP están en tandem en el C-terminal), o plasma humano normal mezclado que se diluyó adicionalmente. Despues de una incubación de 60 segundos a 37 °C, se añadió el factor tisular (TF), CaCl₂, y fosfolípidos a la mezcla. Se determinó el tiempo de coagulación en segundos. La potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta de FIX-CTP-CTP con una preparación de referencia de rhFIX o plasma humano. Una unidad de FIX se definió como la cantidad de FIX que iguala la actividad de 1 ml de plasma humano normal.

45 Los resultados de aPTT indican que la actividad de coagulación de FIX-CTP-CTP es solo 1,4 menor que el plasma humano normal mezclado y similar al rhFIX. Los resultados de aPTT junto con el ensayo de actividad cromogénica *in vitro* sugieren que la purificación de FIX-CTP-CTP no afectó su actividad.

50 Actividad farmacocinética de FIX-CTP-CTP: FIX-CTP-CTP purificado, rhFIX (American Diagnostic) y las cosechas que contenían FIX-CTP-CTP y FIX-CTP se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague-Dawley (ocho ratas por sustancia) en una dosis de 100 µg/kg de peso corporal (tabla 7).

55 60 Tabla 7: Descripción del estudio de PK

Grupos tratados	Elemento prueba	Núm. animales/grupo/punto de tiempo	De	Nivel de dosis (μg/kg)	Nivel de dosis (μg por animal)	Vol. inyectado (μl)	Con. (μg/ml)	Puntos de tiempo (horas después de la dosis)
A	rFIX	8		100	20	500	40	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
B	rFIX-CTP(cosecha)	8		100	20	500	40	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
C	rFIX-CTP-CTP(cosecha)	6		100	20	500	40	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
D	rFIX-CTP-CTP(purificado)	4		100	20	500	40	0,083, 0,5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 4, 8, 72.

5 Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 4 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 2, 4, 7, 10, 24, 48, y 72 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,32 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. La concentración del FIX se cuantificó mediante el uso de un estuche de ELISA para FIX humano (Affinity Biologicals). El perfil farmacocinético se calculó para cada proteína como la media de 4 animales en cada punto de tiempo (figura 7). El tiempo de vida media terminal se calculó mediante el uso del programa informático PK Solutions 2.0. La tabla 8 resume las concentraciones observadas de FIX en diferentes puntos de tiempo de muestreo.

10 Tabla 8 : Concentraciones de FIX observadas

Tiempo (h)	Cosecha FIX-CTP ng/ml	Cosecha FIX-(CTP) ₂ ng/ml	rhFIX ng/ml	FIX-CTP-CTP purificada ng/ml
0,085	1038,97	1123,62	325,05	886,48
0,5	939,12	956,80	274,58	670,92
1	791,97	843,85	222,90	674,17
2	304,98	673,31	186,00	503,91
4	315,37	525,50	109,69	357,36
7	171,45	384,36	67,62	257,02
10	50,34	250,73	40,20	158,66
24	10,07	78,50	BLQ	52,13
48	BLQ	23,40	BLQ	18,07

En la tabla 9 se presenta un resumen de los parámetros PK.

15 Tabla 9 : Resumen de los parámetros PK

	T _{1/2} (h)	AUC ng-h/ml	MRT (h)	Vd ml/Kg	CL ml/h/Kg
Cosecha FIX-CTP	4,17	3622	4,5	155,1	27,6
Cosecha FIX-(CTP) ₂	10,44	9105,7	12	165,4	10,9
rhFIX	3,72	1416,8	5,1	373,8	70,183
FIX-CTP-CTP purificada	11,14	6314,2	12,3	254,5	15,83

20 La cosecha de FIX-CTP-CTP demostró un mejor perfil PK en comparación con la cosecha de FIX-CTP. Además, FIX-CTP-CTP purificado mostró un aumento de 3 veces en el valor de T_{1/2β} y un aumento de 4,5 veces en el AUC en comparación con rhFIX.

5 La cantidad reducida del FIX secretado fusionado a las moléculas CTP en tandem frente a la fusión de un único CTP parece deberse a la adición de un CTP adicional y no a la detección reducida del ELISA, porque la concentración calculada de FIX-CTP-CTP purificado por Bradford fue similar a la concentración calculada por ELISA.

10 La actividad de coagulación de FIX-CTP-CTP fue similar al plasma humano mezclado; sin embargo, su actividad cromogénica *in vitro* fue significativamente menor cuando se comparó con rhFIX o el plasma humano mezclado. El ensayo de actividad cromogénica se reportó como un ensayo muy sensible en comparación con el ensayo de coagulación. El motivo de la actividad reducida de FIX-CTP-CTP puede variar. La adición de CTP puede disminuir la afinidad de FIX por el FXIa o reducir las modificaciones postranscripcionales (por ejemplo 12-10 residuos GLA y la escisión del propéptido). El análisis del N-terminal reveló que la escisión proteolítica del propéptido de FIX-CTP-CTP no se completó totalmente antes de la secreción. Dado que esta modificación postranscripcional es crucial para la actividad enzimática normal de la proteína, la cotransfección con el plásmido de furina-PACE es favorable y puede mejorar la actividad de FIX-CTP-CTP.

15 Finalmente, el estudio PK comparativo de FIX-CTP-CTP en ratas demostró que la fusión de dos CTP en tandem al C-terminal del FIX generó un FIX con un tiempo de vida media prolongado.

20 20 Modelo de ratón con agotamiento de FIX: Para evaluar la actividad *in vivo*, se obtienen ratones con inactivación del FIX, y se establece una colonia de reproducción. Se inyectaron 10 µg de hFIX recombinante comercial (BeneFIX®) o de rFIX-(CTP)₂ (FIX-CTP-CTP) en la vena de la cola de un ratón con inactivación del FIX, anestesiado (22-28 g). La cantidad de proteína inyectada es igual a la concentración requerida de FIX en el plasma normal (5 µg/ml). Las muestras de sangre se toman de la cola comprimida a los tubos capilares heparinizados en puntos de tiempo específicos. Las muestras de plasma se evalúan en cuanto a los niveles de FIX mediante ELISA y se mide la eficacia mediante el ensayo de coagulación de aPTT.

25 30 Aumento de la eficacia de la escisión del propéptido de FIX: El ADNc del péptido CTP se fusionó al extremo 3' del ADNc del FIX humano. Las construcciones de expresión de rFIX y Furina correspondientes se co-transfектaron en células Dg44; un ADNc de rFIX humano también se co-transfectó con el plásmido de furina como control. La secreción de un alto nivel de FIX conduce a la secreción de una mezcla del pro-factor y un factor FIX maduro, debido a la cantidad limitada de la proteasa de furina en la célula. La cotransfección de un vector de expresión de furina con un vector de expresión del pro-factor aumenta la recuperación y da como resultado la secreción de FIX completamente procesado al medio.

35 40 Después de la cotransfección de FIX-(CTP)₂ y furina, los clones estables se generan y la cosecha se recolecta para la evaluación de la escisión del propéptido. Se cargan 100 ng de proteína en gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realiza mediante inmunotransferencia Western con el uso de Ac polyclonal anti-FIX humano (American Diagnostics) y anticuerpo polyclonal anti-propéptido. Como se informó previamente, el rhFIX migró a 55 kDa, mientras que el FIX fusionado a dos CTP migró a 75 kDa. Se muestra que ambas variantes de proteínas FIX experimentan una adecuada escisión completa del propéptido.

45 50 Para determinar si la escisión adecuada del propéptido mejora la actividad enzimática de FIX-(CTP)₂, se realiza una evaluación comparativa de la actividad cromogénica y de coagulación de la cosecha de FIX-(CTP)₂ cotransfектada con furina. Se observa una mejora significativa de la actividad específica de FIX-(CTP)₂, que es similar a rhFIX.

55 60 En conclusión, los resultados descritos en la presente sugieren que FIX-CTP-CTP puede usarse eficazmente para el tratamiento de pacientes con hemofilia B. El FIX fusionado a las construcciones de CTP tiene el beneficio de un mejor rendimiento farmacológico *in vivo* que supera el inconveniente en determinadas medidas *in vitro*. Este tratamiento propuesto es ventajoso respecto a los tratamientos anteriores ya que se reduce la tasa de infusiones y la cantidad de dosis requeridas.

65 Es importante señalar que cuando se usó una estrategia de una molécula fusionada a la albúmina para mejorar el tiempo de vida media del FIX, el FIX recombinante se inactivó. El novedoso enfoque actual conduce al diseño y la purificación de una novedosa proteína fusionada con FIX recombinante que presenta una mejor actividad a largo plazo. Dado que las modificaciones de tamaño solas no mejoraron la farmacocinética del FIX inyectado, el hallazgo de que el CTP fusionado al FIX facilita los parámetros farmacocinéticos fue inesperado. La presencia de residuos de ácido siálico en el péptido altamente glicosilado estabilizó la proteína y la protegió de las interacciones con los receptores vasculares sin anular los determinantes principales de la función de FIX.

70 FIX-CTP tiene una eficacia terapéutica similar al rFIX en los pacientes con hemofilia B y se necesitó una dosificación menos frecuente. Una única inyección de FIX-CTP es suficiente para controlar los episodios de

hemorragia y reducir la cantidad de inyecciones que se necesitan durante una intervención quirúrgica en pacientes con hemofilia B.

5 La tecnología de CTP se utilizó para el desarrollo de un FIX de acción prolongada. Específicamente, la prolongación del tiempo de vida media de la molécula de rFIX recombinante se realizó mediante la fusión de al menos un CTP humano al FIX. El FIX recombinante-CTP se expresó en células de mamífero y se caracterizó *in vitro* e *in vivo*. Se demostró que la actividad *in vitro* de rFIX-CTP fue comparable con rFIX. Los estudios de farmacocinética y eficacia en ratas demostraron propiedades mejoradas del rFIX-CTP. Los resultados de este estudio demuestran que es posible desarrollar una molécula de rFIX con un tiempo de vida media prolongado que tenga propiedades hemostáticas similares a la enzima de tipo silvestre.

Ejemplo 2

Evaluación comparativa del FIX-CTP₃ purificado vs. FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅

2.1 Objetivo del estudio

Una evaluación comparativa de los parámetros farmacocinéticos de FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅ frente a FIX-CTP₃ después de un proceso de purificación parcial.

2.2 Producción de cosechas de FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅

El ADNc de FIX (OriGene RC219065) fusionado en el extremo C-terminal a cuatro o cinco secuencias de CTP en tandem se expresó en células Dg44 mediante el uso del sistema de expresión Excellgene en presencia de vitamina K3 a 10 ng/l (Sigma, Mennadion). Las cosechas se recolectaron (300 ml), filtraron y congelaron.

2.3 Producción de la cosecha de FIX-CTP₃

30 FIX-CTP₃ se expresó en el laboratorio en células CHO mediante el uso del vector pCI-DHFR, clon 196, BR-9 en presencia de vitamina K3 a 25 ng/l (Sigma). Las cosechas se recolectaron y filtraron.

Todas las muestras de FIX-CTP (3, 4 y 5 CTP) se purificaron solo mediante una columna de jacalina debido a la falta de material.

2.4 Determinación del nivel del antígeno FIX

El nivel del antígeno FIX se determinó mediante el uso del estuche de ELISA para el FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO). La concentración de proteínas calculada es el promedio de cuatro ejecuciones independientes. La concentración de FIX-CTP₃ fue ligeramente mayor en comparación con las dos versiones adicionales (tabla 10).

Tabla 10: Nivel del Ag FIX

	3 CTP Final Jacalina40	4 CTP Final Jacalina40	5 CTP Final Jacalina40
Prom. (ng/ml)	1016,69	4644,11	1686,82
SD	225,41	925,63	160,07
%CV	22,17	19,93	9,49

2.5 Tinción de Coomassie e inmunotransferencia de FIX-CTP

Las cosechas de FIX-CTP₃, FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅ se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante inmunotransferencia Western con el uso del Ac polyclonal anti-CTP (Adar Biotech Production) o Ac anti-Gla (American Diagnostica).

Como se informó previamente, el FIX fusionado a tres CTP migró a 80 kDa mientras que el FIX fusionado a cuatro o cinco CTP migró a 85 KDa o 90 KDa, respectivamente. Como se esperaba, las cosechas de FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅ de Excellgene mostraron muy bajos niveles de gamma carboxilación en comparación con la cosecha de FIX-CTP₃, que se produjo en Protor (figura 8).

Después de un proceso de purificación con la utilización de una columna de jacalina (purificación por inmunoafinidad de las proteínas glicosiladas), FIX-CTP₃, FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅ se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El SDS-PAGE se tiñó mediante el colorante azul de Coomassie para la detección de las muestras. Todas las variantes mostraron perfiles de bandas mucho más limpios (figura 9), lo que sugiere una mayor pureza.

5

2.6 Determinación de la actividad cromogénica de FIX

10

Se realizó una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de FIX-CTP₃, FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅ completamente purificados (columna HA) frente al plasma mezclado normal humano mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). Todas las muestras se diluyeron en serie, y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia de plasma normal humano. La reducción de la actividad cromogénica de FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅ (figura 10) en comparación con el plasma puede ser una consecuencia de modificaciones postranscripcionales inadecuadas de las proteínas FIX, por ejemplo, gamma carboxilación y escisión del propéptido inapropiadas o, alternativamente, debido a la adición de los casetes de CTP. La fluctuación en la actividad de FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅ (tabla 11) podría estar causada por las inapropiadas capacidades de cuantificación del ELISA para FIX debido al enmascaramiento del CTP del sitio antigénico.

15

20 Tabla 11: Relación de EC50 muestra/plasma

Muestra	Relación de EC50 muestra/plasma
Plasma	1
3 CTP Final HA	2
4 CTP Final HA	5,35
5 CTP Final HA	2,73

2.7 Estudio farmacocinético

25

FIX-CTP₃, FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅ purificados en jacalina (Grupo A, B y C, respectivamente) se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague-Dawley (seis ratas por grupo de tratamiento) a una dosis de 250 µg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 3 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72 y 96 horas después de la dosificación (tabla 12). El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

30

35 Tabla 12: Plan de operación del estudio PK

Grupo de tratamiento	Tratamiento	Núm. de animales/grupo	Vía de dosificación	Nivel de dosis (µg por inyectado animal)	Vol. de inyección (µl)	Conc. (µg/ml)	Puntos de tiempo (horas después de la dosis)
A	FIX-CTP*3 jacalina 40	6	IV	50	200	250	0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
B	FIX-CTP*4 jacalina 40	6	IV	50	200	250	0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
C	FIX-CTP*5 jacalina 40	6	IV	50	200	250	0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96

40

La concentración del FIX en las muestras de plasma se cuantificó mediante el uso de estuches de ELISA para FIX humano (Affinity Biologicals). El perfil farmacocinético se calculó y es la media de 3 animales en cada punto de tiempo. Los tiempos de vida media terminal se calcularon mediante el uso del programa informático PK Solutions 2.0 x. La tabla 13 más adelante resume las concentraciones de FIX calculadas en los diferentes puntos de tiempo de muestreo.

45 Tabla 13: Concentraciones de FIX calculadas

Tiempo (horas)	Fr. 3 CTP ng/ml	SD 3 CTP	Fr. 4 CTP ng/ml	SD 4 CTP	Fr. 5 CTP ng/ml	SD 5 CTP
0,083	1037,83	72,39	904,54	21,06	1097,23	82,54
0,5	774,18	96,31	736,82	68,93	938,78	70,43
1	562,23	3,73	627,09	32,47	747,85	14,02
3	357,44	8,63	431,23	29,41	576,49	27,35
8	239,20	7,82	327,46	30,26	384,96	36,48
24	77,98	4,26	107,38	5,18	142,42	15,1
48	27,73	2,02	39,63	1,85	53,86	3,33
72	12,55	1,48	21,53	1,55	23,54	3,32
96	6,86	1,23	18,63	0,13	18,94	3,39

- 5 El perfil PK y un resumen de los parámetros PK se presentan en la tabla 14 más adelante y en la figura 11. Un perfil del análisis PK en todos los puntos de tiempo sugirió que la adición de 4 o 5 casetes de CTP al FIX no aumentó su tiempo de vida media en comparación con FIX-CTP₃. El AUC después de la administración de FIX-CTP₅ aumentó en 1,4 a 1,6 veces frente a FIX-CTP₃, el cual no fue estadísticamente significativo.

10 **Tabla 14: Perfil PK y resumen de los parámetros PK**

24- 96 horas	3 CTP	4 CTP	5 CTP
Tiempo de vida media (h)	20,43	22,02	23,96
AUC (ng-h/ml)	8218,38	10504,49	13329,41
Vd (ml/kg)	700,76	586,02	494,89
CL (ml/h/kg)	23,77	18,45	14,32

- 15 Dado que se demostró que las muestras a las 96 horas después de la dosificación tenían concentraciones de FIX muy bajas, que estaban por debajo del límite de cuantificación del ensayo, el tiempo de vida media terminal se recalculó para proporcionar un cálculo más preciso y científicamente adecuado (tabla 15). Según este cálculo, se obtuvieron incluso las diferencias más pequeñas entre el tiempo de vida media de FIX-CTP₃, FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅.

20 **Tabla 15: Tiempo de vida media terminal recalculado**

8-72 horas	3 CTP	4 CTP	5 CTP
Tiempo de vida media (horas)	15,38	16,63	16,04

25 **2.8 Conclusiones:**

- 25 En este estudio, se evaluaron los parámetros farmacocinéticos y la actividad de coagulación potencial de FIX-CTP₃, FIX-CTP₄ y FIX-CTP₅. La fusión de 4 y 5 CTP al FIX no proporcionó una superior o mayor extensión del tiempo de vida media, en comparación con FIX-CTP₃, y se observó una reducción de la actividad cromogénica. La tabla 16 más adelante resume la mejora en por ciento del tiempo de vida media para las diferentes variantes fusionadas FIX-CTP (1 a 5 CTP). La fusión de CTP al FIX mejoró su comportamiento farmacocinético, pero, de manera impredecible, esta mejora fue limitada. Sorprendentemente, después de la fusión de 3, 4 o 5 CTP en tandem al FIX, se calculó un valor similar del tiempo de vida media.

30 **Tabla 16: Resumen del por ciento de mejora del tiempo de vida media**

versión de FIX	T _{1/2} (8-72hr) % de incremento
rhFIX vs. 1CTP	112
1CTP vs. 2CTP	141
2CTP vs. 3CTP	37
3CTP vs. 4CTP	6
4CTP vs. 5CTP	0

Estos datos sugieren que la fusión de 3 CTP al FIX produce una mejora máxima en el tiempo de vida media de la proteína, lo que confirma que FIX-CTP₃ es la variante óptima en términos de tiempo de vida media, estructura y actividad potencial de coagulación para el desarrollo clínico futuro.

Ejemplo 3

Tratamiento con FIX-CTP₃ del modelo de ratón hemofílico FIX-/-

Como se describió anteriormente, se realizó un estudio que probó el perfil PK de las cosechas de FIX-CTP, FIX-CTP₂ y FIX-CTP₃ y la actividad de coagulación frente a rhFIX. FIX-CTP₃ mostró un mejor perfil PK a la vez que mantuvo su actividad de coagulación frente a las cosechas de FIX-CTP₁ y FIX-CTP₂ o rhFIX. Para evaluar adicionalmente este resultado, se purificó la proteína FIX-CTP₃ γ-carboxiglutamato. FIX-CTP₃ muestra un aumento de 3 veces en el tiempo de vida media y un AUC 4,5 veces mayor en comparación con rhFIX en las ratas normales después de una única administración IV. FIX-CTP₃ demostró una reducción de la actividad cromogénica y de coagulación *in vitro*, muy probablemente debido a la escisión insuficiente del propéptido N-terminal y a modificaciones postranscripcionales (PTM) inadecuadas, tal como la gamma carboxilación adecuada.

En el estudio actual, se analizaron las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del FIX humano recombinante fusionado a tres CTP en tandem en ratones deficientes de FIX.

Propósito del estudio:

Determinar los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de rFIX-(CTP)₃ frente al rhFIX comercial (BeneFIX®) en ratones deficientes de FIX después de una única administración IV de FIX-(CTP)₃ a una actividad específica y dosis similares (actividad específica similar a la PD y similar constante de FIX para la PK).

Producción de la cosecha de FIX-CTP₃:

El ADNC de FIX (OriGene RC219065-Thr 148) fusionado en el extremo C-terminal a tres secuencias de CTP en tandem se expresó en células Dg44 mediante el uso del sistema de expresión Excellgene en presencia de vitamina K3 a 25 ng/ml (Sigma, Mennadion). Se cultivaron cinco lotes separados que contenían 5 litros de suspensión celular (total de veinticinco litros) y se cosecharon después que la viabilidad disminuyó a 60-70 %. La cosecha se filtró y congeló a -70 °C.

Determinación del nivel del antígeno FIX de la cosecha:

El nivel del antígeno FIX de la cosecha se determinó mediante el uso de un estuche de ELISA para FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO). El nivel del antígeno se calculó por cada lote. La concentración del FIX se mantuvo entre los diferentes lotes (tabla 17).

Tabla 17: Nivel del antígeno FIX

Lote	Nivel de antígeno FIX		
	#1	Lote #2	Lote #3
Pr. (μg/ml)	28,81	32,74	42,9
STD	2,5	2,69	4,0

%CV	8,84	8,382	9,4
-----	------	-------	-----

Proceso de purificación de FIX-CTP₃:

- Después de un corto estudio de purificación, se realizó un proceso de purificación mediante el uso de las siguientes 3 columnas: DEAE sefarosa, Heparina sefarosa e hidroxiapatita cerámica HA Bio Rad tipo 1 (40 µm), FIX-CTP₃. Se purificó la proteína enriquecida y-carboxilada. En resumen: Se descongelaron cinco litros de cosecha clarificada a 4 °C durante un periodo de 4 días. Para cada lote de purificación, la cosecha clarificada (2 litros) se concentró 4 veces y se dializó contra Tris-HCl 20 mM pH 8,2 mediante el uso de un cartucho desecharable de fibra hueca con un valor de corte del peso molecular nominal de 10 KDa. Este proceso (UFDF1) se realizó dos veces, y se cargó un litro de UFDF1 en columna de DEAE sefarosa, y el Factor IX se eluyó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 10 mM pH 8,2. El producto se diluyó 1:1 con Tris-HCl 20 mM, CaCl₂ 10 mM pH 7,5, y el pH se ajustó a 7,5 antes de cargar en la columna de Heparina sefarosa. La elución se realizó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, y CaCl₂ 10 mM pH 7,5. El producto eluido se concentró y dializó contra fosfato 10 mM pH 6,8 mediante el uso de una membrana con valor de corte de 10 KDa del casete Pellicon XL (UFDF2). El producto se cargó en una columna HA, y la fracción activada del Factor IX se eluyó con fosfato 150 mM pH 6,8. El producto de purificación se concentró hasta una concentración objetivo de 2 mg/ml y se dializó contra TBS pH 7,45, se dividió en alícuotas y se almacenó a -70 °C.
- El proceso de purificación se repitió cinco veces, de manera semanal para purificar el volumen total (25 litros). Los procesos de purificación se denominaron HA# 6-10. Cada producto de purificación se evaluó separadamente (App # 1-5). Al final del proceso de purificación, los diferentes lotes se combinaron y se concentraron adicionalmente hasta una concentración objetivo de 4 mg/ml.

Propiedades analíticas de FIX-CTP₃:

Determinación del nivel del antígeno FIX

- El nivel del antígeno de la proteína FIX-CTP₃ enriquecida y-carboxilada se determinó mediante el uso de un estuche de ELISA para FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO). La concentración de proteínas calculada es el promedio de dos ejecuciones independientes (tabla 18).

Tabla 18: Nivel del antígeno FIX-CTP₃

ELISA #1 de mezcla de FIX-CTP ₃ purificada de HA				ELISA #2 de mezcla de FIX-CTP ₃ purificada de HA				Pr. final
DIL	1	2	Pr.	DIL	1	2	Pr.	
1300000	3412240	3781830	3597035	1300000	3693260	3568240	3630250	3613643
2600000	3915600	4138440	4037020	2600000	3706820	3595540	3651180	3844100
5200000	4158544	4334096	4246320	5200000	3831464	3530748	3681106	3963713
10300000	4096352	4004104	4050228	10400000	3863392	3684308	3773848	3912038
Pr. (ng/ml)	3895684	4069618	3982651	Pr. (ng/ml)	3773484	3594708	3684096	3833373
STD	338367,5	234486,7	274313,5	STD	86576,66	65369,65	63369,86	154459,6
%CV	8,685703	5,761884	6,887712	%CV	2,294343	1,818497	1,720092	4,029338
Pr. (mg/ml)	3,895684	4,069618	3,982651	Pr. (mg/ml)	3,773484	3,594708	3,684096	3,833373

ELISA #1 de mezcla de FIX-CTP ₃ purificada de HA				ELISA #2 de mezcla de FIX-CTP ₃ purificada de HA				Pr. final
DIL	1	2	Pr.	DIL	1	2	Pr.	
1300000	3412240	3781830	3597035	1300000	3693260	3568240	3630250	3613643
2600000	3915600	4138440	4037020	2600000	3706820	3595540	3651180	3844100
5200000	4158544	4334096	4246320	5200000	3831464	3530748	3681106	3963713
10300000	4096352	4004104	4050228	10400000	3863392	3684308	3773848	3912038
Pr. (ng/ml)	3895684	4069618	3982651	Pr. (ng/ml)	3773484	3594708	3684096	3833373
STD	338367,5	234486,7	274313,5	STD	86576,66	65369,65	63369,86	154459,6
%CV	8,685703	5,761884	6,887712	%CV	2,294343	1,818497	1,720092	4,029338
Pr. (mg/ml)	3,895684	4,069618	3,982651	Pr. (mg/ml)	3,773484	3,594708	3,684096	3,833373

5 La proteína enriquecida γ -carboxilada FIX-CTP₃, rhFIX y rFIXa (FIX activado) se cargaron en un gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis de Coomassie en SDS-PAGE se realizó mediante tinción del gel con el reactivo azul de Coomassie (800 ng de proteína) (figura 12). Una inmunotransferencia Western se realizó mediante el uso de 100 ng de proteína con Ac polyclonal anti-FIX humano (figura 12B), anticuerpo monoclonal anti-gamma carboxilación humana (American Diagnostics Cat #499, 3570) (figura 12C), Ac polyclonal anti-propéptido de FIX (figura 12D), y Ac polyclonal anti-CTP (figura 12E). Como se informó previamente, el FIX-CTP₃ migró a 75 KDa.

10 El procedimiento de purificación enriqueció significativamente la porción FIX-CTP₃ a la vez que redujo impurezas. El rendimiento del proceso de purificación fue muy bajo en el intervalo de alrededor de 2-3 % (datos no mostrados) debido al requisito de recolectar solo las fracciones FIX-CTP₃ γ -carboxiladas, como se demuestra en la inmunotransferencia anti-Gla (figura 12B). Basado en la tinción de Coomassie y la inmunotransferencia de FIX, la porción de FIX-CTP₃ es solo de alrededor de 60-70 %, y también se detectaron bandas adicionales de menor peso molecular, presumiblemente con menos formas de 15 glicosilación.

Actividad de coagulación de FIX-CTP₃:

20 Actividad cromogénica de FIX-CTP₃:

25 Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de la cosecha de FIX-CTP₃ y de la proteína enriquecida γ -carboxilada FIX-CTP₃, frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica, disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802). La cosecha de FIX-CTP₃ y la proteína se diluyeron en serie, y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia que consistió en plasma normal humano. Como se demostró previamente, la cosecha de FIX-CTP₃ fue 50 veces menos activa que el plasma humano mezclado (tabla 19, figura 13). Después de la purificación de FIX-CTP₃, la actividad cromogénica mejoró significativamente y fue solo 4,72 veces menos activa que el plasma humano mezclado (tabla 19, figura 13). La actividad cromogénica reducida de la cosecha puede ser una consecuencia de inadecuadas 30 modificaciones postranscripcionales de las variantes de la proteína FIX, por ejemplo, inapropiadas gamma carboxilación y escisión del propéptido. Después de la purificación y enriquecimiento de la fracción γ -carboxilada FIX-CTP₃, la actividad fue mejor, lo que demuestra la contribución importante de la γ -carboxilación a la actividad del FIX.

35 Tabla 19: Actividad cromogénica de FIX-CTP₃

Muestra	EC ₅₀ (ng/ml)	Relación de EC ₅₀ muestra/plasma
Cosecha FIX-CTP ₃	741,3	54,4
FIX-CTP ₃ pur.	64,6	4,72
Plasma	13,63	1

Ensayo de coagulación de una etapa (aPTT):

40 El tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) es una medida de la integridad de las vías intrínseca y común de la cascada de coagulación. El aPTT es el tiempo, en segundos, para que el plasma se coagule después de la adición de un activador de la vía intrínseca, fosfolípido y calcio. Lo importante del ensayo fue cuantificar la capacidad de FIX-CTP₃ para restaurar la actividad de coagulación del plasma humano con agotamiento de FIX mediante la adición de rhFIX. Se mezclaron 200 μ l de plasma humano deficiente de FIX 45 con 25 μ g/ml de FIX-CTP₃ y se diluyeron adicionalmente en TBS. Después de una incubación de 60 segundos a 37 °C, se añadieron 50 μ l del activador de PTT (Actina FS) y 50 μ l de calcio 25 mM a la mezcla, y se determinó el tiempo de coagulación en segundos mediante el uso de un Coagulador Sysmex® CA 1500 (realizado por Sheba hospital, Centro Nacional de Coagulación, mediante el uso de un ensayo de aPTT validado). La potencia se evaluó mediante la comparación de FIX-CTP₃ con la curva de dosis-respuesta de una preparación de referencia de plasma mezclado normal humano. Los resultados se expresan en por ciento de actividad interpolada a partir de la curva estándar que incluye niveles de FIX de <1-110 %. FIX-CTP₃ mostró una reducción de 15-20 veces en su actividad de coagulación frente al plasma mezclado normal humano ya que la actividad de 5 μ g/ml, que es el valor normal de FIX en el cuerpo, se demostró que fue de 6,5 % (tabla 20).

55 Tabla 20: Actividad de coagulación de FIX-CTP₃

FIX- CTP ₃	Concentración de FIX según el proveedor (mg/ml)	Concentración en la muestra analizada (μg/ml)	% de actividad de FIX (normalizado respecto al plasma mezclado normal humano)
	3,83	25	34,7
		5	6,5

FIX-CTP₃ también mostró aumento del tiempo de coagulación en comparación con BeneFIX® (tabla 21 y figura 14).

5 Tabla 21: Tiempo de coagulación comparativo (aPTT)

Tiempo de coagulación		
	FIX-CTP ₃	BeneFIX®
38 ug/ml	77,6	
19 ug/ml	83,4	
7,6 ug/ml	93,2	50,6
3,8 ug/ml	104,8	57,6
1,9 ug/ml	112,2	63,7
0,95 ug/ml	122,6	71,5
0,475 ug/ml		83,7
0,238 ug/ml		94,3

Se realizó un ensayo de coagulación adicional de manera independiente en ratones deficientes de FIX por el Dr. Paul Monahan en la Universidad de Carolina del Norte antes de iniciar el estudio PK-PD. Los resultados de aPTT sugirieron que la actividad de coagulación de FIX-CTP₃ es 40 veces menor que el plasma humano mezclado normal como se demuestra por el periodo más prolongado (según se midió en segundos) y la mayor concentración necesaria para la actividad de coagulación adecuada (tabla 22).

10 Tabla 22: Actividad de coagulación comparativa

15

FIX activity (Units)		
	FIX-CTP ₃	BeneFIX®
38ug/ml	13,9	
19ug/ml	8,8	
7.6ug/ml	4	116,8
3,8ug/ml	1,6	67,4
1,9ug/ml	0,9	41,7
0,95ug/ml	0,4	22,4
0,475ug/ml		8,5
0,238ug/ml		3,7

La actividad específica (u/ml), que se basó en el nivel del antígeno FIX según se calculó mediante ELISA para FIX-CTP₃ y BeneFIX®, fue de 4,46 y 198,9 respectivamente.

20 La inconsistencia en la actividad calculada de FIX-CTP₃ como se demuestra en los ensayos cromogénicos frente a aPTT puede explicarse por la sensibilidad superior del ensayo de aPTT y la relevancia *in vivo*. En el ensayo de actividad cromogénica, está presente una cantidad en exceso de los reactivos y enzimas lo que puede activar versiones de FIX menos potentes. La diferencia en los valores de actividad específica de FIX-CTP puede explicarse por el uso de diferentes reactivos y equipos automatizados. El valor de actividad según se calculó en la Universidad de Carolina del Norte se usó para el diseño del estudio PK-PD.

25

Detección de la proteína FIXa:

- Para confirmar que después del proceso de purificación, no se produjo activación de FIX (FIXa), se realizó un ensayo de detección de FIXa mediante el uso del ensayo cromogénico de FIXa Biophen (Cat. # Ref. 221812). El ensayo mide la cantidad de FIXa presente en una muestra específica mediante el uso de la cascada de actividad cromogénica, como se describió previamente. FIX-CTP₃ y rhFIX se diluyeron y se evaluaron los niveles de FIXa. FIX-CTP₃ no se activó durante la purificación o el almacenamiento (tabla 23).
- 5

Tabla 23: Detección de FIXa

Muestra	FIX-CTP ₃	rhFIX
Conc. inicial(mg/ml)	1000	5,7
rFIXa (mg/ml)	BLQ	0,00487
% de FIXa en la muestra	BLQ	0,085

- 10 Estudio PK-PD de FIX-CTP₃: FIX-CTP₃ y rhFIX (BeneFIX®) se administraron en una única inyección intravenosa a los ratones C57Bl deficientes de FIX en una dosis de 625 µg/kg de peso corporal que contenía 100 UI de FIX/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 3 ratones alternativamente a las 0,25, 4, 24, 48, 72 y 96 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,32 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. Se evaluó el nivel del antígeno hFIX, y se realizó un análisis PK detallado. Para evaluar la capacidad de FIX-CTP₃ de prolongar la actividad de coagulación de los animales deficientes del FIX en comparación con BeneFIX®, se calculó la actividad del FIX en muestras plasmáticas citratadas, extraídas de ratones tratados FIX^{-/-}, mediante el uso de un ensayo automatizado de la actividad del FIX (tabla 24).
- 15

Tabla 24: Descripción del estudio

	Producto	Administración	Dosis	Núm. de ratones	Puntos de extracción (horas después de la dosificación)	Cantidad requerida
**Cohorte 1	FIX-CTP ₃	Dosis única: IV	100 UI/Kg 2,5 UI/ratón (553 µg/ratón)	12 ratones,	0,25, 1, 4,8, 16, 24, 48	6636 µg
Cohorte 2	FIX-CTP ₃	Dosis única: IV	**472 µg/Kg 12,57 µg/ratón	18 ratones	*0,25,1*, 4*,8*,16*, 24*, 48*, 72*,96*	200 µg 12,57 µg/ratón
**Cohorte 3	BeneFIX®	Dosis única: IV	100 UI/Kg 2,5 UI/ratón	18 ratones,	0,25, 1,4,8,16, 24, 48, *72,*96	226,3 µg 12,57 µg/ratón

* Puntos de extracción para PK solo
** Sangrado por la vena de la cola en T=48 después de la dosificación; cohortes 1 y 3

Perfil farmacocinético de FIX-CTP₃ en ratones FIX^{-/-}

- 25 La concentración del FIX se cuantificó mediante el uso de estuches de ELISA para FIX humano (Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO). El perfil farmacocinético se calculó para cada proteína y es la media de tres animales en cada punto de tiempo. La tabla 25 más adelante y la figura 15 resumen las concentraciones de FIX calculadas en los diferentes puntos de tiempo de muestreo para las cohortes 1 y 3. Más adelante se presentan el perfil PK y un resumen de los parámetros PK (tablas 26 y 27). También se realizó un análisis PK para la cohorte #2 para verificar la exposición (datos no mostrados).
- 30

Tabla 25: Concentraciones de FIX

Time point(h)	FIX-CTP ₃ ng/ml	BeneFIX® ng/ml
0,25	3645,397	2823,023
1	2411,09	2416,248
4	1703,205	1506,228

8	1139,736	864,764
16	415,32	347,465
24	238,37	158,7973
36	141,0105	94,40067
48	95,461	42,28833
72	76,90953	11,87567
96	24,955	BLQ

Se usó un módulo de dos compartimentos (programa informático WinLin) para determinar AUC0-inf, T_{terminal} y aclaramiento (CL). Los parámetros PK se describen más adelante en la tabla 26.

5 Tabla 26: Propiedades PK

Versión del FIX	$T_{1/2\alpha}$ (1/h)	$T_{1/2}$ (1/h)	β	AUC ng/ml*h	CL ml/Kg/h	MRT (h)	V_{ss} (ml/Kg)
BeneFIX®	3,4	12,7		22428	29	11,5	320,8
FIX-CTP ₃	4	28,7		31770	19	22	425,2

La adición de los tres "casetes" de CTP al rhFIX prolongó el tiempo de vida media *in vivo* de FIX en al menos 2,5 veces. El AUC después de la administración *in vivo* de FIX-CTP₃ aumentó 2 veces frente a rhFIX. Los 10 ratones inyectados con FIX-CTP₃ demostraron un mejor perfil PK en comparación con los ratones inyectados con BeneFIX®.

Perfil farmacodinámico de FIX-CTP₃ en ratones deficientes de FIX:

15 En paralelo al muestreo de PK, los animales deficientes del FIX administrados con BeneFIX® o FIX-CTP₃, las muestras plasmáticas citratadas, se evaluaron en cuanto a su actividad de coagulación mediante el ensayo de aPTT, que se tradujo a % de actividad. El % de actividad en cada punto de muestreo se calculó como el tiempo de coagulación actual/tiempo de coagulación del plasma mezclado de ratones normales * 100. La tabla 27 resume los valores de actividad después de la administración de BeneFIX® o FIX-CTP₃.

20 20 Despues de la administración de FIX-CTP₃, se detectó una actividad de coagulación significativa una hora después de la administración que alcanzó el 96 % de actividad a las cuatro horas después de la dosificación, mientras que el mayor valor de actividad de BeneFIX® fue de 40 % (tabla 27, figura 16). La actividad de coagulación de FIX-CTP₃ se mantuvo durante un periodo de tiempo más prolongado, lo que demuestra una actividad prolongada. La actividad de coagulación para los ratones tratados con BeneFIX® no se detectó en 25 los puntos de tiempo después de las 36 horas, mientras que los ratones tratados con FIX-CTP₃ mantuvieron una actividad medible a las 72 horas después de la dosificación (tabla 27, figura 16). El análisis del perfil farmacocinético del % de coagulación sugiere que la actividad de coagulación de FIX-CTP₃ se mantiene durante un periodo significativamente más prolongado y su tiempo de vida media es casi 2 veces mayor que 30 para Benefix® (tabla 28).

Tabla 27: % de actividad FIX

Horas después de la dosificación	BeneFIX® % de actividad	FIX-CTP ₃ % de actividad
0,25	39,9	1,0
1	33,4	15,5
4	24,9	93,6
8	18,8	65,2
16	10,3	39,9
24	1,7	11,9
36	1,4	11,0
48	<1	4,6
72	<1	1,4

35 Tabla 28: Actividad de coagulación

Versión del FIX Version	T $\frac{1}{2}\alpha$ (1/h)	T $\frac{1}{2}\beta$ (1/h)
BeneFIX®	5,7	----
FIX-CTP ₃	7,3	16

9.3 Reto de sangrado en ratones deficientes de FIX

- 5 Los ratones deficientes de FIX se administraron con una única inyección intravenosa de 100 UI/kg de BeneFIX® o rFIX-CTP₃. La vena de la cola se comprimió ligeramente 48 horas después de la dosificación, y se evaluaron el tiempo de sangrado por la vena de la cola (TVBT) y la intensidad del sangrado (DO de hemoglobina). Un segundo reto de sangrado se realizó 15 minutos después de alcanzar la homeostasis, y se midieron los mismos parámetros. Despues del primer reto de sangrado, el sangrado de los animales 10 administrados con FIX-CTP₃ fue significativamente menos intenso que el sangrado para BeneFIX® como se demuestra por los valores de DO de hemoglobina (figura 17).

Dado que se informó previamente que, durante el primer reto de sangrado en ratones hemofílicos, el tiempo de sangrado no necesariamente se correlaciona con la eficacia del tratamiento, se recomienda evaluar la 15 homeostasis después de un sangrado adicional. Una vez que el primer sangrado se detuvo espontánea o manualmente, se realizó un segundo reto de sangrado 15 minutos después del primero, y se volvieron a medir el tiempo y la intensidad del sangrado. Durante el episodio del segundo sangrado los animales administrados con FIX-CTP₃ tuvieron una reducción del tiempo de sangrado y de la intensidad, lo que demuestra que FIX-CTP₃ fue potente en puntos de tiempo más tardíos (figura 18).

20 Finalmente, los animales también se observaron durante las 12 horas después del segundo reto de sangrado, y se registraron todos los eventos de sangrado recurrentes. Los animales administrados con FIX-CTP₃ fueron capaces de mantener la homeostasis sanguínea durante las próximas 12 horas sin que 25 volvieran a ocurrir eventos de sangrado. Por el contrario, el 50 % de los ratones tratados con BeneFIX® tuvieron episodios espontáneos de sangrado por la cola (tabla 29).

Tabla 29: Resultado 12 horas después del corte de la cola

Grupo de ratones	Nuevo sangrado tardío	Muerte o angustia que requiera eutanasia
FIX-CTP ₃ (100 UI/kg)	0/5 (0 %)	0/5
BeneFIX® (100 UI/kg)	3/6 (50 %)	0/6
FIX-/ (no tratados)	5/6 (100 %)	1/6

- 30 FIX-CTP₃ recombinante, una proteína de fusión compuesta de una única molécula de FIX fusionada a tres "casetes" de CTP en tandem se desarrolló para abordar el corto tiempo de vida media de los productos de FIX disponibles actualmente que se usan para tratar a los pacientes con hemofilia B. Nosotros hemos demostrado que el tiempo de vida media de eliminación de rFIX-CTP₃ fue consistentemente 2,5 a 4 veces 35 más prolongado que el de rFIX en ratas (como se informó previamente) y en ratones deficientes de FIX.

35 Sin estar atados por la teoría, la proteína de fusión reduce el aclaramiento del FIX y protege al FIX de la actividad de proteasas, la degradación por enmascaramiento y reduce la afinidad del FIX por los receptores hepáticos. En conjunto estas características del dominio CTP extienden el tiempo de vida media de FIX.

- 40 Además del análisis farmacocinético de rFIX-CTP₃, examinamos las propiedades farmacodinámicas de FIX-CTP₃ en ratones deficientes de FIX. rFIX-CTP₃ y rFIX, se administraron en dosis comparables (en unidades) para compensar los niveles de deficiencia en la coagulación en los ratones deficientes de FIX. Sin embargo, el efecto de rFIX-CTP₃ en los ratones deficientes de FIX se prolongó significativamente a al menos 76 horas 45 después de la dosificación, para alcanzar un pico de actividad mayor. La actividad de coagulación de FIX-CTP₃ comenzó después de un retraso de 1 hora en comparación con BeneFIX®. La activación de FIX puede requerirse ya que la adición de tres CTP en tandem podría enmascarar teóricamente el sitio de activación y retrasar el inicio de la cascada. Después de la administración de FIX-CTP₃, se observó una actividad máxima del 100 %, mientras que la actividad de BeneFIX® fue de solo 40 %. La actividad inicial superior es un parámetro muy importante y demuestra que la adición de 3 CTP tiene el potencial de mejorar la recuperación.

50 La terapia de reemplazo de FIX de manera profiláctica para los pacientes con hemofilia B ayuda a mantener los niveles plasmáticos de 1-2 % de la actividad de coagulación normal. El ensayo de sangrado por la vena de la cola es una prueba *in vivo* sensible que mide la capacidad para mantener la homeostasis del sangrado a valores bajos de actividad lo cual imita el modelo de homeostasis del sangrado en humanos. En respuesta 55 al reto de sangrado por la vena de la cola 48 horas después de la dosificación, los animales administrados con rFIX-CTP₃ mantuvieron la homeostasis sanguínea con episodios de sangrado más cortos y menos

graves, lo que demuestra una actividad de coagulación sostenida.

FIX es una proteína compleja que contiene una serie de dominios funcionales que experimentan grandes modificaciones postraduccionales. Una de las modificaciones postraduccionales esenciales para la actividad

5 del FIX es la gamma-carboxilación de los primeros 12 ácidos glutámicos en el dominio Gla por la γ-glutamil carboxilasa dependiente de la vitamina K. Esta modificación facilita la unión de FIX a las membranas fosfolípídicas y, por lo tanto, es crítica para su función. El FIX que no está gamma-carboxilado no es funcional, y por tanto la gamma-carboxilación es una etapa limitante de la velocidad.

10 Este estudio PK-PD se realizó mediante el uso de células transfectadas transitoriamente. Se realiza una amplia evaluación analítica de las modificaciones postraduccionales en la proteína FIX-CTP₃ estable producida y secretada por un clon optimizado estable.

15 Basado en los datos presentados, el factor de coagulación FIX-CTP₃ tiene el potencial de reducir la frecuencia de inyecciones en los pacientes que reciben dosis profilácticas de rutina de una terapia de reemplazo de FIX. Se anticipa que rFIX-CTP₃ puede conferir una protección prolongada contra la hemorragia después de cada dosis del factor, disminución de las unidades totales del factor necesarias para tratar los episodios de hemorragia, y/o mantenimiento de la hemostasis adecuada durante los procedimientos quirúrgicos con menos inyecciones.

20 Ejemplo 4

Generación y utilización del Factor de coagulación FVII

25 Una versión de acción prolongada del factor de coagulación Factor VII activado (FVIIa) será útil para el tratamiento de pacientes con hemofilia A y B. La proteína recombinante FVIIa-CTP₃ tiene el potencial clínico de mejorar el tratamiento de pacientes de hemofilia mediante la reducción de la frecuencia de infusions e incluso mediante la reducción de la carga del fármaco, lo que permite un enfoque de tratamiento profiláctico que puede mejorar significativamente la calidad de vida del paciente, evitar episodios espontáneos de 30 hemorragia y daño acumulado a la articulación y otros órganos.

En la presente se describe la generación de una molécula FVIIa recombinante-CTP con un tiempo de vida media prolongado basado en la fusión del FVII con un CTP humano. El FVIIa recombinante-CTP se expresó en células de mamífero y se caracterizó *in vitro* e *in vivo*. Se demostró que la actividad de rFVII-CTP fue 35 comparable con rFVII. Los estudios farmacocinéticos y de eficacia en ratas demostraron mejores propiedades del rFVII-CTP. Los resultados de este estudio demostraron que es posible desarrollar una molécula de rFVIIa con tiempo de vida media prolongado con propiedades hemostáticas muy similares a la enzima de tipo silvestre.

40 Clonación y expresión de la molécula de FVII recombinante: Se construyeron numerosos clones del Factor VII en nuestro vector de expresión en eucariotas (pCI-dhfr) (figura 19). El clon de ADNc de FL verificado MGC humano (IRCM) que contiene la secuencia del factor de coagulación VII de *homo sapiens* se solicitó a "Open Biosystems" (OB-MHS4426). Los siguientes cebadores se sintetizaron por Sigma-Genosys en la siguiente secuencia: Cebador 67: 5'CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCC3' (contiene el extremo 5' del 45 ADN del Factor VII y el sitio de restricción de Xhol) (sec. con núm. de ident.: 5); Cebador 68^R: 5' TCTAGAATAGGTATTTTCCACATG3' (contiene el sitio de restricción de XbaI) (sec. con núm. de ident.: 6); Cebador 69: 5' TCTAGAAAAAGAAATGCCAGC3' (contiene el sitio de restricción de XbaI) (sec. con núm. de ident.: 7); y Cebador 70^R: 5'GCGGCCGCATCCTCAGGGAAATGGGGCTCGCA3' (contiene el extremo 3' del ADN del Factor VII y el sitio de restricción de NotI) (sec. con núm. de ident.: 8).

50 La clonación se realizó en dos conjuntos de reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 67 y el cebador 68^R mediante el uso de un ADNc plasmídico con la secuencia del factor VII (OB-MHS4426) como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~534 pb, se aisló y se ligó al vector de clonación TA (Invitrogen, núm. de catálogo: K2000-01). Se aisló un fragmento de 55 Xhol-XbaI que contenía el amino terminal de la secuencia del factor VII. La segunda reacción se realizó con el cebador 69 y el cebador 70^R y de nuevo, un ADNc plasmídico con la secuencia del factor VII (OB-MHS4426) se usó como molde. Como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de ~813 pb y se ligó al vector de clonación TA (Invitrogen, núm. de catálogo: K2000-01). Se aisló un fragmento de XbaI-NotI que contenía el carboxilo terminal de la secuencia del factor VII. Los dos fragmentos se insertaron 60 en nuestro vector de expresión en eucariotas pCI-dhfr (triple ligadura) para producir el clon 501-0-p136-1.

El plásmido 501-p136-1 (Factor VII en el vector pCI-dhfr) se digirió con las enzimas de restricción Xhol y KpnI. Se aisló un fragmento de ~1186 pb. Un clon parcial del Factor VII (1180 pb-1322 pb) seguido por una secuencia CTP, una secuencia de terminación y una secuencia de NotI que se sintetizó por GeneArt (0721543) se digirió con las enzimas de restricción KpnI y NotI. Se aisló un fragmento de ~253 pb. Los dos fragmentos se insertaron en nuestro vector de expresión en eucariotas pCI-dhfr (triple ligadura) para producir

el clon 501-1-p137-2. pCI-dhfr-701-2-p24-2 se digirió con las enzimas de restricción Xhol y Apal, y el fragmento grande (vector) se aisló.

5 pCI-dhfr-501-2-p137-2 (Factor VII-ctp x1) se digirió con las enzimas de restricción Xhol y Apal, y se aisló un inserto de ~1200 pb. El vector y el inserto se ligaron para producir 501-2-p139-2. Las células Dg44 se sembraron en placas para cultivo de tejidos de 100 mm y se cultivaron hasta una confluencia de 50-60 %. Se usó un total de 2 µg de ADN para la transfección de una placa de 100 mm mediante el uso del reactivo FuGene (Roche) en medio libre de proteína (Invitrogen CD Dg44). El medio se eliminó a las 48 horas después de la transfección y se reemplazó con un medio libre de proteína (Invitrogen CD Dg44) sin 10 nucleósidos. Después de 14 días, la población celular transfectada se transfirió a matraces T25 para el cultivo de tejidos, y la selección se continuó durante 10-14 días hasta que las células comenzaron a crecer bien como un clon estable. Los clones con alta expresión se seleccionaron y se usaron aproximadamente 15 2x10⁷ células para inocular 300 ml de medio de crecimiento en una botella tipo rodillo de 1700cm² (Corning, Corning NY), suplementado con vitamina K3 a 5 ng/ml (menadiona bisulfato de sodio; Sigma). El medio de producción (cosecha) se recogió después de una disminución rápida en la viabilidad celular hasta alrededor de 70 %. El medio de producción se clarificó primero y después se concentró aproximadamente 20 veces y se dializó con PBS mediante el uso de un casete de filtración de flujo (10KDaMWCO; Millipore Corp, Billerica, MA).

20 Determinación del nivel del antígeno FVII

El ADNc que codifica al péptido CTP se fusionó al extremo 3' del ADNc que codifica al FVII humano. La construcción de rFVII correspondiente se transfeció a las células Dg44. Como control, se utilizó un ADNc de rFVII humano. El medio de producción (cosecha) se recogió, se concentró y el FVII recombinante secretado 25 se evaluó adicionalmente. Se determinaron los niveles de los antígenos rFVII, rFVII-CTP y rFVII-CTP-CTP mediante un estuche de ELISA para FVII humano AssayMax (AssayPro) (figura 20A). No se encontraron diferencias significativas en el nivel de secreción de rFVII-CTP y rFVII-(CTP)₂ en comparación con rFVII nativo.

30 Transferencias de SDS-PAGE

El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante la carga de 50 ng de cada proteína rFVII de cosecha, purificada o activada. Las muestras se cargaron en gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se llevó a cabo mediante la 35 realización de una inmunotransferencia Western con el uso de un anticuerpo monoclonal anti-FVII humano (Ac) (R&D systems) o un anticuerpo polyclonal anti-CTP generado en conejo.

El nivel del antígeno rFVII se correlacionó con el nivel detectado de proteína en una inmunotransferencia de SDS-PAGE con Ac anti-FVII. El rFVII-CTP migró como una única banda, mientras que el peso molecular 40 correspondiente del control de FVII fue de aproximadamente 52 KDa (datos no mostrados). Ambas proteínas reaccionaron con los anticuerpos específicos para FVII en las inmunotransferencias. El rFVII-CTP también reaccionó con anticuerpos específicos para CTP. rFVII se secretó en su forma de zimógeno sin traza de la proteína activada.

45 Actividad cromogénica de FVII:

Las actividades de rFVII, de la cosecha de rFVII-CTP y de rFVII-(CTP)₂ se determinaron mediante el uso de un estuche de prueba cromogénica disponible comercialmente (estuche de ensayo para la actividad cromogénica del FVII humano AssaySense (AssayPro). Para la caracterización funcional del rFVII-CTP y su 50 capacidad para activarse adicionalmente (FVIIa), el rFVII-CTP concentrado (cosechas) se colocaron en un estuche de prueba cromogénica disponible comercialmente que mide la capacidad de TF/FVIIa para activar el Factor X a Factor Xa que en presencia del sustrato específico de FXa libera una señal cuantificable (AssayPro). La adición del péptido CTP en el extremo C-terminal de la proteína rFVII no deterioró la actividad de serina proteasa del FVII (figura 20B, 20C).

55 Actividad de coagulación del FVII:

El tiempo de protrombina (PT) mide la vía de coagulación extrínseca. El PT es el tiempo (medido en segundos) necesario para que el plasma coagule después de la adición de un activador de la vía extrínseca, fosfolípido y calcio. Se usa para determinar la tendencia de coagulación de la sangre, específicamente en la medida de la dosificación de warfarina, daño hepático, y estado de la vitamina K. El intervalo de referencia para el tiempo de protrombina está usualmente alrededor de 12-15 segundos. Específicamente, el ensayo cuantificó la capacidad de la cosecha de FVII-CTP y FVII-(CTP)₂ para restaurar la actividad de coagulación del plasma humano con agotamiento de FVII mediante la adición de rhFVII. Se mezclaron 300 µl de plasma 60 humano deficiente de FVII con 100 µl de FVII, cosechas de FVII-CTP y FVII-(CTP)₂ a concentraciones específicas, o plasma humano normal mezclado y se diluyeron adicionalmente. Después de una incubación 65

de 60 segundos a 37 °C, se añadió el factor tisular (TF), CaCl₂, y fosfolípidos a la mezcla. Se determinó el tiempo de coagulación en segundos. La potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta de las cosechas de FVII-CTP y FVII-(CTP)₂ con una preparación de referencia que consistió en rhFVII o plasma humano mezclado. Una unidad de FVII activo se definió como la cantidad de FVII que iguala la actividad de un ml de plasma humano normal. La actividad de coagulación por PT de rFVII y rFVII-CTP se midió en un coagulómetro (Instrumentation Laboratory).

Como se mostró previamente, la adición de un péptido CTP en el extremo C-terminal de la proteína rFVII no afectó su actividad de serina proteasa y condujo a la iniciación y activación de un Factor X nativo y Factor IX en plasma humano. Después de la inserción de un CTP adicional en el C terminal, hubo una reducción de tres veces en la actividad de serina proteasa (datos no mostrados).

Estudio farmacocinético:

Las cosechas de rFVII, rFVII-CTP, y rFVII-(CTP)₂ se administraron por vía intravenosa a las ratas Sprague-Dawley (seis ratas por sustancia) con una dosis de 100 µg/kg de peso corporal. Para todos los experimentos *in vivo*, la cantidad de la proteína respectiva se determinó sobre la base de un estuche de ELISA para FVII. Para cada sustancia de prueba FVII, la cantidad inyectada se calculó teniendo en cuenta las diferencias en el peso molecular de rFVII frente a rFVII-CTP, lo que conduce a una concentración molar diferente.

Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital mediante el uso de un esquema de muestreo alternante para minimizar la interferencia del procedimiento de muestreo en los niveles a cuantificar: de 3 ratas a los 30 y 90 min y a las 2, 6 y 48 horas, y de las tres ratas restantes a los 15 y 60 min y a las 1,5, 4, y 24 horas alternativamente. El plasma se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. La concentración de FVII se cuantificó mediante un ensayo específico ELISA para FVII. El tiempo de vida media y el área bajo la curva (AUC) se calcularon mediante el uso de una regla trapezoidal lineal. La comparación de estos parámetros de aclaramiento reveló que el tiempo de vida media *in vivo* y el AUC de rFVII-(CTP)₂ son significativamente mayores que los de rFVII (tabla 30).

Tabla 30: Parámetro del estudio PK

Grupo	Ruta	Dosis	T _{1/2}	AUC _{0-t}	CL/F	MRT
		µg/kg	min	ng/min/mL	mL/min/kg	min
FVII	IV	60	4,07	3314,7	6,195	6,2
FVII - CTP	IV	60	β= 51,06	31353,9	0,287	73,7
FVII - CTP-CTP	IV	60	β= 13,66	7626,8	1,18	15,4

Caracterización de FVIIa recombinante-CTP:

Durante la activación, el FVII se escinde en R152 lo que resulta en que los dominios de las cadenas pesada y ligera se mantienen juntos por un único puente disulfuro. rFVIIa-(CTP)₂ se purifica y activa mediante un proceso de purificación en una columna de intercambio iónico. Para evaluar completamente el rFVIIa-(CTP)₂, la proteína se carga en SDS-PAGE en condiciones reductoras para el FVIIa comercial (NovoSeven®). Los dominios de la cadena pesada y la ligera se separan y migran como bandas separadas de pesos moleculares 55 y 25 KDa. Ambas proteínas reaccionan con anticuerpos específicos para FVII, pero la cadena pesada del rFVIIa-CTP reacciona específicamente con anticuerpos específicos anti-CTP, lo que indica que esta banda representa la cadena pesada de FVII fusionada al CTP. La cadena ligera reacciona específicamente con Ac anti-gamma carboxilasa. La concentración de la proteína FVIIa se determina mediante el estuche de ELISA específico para FVIIa.

Secuenciación del N-terminal de FVIIa:

rFVII-CTP-CTP en proteínas purificadas activadas o como zimógeno se separa mediante SDS-PAGE (en Tris-glicina al 12 %) y posteriormente se electrotransfiere a una membrana de PVDF. Las bandas de interés se cortan y se colocan en un filtro de fibra de vidrio purificado y tratado con Biobrene. El análisis de la secuencia del N-terminal se lleva a cabo mediante degradación de Edmann con el uso de un secuenciador de proteína líquida con pulsos, equipado con un sistema de microgradientes HPLC 140C. La identidad de la proteína recombinante y la adecuada escisión del propéptido se verifican adicionalmente mediante secuenciación del N-terminal.

Actividad de coagulación del FVIIa:

Para evaluar la actividad de coagulación de FVII-(CTP)₂, se realiza un ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). La muestra de plasma deficiente de FVII se sustituye con rFVIIa (NovoSeven®) o rFVIIa-(CTP)₂. Se mezclan 300 µl de plasma humano deficiente de FVII con 100 µl de FVIIa o rFVIIa-(CTP)₂

- 5 a las concentraciones específicas, o plasma humano mezclado normal que se diluye adicionalmente. Después de una incubación de 60 segundos a 37 °C, se añaden el factor tisular (TF), CaCl₂ y fosfolípidos a la mezcla. Se determina el tiempo de coagulación en segundos. La potencia se evalúa mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta de rFVIIa-(CTP)₂ con una preparación de referencia que 10 consiste en rhFVIIa o plasma mezclado normal humano. Una unidad de FVIIa se define como la cantidad de FVIIa que iguala la actividad de 1 ml de plasma humano normal. La actividad de coagulación por aPTT del rFVII y rFVIIa-(CTP)₂ se mide en un coagulómetro (Instrumentation Laboratory). La actividad de coagulación por aPTT de rFVIIa y rFVIIa-(CTP)₂ es similar.

15 Estudios farmacocinéticos en ratas:

Para caracterizar la influencia de la adición de CTP al rFVIIa sobre su potencial de longevidad, se realiza un estudio farmacocinético comparativo en ratas. NovoSeven® (rFVIIa) y rFVIIa-(CTP)₂ en TBS se inyectaron IV a 6 ratas SD. Los niveles de FVIIa en el tiempo se detectan mediante el uso de un estuche de ELISA para 20 FVIIa. El tiempo de vida media y el AUC se calculan para cada proteína. La comparación de estos parámetros de aclaramiento revela que las medidas del tiempo de vida media *in vivo*, la recuperación y el AUC del rFVIIa-(CTP)₂ son superiores a las de NovoSeven®.

25 Modelo de eficacia de FVIIa-CTP *in vivo* (modelo de hemofilia en ratón deficiente de FVIII):

Para evaluar el modelo de actividad *in vivo*, se obtienen ratones con inactivación del FVIII, y se establece una colonia de reproducción. 10 µg de hFVIIa recombinante comercial (NovoSeven®) o rFVIIa-(CTP)₂ se inyectaron en la vena de la cola de un ratón con inactivación del FVIII anestesiado (22-28 g). La cantidad de proteína inyectada es igual a la concentración requerida de FVIII en el plasma normal (5 µg/ml). Las 30 muestras de sangre se toman de la cola comprimida a los tubos capilares heparinizados en puntos de tiempo específicos. Las muestras de plasma se evalúan en cuanto a los niveles de FVIIa mediante ELISA, y la eficacia se mide mediante un ensayo de coagulación de PTT.

En este estudio, se genera una construcción de fusión del FVII con CTP. Esta proteína recombinante es la base para un tratamiento que proporciona un tiempo de vida media prolongado y retención de la potencia terapéutica.

Estos resultados sugieren que rFVIIa-(CTP)₂ tiene una eficacia terapéutica similar al rFVIIa en pacientes de hemofilia. Además, esta tecnología requiere una dosificación menos frecuente. Parece que una única 40 inyección de rFVIIa-(CTP)₂ es suficiente para controlar los episodios de hemorragia y reducir la cantidad de inyecciones que se necesitan durante una intervención quirúrgica. Esta proteína recombinante puede usarse como un tratamiento profiláctico a largo plazo.

45 Ejemplo 5

50 Evaluación comparativa de FVII-CTP₃, FVII-CTP₄, y FVII-CTP₅ purificados

5.1 Objetivo del estudio

55 Evaluación comparativa de los parámetros farmacocinéticos y la actividad de coagulación de FVII-CTP₄ y FVII-CTP₅ frente a FVII-CTP₃.60 5.2 Producción de las cosechas de FVII-CTP₄ y FVII-CTP₅

El ADNc del FVII fusionado en el extremo C-terminal a cuatro o cinco secuencias de CTP en tándem se expresó en células Dg44 mediante el uso del sistema de expresión Excellgene en presencia de vitamina K3 a 20 µg/L (Sigma, Mennadion). La cosecha se recogió (300 ml), se filtró y congeló.

65 5.3 Producción de la cosecha de FVII-CTP₃

FVII-CTP₃ se expresó en el laboratorio en sistema de expresión en mamíferos, células CHO, mediante el uso del vector pCI-DHFR. La mezcla estable transfectada #71 se cultivó en matraces de agitación, en presencia de vitamina K3 a 25 ng/L (Sigma). Las cosechas se recolectaron y filtraron.

66 Todas las cosechas de FVII-CTP (3, 4 y 5 CTP) se concentraron y dializaron contra TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) mediante el uso de Pellicon XL MWCO 10 kDa.

5.4 Determinación del nivel del antígeno FVII

5 El nivel del antígeno FVII se determinó mediante el uso de un estuche de ELISA para FVII humano (Zymotest HyPhen) (tabla 31). La concentración de proteínas calculada es el promedio de dos ejecuciones independientes.

Tabla 31: Nivel del antígeno FVII

	FVII-CTP ₃	FVII-CTP ₄	FVII-CTP ₅
Pr. (ng/ml)	224357,3	87884,1	589423
SD	44789,5	3248,7	5309
%CV	20,0	3,7	9

10

5.5 Inmunotransferencia de FVII-CTP

15 Las cosechas de FVII-CTP₃, FVII-CTP₄ y FVII-CTP₅ se cargaron en gel de Tris-glicina al 12 % (expedeon) mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante inmunotransferencia Western con el uso del Ac políclonal anti-CTP (Adar Biotech Production) o Ac anti-Gla (American Diagnostica).

20 El FVII fusionado a tres, cuatro y cinco CTP migró a 80, 90 y 100 KDa, respectivamente. Como se esperaba, las cosechas de FVII-CTP₄ y FVII-CTP₅ de Excellgene contienen bajo contenido de gamma carboxilación en comparación con la cosecha de FVII-CTP₃ que se produjo en ProLor ya que el proceso de producción no se optimizó (figura 21).

5.6 Evaluación comparativa de la potencia de FVII *in vitro*

25 Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de FVII-CTP₃, FVII-CTP₄ y FVII-CTP₅ purificadas en HA (fracción altamente gamma carboxilada) frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). Todas las muestras se diluyeron en serie, y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia que consistió en plasma normal humano. 30 FVII-CTP₃ y FVII-CTP₅ demostraron menor actividad cromogénica que el plasma normal mezclado (figura 22). FVII-CTP₄ demostró mayor actividad como se refleja por las relaciones de EC50, en comparación con FVII-CTP3 y FVII-CTP5 (tabla 32).

Tabla 32: Actividad de coagulación de FVII *in vitro*

35

Muestra	EC50 (ng/ml)	Relación de EC50 muestra/plasma
Plasma	0,05	
FVII 3CTP	0,12	2,72
FVII 4CTP	0,03	0,71
FVII 5CTP	0,06	1,35

5.7 Actividad de coagulación del FVII *in vitro*:

40 El ensayo de actividad del Factor VII (FVII), que se realizó en Sheba Medical Center, Centro Nacional de Coagulación de Israel, es un ensayo basado en la protrombina (PT) mediante el uso de plasma inmunoadsorbido deficiente en el Factor VII (Siemens). El reactivo del PT es innovin, y el ensayo se realiza en el instrumento CA 1500 Sysmex®. El intervalo normal del FVII está dentro de 55-145 %.

Tabla 33: Actividad cromogénica de FVII *in vitro*

45

Muestra	% de actividad de FVII	Concentración en la muestra analizada (μg/ml)	Concentración (μg/ml)
FVII 3CTP	36	0,5	224,2
	18	0,25	
	6	0,125	
FVII 4 CTP	334	0,5	87,9

	176	0,25	
	93	6,25	
FVII 5 CTP	38	0,5	58,9
	19	0,25	
	10	0,125	

Dado que el nivel normal de FVII circulante en el cuerpo es alrededor de 0,5 µg/ml, las cosechas de FVII-CTP₃ y FVII-CTP₅ muestran reducciones de 3 veces en su actividad de coagulación frente al plasma mezclado normal humano; este resultado se correlaciona con la actividad cromogénica obtenida (tabla 33).

- 5 La cosecha de FVII-CTP₄ muestra un aumento de 3 veces en su actividad de coagulación potencial frente al plasma mezclado normal humano como se observa en el ensayo de actividad cromogénica (tabla 33). El porcentaje de actividad de FVII-CTP₄ es mucho mayor en comparación con el porcentaje de actividad de FVII-CTP₃ y FVII-CTP₅. Las limitaciones metodológicas del método de ELISA pueden limitar la precisión de 10 los cálculos del nivel de Ag de FVII-CTP₄.

5.8 Estudio farmacocinético

- 15 Se realizaron dos estudios farmacocinéticos para determinar los parámetros farmacocinéticos (PK) de FVII-CTP₃, FVII-CTP₄ y FVII-CTP₅. Durante el primer estudio, FVII-CTP₃, FVII-CTP₄ y FVII-CTP₅ (Grupos A, B y C, respectivamente) se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague Dawley (seis 20 ratas por tratamiento) en una dosis de 250 µg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 3 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72 y 96 horas después de la dosificación (tabla 34). El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Tabla 34: Diseño del estudio farmacocinético – Cosecha concentrada

Grupo de tratamiento	Elemento de prueba	Núm. Animales/grupo/punto de tiempo	Vía de dosificación	Nivel de dosis (µg por animal)	Vol. inyectado (µl)	Conc. (µg/ml)	Puntos de tiempo (horas después de la dosificación)
A	FVII-CTP*3	6	IV	50	200	250	0 (antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
B	FVII-CTP*4	6	IV	50	200	250	0 (antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
C	FVII-CTP*5	6	IV	50	200	250	0 (antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96

- 25 La concentración de FVII en las muestras de plasma se cuantificó mediante el uso de estuches de Elisa para FVII humano (Zymutest FVII-Biophen). El perfil farmacocinético se calculó y es la media de 3 animales en cada punto de tiempo. Los valores del tiempo de vida media terminal se calcularon mediante el uso del programa informático PK Solutions 2.0. La tabla 35 más adelante resume las concentraciones calculadas de 30 FVII en los diferentes puntos de tiempo de muestreo. El perfil PK (Figuras 23-24) y un resumen de los parámetros PK (tabla 36) también se presentan más adelante. FVII-CTP₅ demostró un perfil superior en comparación con FVII-CTP₃ y FVII-CTP₄ (tabla 36).

Tabla 35: Primer estudio farmacocinético – Concentraciones de FVII

Tiempo (h)	PROM-FVII-3-CTP (ng/ml)	SD	PROM-FVII-4-CTP (ng/ml)	SD	PROM-FVII-5-CTP (ng/ml)	SD
0,083	4214	583	3600	427	4888	504
0,5	3386	892	5213	1682	5384	2549
2	1138	219	3603	1338	3082	289

5	1390	374	2726	1127	2480	561
8	333	167	1349	44	2316	633
24	133	12	476	98	788	34
48	38	3	165	24	384	61
72	12	2	91	62	167	31
96	26	1	42	8	93	49

Tabla 36: Análisis farcococinético

	FVII 3-CTP	FVII-4-CTP	FVII-5CTP
Tiempo de vida media (0.083-8 h) (h)	2,5	4,9	6,6
Tiempo de vida media (8-72h) (h)	13,3	16,6	17,7
AUC (ng-h/ml)(8-72h)	18374,6	51224,4	72954,2
Vd (ml/kg)(8-72h)	203,7	91,9	67,7
CL(ml/h/kg) (8-72h)	10,6	3,8	2,7

- 5 La adición de cuatro o cinco CTP prolongó significativamente el tiempo de vida media del FVII en comparación con 3 CTP en 2 y 3 veces, respectivamente (tabla 36). Esta superioridad fue más significativa en la parte inicial del estudio (0,083-8 horas), lo que sugiere una mejor recuperación potencial de la proteína y reducción del aclaramiento extravascular. El AUC después de la administración de FVII-CTP₄ y FVII-CTP₅ aumentó en 3 y 4 veces, respectivamente, frente a FVII-CTP₃. El aclaramiento también se redujo cuando se añadieron 4 y 5 CTP al FVII (tabla 36).

- 10 Como se observó en el estudio, la adición de cuatro y cinco CTP prolongó significativamente el tiempo de vida media del FVII en comparación con 3 CTP, tanto del tiempo de vida media inicial como terminal. Los valores del tiempo de vida media en el primer y segundo estudios son diferentes debido a un enfoque 15 diferente del análisis que se realizó por la dosis y la duración del estudio, sin embargo, se mantuvo la tendencia general. El AUC después de la administración de FVII-CTP₄ y FVII-CTP₅ aumentó en 2,5 y 7 veces, respectivamente, frente a FVII-CTP₃.

5.9 Conclusiones:

- 20 En este estudio, se evaluaron los parámetros PK y la actividad de coagulación potencial de FVII-CTP₃, FVII-CTP₄, y FVII-CTP₅. La fusión de 4 y 5 CTP al FVII proporcionó un superior y mejor tiempo de vida media, exposición y reducción del aclaramiento en comparación con FVII-CTP₃ a la vez que se mantuvo una similar actividad cromogénica y de coagulación *in vitro*. Estos resultados se observaron a diferentes concentraciones 25 de proteína y fueron consistentes para la proteína de la cosecha y la purificada. Al evaluar el efecto general de la fusión de CTP en el extremo C terminal al FVII, la fusión de 1-5 CTP aumentó considerablemente el tiempo de vida media y el AUC de FVII de una manera proporcional a los CTP, lo que sugiere que a medida que aumenta la porción CTP de la molécula, la longevidad y la estabilidad del FVII mejoran significativamente 30 a la vez que mantiene su actividad de coagulación inicial *in vitro*, como se resume en la tabla 37 a continuación.

Tabla 37:

FVII vs. FVII-CTP ₂	268	200
FVII-CTP ₂ vs. FVII-CTP ₃	67	57,8
FVII-CTP ₃ vs. FVII-CTP ₄	24	178
FVII-CTP ₄ vs. FVII-CTP ₅	6	42

Como se informó previamente, el tiempo de vida media del FVII se correlaciona con el tiempo de vida media de la forma activada del FVII (FVIIa) en humanos y animales. Por lo tanto, se prevé que se obtendrá una mejora similar en el tiempo de vida media para las versiones activadas después de la fusión de CTP.

5

Ejemplo 6

Estudios de factibilidad del FVII-CTP₃ en ratones hemofílicos deficientes de FVIII

- 10 Se realizaron los estudios descritos anteriormente que prueban el perfil PK y la actividad de coagulación de las cosechas de FVII-CTP, FVII-CTP₂ y FVII-CTP₃ frente a un FVII comercial. FVII-CTP₃ mostró un mejor perfil PK a la vez que mantuvo su actividad de coagulación frente a las cosechas de FVII-CTP y FVII-CTP₂ o rhFVII. Para caracterizar adicionalmente las propiedades de FVII-CTP₃ *in vitro* e *in vivo*, se generó una mini mezcla estable que expresaba y secretaba la proteína, y se desarrollaron procesos de purificación y activación.

15

En este estudio, las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de FVIIa-CTP₃ se analizaron en ratones deficientes de FVIII. Se evaluó el perfil PK de la proteína. Se estableció un perfil PK basado en la actividad específica de FVIIa y en comparación con el producto comercial NovoSeven®. Además, se analizaron las capacidades hemostáticas a largo plazo *in vivo* de FVIIa-CTP₃ para inducir la coagulación en ratones deficientes de FVIII después de un corte de la vena de la cola (estudio de supervivencia).

Objetivos del estudio:

- 25 Evaluar los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de FVIIa-CTP₃ frente al rhFVIIa comercial (NovoSeven®) en ratones deficientes de FVIII después de una única administración IV a una dosis de actividad similar.

- 30 Determinar la capacidad *in vivo* del FVIIa-CTP₃ para mantener la homeostasis en ratones deficientes de FVIII mediante una única administración IV de FVIIa-CTP₃ y NovoSeven® a una dosis de la actividad similar seguido por un reto de corte de la vena de la cola (estudio de supervivencia).

Producción de la cosecha de FVII-CTP₃:

- 35 FVII-CTP₃ se expresó en el laboratorio en células Dg44 mediante el uso de un vector pCI-DHFR. La mezcla estable transfundida #71 se cultivó en matraces de agitación, en presencia de vitamina K3 a 25 ng/L (Sigma). La suspensión celular se cultivó y cosechó después que la viabilidad disminuyó a 60-80 %. La cosecha se filtró y congeló a -70 °C.

- 40 Determinación del nivel del antígeno FVII de cosecha:

El nivel del antígeno FVII se determinó mediante el uso de un estuche de ELISA para FVII humano (Zymotest HyPhen) (tabla 38). El nivel del antígeno se calculó por cada lote de cosecha mezclado.

- 45 Tabla 38: Nivel del antígeno FVII-CTP₃

Nivel del antígeno FVII			
	Estudio de PK-PD		Estudio de supervivencia
	Cosecha 31A	Cosecha 31B	Cosecha 38
Pr. (µg/ml)	16,0	15,9	16,6
STD	1,5	0,0	0,8
%CV	9,1	0,1	4,9

Proceso de purificación de FVII-CTP₃ (figura 25)

- 50 Descripción del proceso

Después de un corto estudio de purificación, se realizó el siguiente proceso de purificación mediante el uso de 2 columnas. La proteína enriquecida γ-carboxilada FVII-CTP₃ se purificó en columna de afinidad VII-Select

(GE) e hidroxiapatita cerámica tipo 1 (HA), 40 μ m (Bio Rad). La autoactivación se indujo mediante incubación de FVII-CTP₃ purificado en presencia de CaCl₂ durante la noche a 2-8 °C. El proceso de purificación está en su etapa final de desarrollo y se está optimizando, por lo tanto, parte de las etapas de purificación no son idénticas en los dos lotes.

5

Ultrafiltración/diafiltración (UFDF) mediante el uso del casete de fibra hueca de 10 KDa o Pellicon

La cosecha clarificada se descongeló a 4 °C durante el fin de semana (2-3 días).

10

En el lote 31, la cosecha clarificada (12 litros) se concentró 4 veces (en dos ejecuciones sucesivas) mediante el uso de un cartucho de fibra hueca (GE Healthcare catálogo núm. UFP-10-C-4X2MA) con un valor de corte del peso molecular de 10 KDa. La cosecha concentrada se diafiltró contra 1-2 volúmenes de TBS (Tris 50 mM NaCl 150 mM pH 7,4).

15

En el lote 38, la cosecha clarificada (8,5 litros) se concentró 4 veces mediante el uso de un casete Pellicon 2 (Millipore) con un valor de corte del peso molecular de 10 KDa. La cosecha concentrada se cargó directamente en una columna VII-Select.

20

Ambas ultrafiltraciones se realizaron en hielo con tampones fríos. Las muestras UFDF se filtraron por 0,22 μ m antes de la carga.

Captura en la columna FVII-Select

25

La cosecha por UFDF o concentrada se cargó en la columna VII-Select (XK16/20, CV 18 ml), equilibrada previamente con TBS pH 7,4. La columna se lavó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5M, pH 7,5, y FVII-CTP₃ se eluyó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M 50 % (v/v), propilenglicol pH 7,5. El proceso se realizó en dos ciclos sucesivos con la utilización de la misma columna.

30

Separación basada en la gamma carboxilación en una columna de hidroxiapatita cerámica

35

El producto eluido se diluyó 1:10 con fosfato de sodio 10 mM, pH 6,8 y se cargó en columnas de hidroxiapatita cerámica (XK16/20, CV 24 ml). La columna se lavó con fosfato de sodio 59 mM, pH 6,8 y la fracción rica γ -carboxilada del Factor VII se eluyó con fosfato de sodio 500 mM, pH 6,8. Este proceso se realizó en dos ciclos sucesivos en la misma columna. En cada lote, los eluatos de los dos ciclos se combinaron y concentraron a 1,7-2 mg/ml y se diafiltraron con Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM pH 8,2 para reducir el volumen y preparar el material para la etapa de activación.

Activación de FVII

40

El FVII-CTP₃ purificado se diluyó a 1 mg/ml y se incubó en Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM y CaCl₂ 1 mM, pH 8,2 a 2-8 °C durante 24 horas. La activación se terminó mediante intercambio del tampón (UFDF) al tampón de formulación preliminar (citrato 20 mM, NaCl 240 mM, glicina 13,3 mM, pH 6,9).

45

Propiedades analíticas de FVII-CTP₃ y FVIIa-CTP₃:

SDS-PAGE y transferencias Western

50

El FVII-CTP₃ purificado, y FVIIa-CTP₃ se cargaron en gel de Tris-glicina al 12 % mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision Plus (Bio-Rad). El análisis del SDS-PAGE Coomassie se realizó mediante tinción del gel con el reactivo azul brillante de Coomassie (5 o 10 μ g de proteína/carril). Se realizó un análisis por transferencia Western (1 μ g de proteína/ carril) mediante el uso del Ac polyclonal anti-FVII humano (R&D systems; AF2338), anticuerpo monoclonal anti- γ -carboxilación humana (American Diagnostics catálogo #499, 3570), y Ac polyclonal anti-CTP. En condiciones reducidas, el FVII-CTP₃ migró a 75 KDa, y FVIIa-CTP₃ migró como dos bandas principales: una cadena pesada a 50 kDa, y una cadena ligera a 25 kDa, representado en la figura 26 como las bandas 2 y 3, respectivamente.

60

El procedimiento de purificación enriqueció significativamente la porción FVII-CTP₃ a la vez que redujo las impurezas. El rendimiento del proceso de purificación fue de 25-30 % de FVII (según ELISA). La mayor parte de la proteína perdida durante la purificación tenía baja actividad cromogénica del FVII o no tenía actividad. Basado en SDS-PAGE teñido con Coomassie, el FVIIa-CTP₃ reducido contiene más bandas que las predichas. Una banda que migra a alrededor de ~75 kDa representa el FVII no-activado (figura 26, Banda 1). Esta banda consiste en dos bandas con diferencias menores de PM, que podrían reflejar diferente contenido de γ -carboxilación. Se observaron bandas adicionales con PM menor que 20 kDa. Previamente se informó que estos son productos de degradación de la cadena pesada.

65

Actividad cromogénica de FVII-CTP₃:

Una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de la cosecha de FVII-CTP₃, las fracciones durante el proceso, y FVII-CTP₃ purificado frente al plasma mezclado normal humano se realizó mediante el uso de un estuche de prueba de la actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). La cosecha de FVII-CTP₃ y la proteína se diluyeron en serie y la potencia se evaluó mediante la comparación de una curva de dosis-respuesta con una preparación de referencia de plasma normal humano. Despues de la purificación de FVII-CTP₃, la actividad cromogénica mejoró significativamente, y las fracciones no activas se separaron principalmente mediante columna HA (figura 27). Se observó una fuerte correlación entre la actividad cromogénica de FVII y la detección de FVII con anticuerpos monoclonales anti-Gla en la transferencia Western. La potencia de la actividad cromogénica de FVII como se refleja por el valor de EC50 en la cosecha se afecta por ambas fracciones de FVII carboxiladas y no carboxiladas. Despues de la purificación y el enriquecimiento de la fracción γ-carboxilada de FVII-CTP₃, la actividad mejoró, lo que demuestra la contribución importante de la γ-carboxilación para la actividad de FVII (figura 27). Este parámetro es crucial para una adecuada actividad de FVII *in vivo* y se abordará adicionalmente en un programa de desarrollo de clones.

Determinación de proteínas por A280

El coeficiente de extinción teórico de FVIIa-CTP₃ y NovoSeven® se calculó mediante el uso del algoritmo ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>). El cálculo se basa en la secuencia de aminoácidos. Los coeficientes de extinción calculados para FVII-CTP₃ y NovoSeven® son 1,186 y 1,406, respectivamente. Estos valores representan la absorbancia de 1 g/L a 280 nm.

La diferencia de los coeficientes de extinción entre las dos proteínas se deriva solamente del aumento en el peso molecular de FVIIa-CTP₃ en comparación con NovoSeven®, dado que el CTP carece de residuos aromáticos y de cisteína, por lo tanto, no contribuye a la absorbancia.

La determinación de proteínas por A280 se usa para FVII final, y para las muestras purificadas durante el proceso, que inició desde la elución de la columna VII-Select.

Determinación del nivel del antígeno FVIIa

El nivel del antígeno FVIIa se determinó mediante el uso del estuche de ELISA para FVIIa humano (IMUBIND, American Diagnostica). El nivel del antígeno se calculó por cada lote. Sin embargo, esta herramienta no fue útil para la determinación de la dosis para la inyección, ya que no representa la cantidad de producto activo.

Ensayo de coagulación de FVIIa- Staclot® VIIa-rTF

FVIIa se deriva de una escisión intracatenaria del FVII monocatenario. El factor tisular nativo (TF) es un cofactor de FVIIa. Despues de la unión a TF, el FVII media la activación del Factor X a Xa, mientras que él mismo se transforma a FVIIa. El factor tisular soluble es la parte extracelular del factor tisular nativo. Éste ya no puede activar el FVII por autoactivación, pero el FVIIa unido al factor tisular puede activar FX a FXa.

El factor tisular soluble recombinante (rsTF) usado en este ensayo utiliza la especificidad al FVIIa para construir una prueba de coagulación con FVIIa. El rsTF, en presencia de FVIIa, calcio y fosfolípidos conduce a la coagulación del plasma, sin activar FVII a FVIIa.

El tiempo de coagulación observado en este sistema tiene una relación inversa con el contenido de FVIIa en la muestra analizada, sin interferencia de la presencia de FVII en la muestra.

El ensayo se realizó por Omri Laboratories (Nes-Ziona, Israel). La actividad de FVIIa se evaluó para ambos NovoSeven® después de la reconstitución y FVIIa-CTP₃ antes de cada estudio. La actividad de NovoSeven® no se correlacionó con la actividad anticipada como se informó en el frasco, pero la discrepancia puede deberse a un enfoque diferente en la evaluación de la actividad. La tabla 39 resume la actividad de coagulación del FVIIa por volumen sin considerar la concentración de proteínas.

Tabla 39: Actividad de coagulación del FVIIa de los productos por lote

	Estudio PK		Estudio de supervivencia	
	FVIIa-3*CTP (FVIIa 31)	NovoSeven ®	FVIIa-3*CTP (FVIIa 38)	NovoSeven ®
			Actividad (U/ml)	
60	Actividad específica de FVIIa-CTP ₃			

- 5 La actividad específica del FVIIa (que se calcula como la actividad/ml dividida por la concentración de proteínas) se calculó basada en A280 y se presenta en la tabla 40. Cuando se compara la actividad específica de las dos moléculas, que difieren en PM, debe realizarse la compensación para normalizar la actividad (es decir debido a la diferencia de peso molecular, la cantidad de sitios activos en 1 mg de NovoSeven® es 1,185 veces mayor que en FVIIa-CTP₃). El cálculo del factor de conversión se presenta en la siguiente ecuación:

$$AE_{\text{normalizada}} = \frac{AE(\text{FVIIa-CTP}_3)}{PM(\text{FVII_nativa})} \times PM(\text{FVII_nativa})$$

$$= \frac{AE(\text{FVIIa-CTP}_3)}{45079.103} \times 53618.503 = AE(\text{FVIIa-CTP}_3) \times 1.185$$

10

Tabla 40: Actividad específica de FVIIa-CTP₃ en comparación con NovoSeven®

Muestra	A280 promedio	STDV (n=9)	% CV	Coeficiente de Extinción	conc. de prot. (mg/ml)	U/ml	Actividad específica		Disminución en veces de NovoSeven®
							U/mg proteína	U/mg FVIIa	
NovoSeven®	1,274	0,031	2,398	1,406	0,906	8,36E+05	9,23E+05	9,23E+05	1,0
FVIIa-CTP ₃	4,396	0,092	2,094	1,186	3,706	7,23E+05	1,95E+05	2,31E+05	4,6

- 15 Estudio PK-PD de FVIIa-CTP
- ₃
- :

Descripción del estudio

- 20 FVIIa-CTP₃ y rhFVIIa (NovoSeven®, NS) se administraron en una única inyección intravenosa a los ratones C57B deficientes de FVIII a una dosis de 6,4E6 U/kg de peso corporal (160,000 U/animal). Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 4 ratones alternativamente a las 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, y 72 horas después de la dosificación (tabla 41). El plasma citratado (0,32 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. Se evaluó la actividad de coagulación del nivel de FVIIa, y se realizó un análisis PK detallado. El estudio se realizó por Omri Laboratories (Nes-Ziona, Israel).

Tabla 41: Descripción del estudio

Grupos tratados	Elemento de prueba	Núm. animales/grupo/punto de tiempo	De Vía dosificación	Cantidad de unidades/animal	Vol. inyectada (μl)	Puntos de tiempo (horas después de la dosis)
A	rhFVIIa	4	IV	1,6e5	200	0 (Antes de la dosis) 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72
B	FVIIa - CTP ₃	4	IV	1,6e5	200	0 (Antes de la dosis) 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72

- 30 Perfil PK de FVIIa-CTP
- ₃
- en ratones deficientes de FVIII

- 35 Se cuantificó la actividad de FVIIa en muestras de sangre mediante el uso de un estuche para VIIa-TF Staclot® (Stago, Parsippany, NJ). El perfil farmacocinético se calculó para cada proteína y representa la media de 4 animales en cada punto de tiempo. La figura 28 presenta el perfil PK de FVIIa a lo largo del experimento. La recuperación de FVIIa se presenta en la tabla 42. En la tabla 43 se presenta un resumen de los parámetros PK.

- 40 La tabla 41 resume los valores de la actividad de coagulación después de la administración de NovoSeven® o FVIIa-CTP₃. FVIIa-CTP₃ y NovoSeven® alcanzaron la actividad máxima media hora después de la dosificación. El valor más alto de la actividad de NovoSeven® alcanzó solo el 43 % del valor máximo de actividad de FVIIa-CTP₃. La actividad de coagulación de FVIIa-CTP₃ se mantuvo durante un periodo de

tiempo más prolongado, lo que demuestra una actividad prolongada. La actividad de coagulación para los ratones tratados con NovoSeven® no se detectó en los puntos de tiempo más tardíos que 12 horas, mientras que los ratones tratados con FVIIa-CTP₃ mantuvieron una actividad medible a las 48 horas después de la dosificación (tabla 41 y Figura 28).

5 La adición de tres copias de CTP en tandem al FVIIa elevó la recuperación en 100 % (tabla 42), según se midió por la actividad más alta después de la dosificación y en comparación con la actividad anticipada basada en el análisis *in vitro*, y aumentó el tiempo de vida media y el tiempo medio de residencia (MRT) 5 veces. El tiempo de exposición (AUC) se incrementó 3 veces (tabla 43).

10 Tabla 41: Actividad de coagulación de FVIIa después de una única inyección IV

Tiempo después de la administración (horas)	Para actividad de coagulación de FVIIa (U/ml)	
	FVIIa-CTP ₃	NovoSeven®
0,16	6,8E+07	3,2E+07
0,5	9,7E+07	4,3E+07
2	2,1E+07	3,9E+06
4	7,7E+06	7,3E+05
8	2,7E+06	4,2E+04
12	3,7E+05	6,2E+03
24	2,4E+04	BLQ
36	4,8E+03	BLQ
48	1,5E+03	BLQ

15 Tabla 42: Recuperación de FVIIa-CTP₃

Tratados. Grupos	Elemento de prueba	Cantidad de unidades/animal	Dosis administrada práctica (U/ml)	* Cmáx anticipada (U/ml sangre)	Cmáx (U/ml)	% Recobrado
A	rFVIIa	1,60E+05	1,20E+06	1,40E+05	4,25E+04	30
B	FVIIa - CTP ₃	1,60E+05	1,29E+06	1,50E+05	9,74E+04	64,6

* Cmáx anticipada se deriva de la dosis administrada dividida por el volumen de sangre

Tabla 43: Parámetro de PK de FVIIa-CTP₃ vs. NovoSeven®

Parámetros PK	NovoSeven®	FVIIa-CTP ₃
Tiempo de vida media- α (0.5-12h)	0,94	1,57
Tiempo de vida media- β (12-48h)	NA	4,62
AUC (mU*h/ml)	5,80E+07	1,80E+08
Vd/Kg (ml/Kg)	1408	2375
CL/Kg (ml/h/Kg)	1034	356
MRT (h)	1,3	6,7

20 Ensayo de generación de trombina (TGA)

25 La generación de trombina es una parte fundamental de la cascada de coagulación y como tal un estimado de cuán bien un individuo particular puede generar trombina puede correlacionarse con un riesgo de hemorragia o trombosis. Las variables medidas comúnmente cuando se analiza la generación de trombina incluyen: el tiempo de retraso, el tiempo hasta la generación máxima de trombina, el máximo, el potencial de trombina endógena [ETP] (es decir, el área bajo la curva y la cola), el curso de tiempo del trombograma ("TG"). Después de un tiempo de retraso, se observa un aumento de trombina. Sin embargo, la coagulación se produce al final del tiempo de retraso, cuando más del 95 % de toda la trombina todavía no se ha formado.

30 El ensayo de generación de trombina se realizó en Omri Laboratories, mediante el uso de reactivos Thrombinoscope suplementado con plasma hemofílico humano. El TGA refleja la capacidad de coagulación en el plasma de ratones, derivada de la inyección de NovoSeven® y FVIIa-CTP₃. La figura 29 presenta los valores de los parámetros de TGA para el plasma de ratones después de la administración de FVIIa-CTP₃ o NovoSeven®. Después de la administración de FVIIa-CTP₃, los tres parámetros (velocidad de generación de

trombina, cantidad máxima de trombina generada y K_{IIa}) demuestran una ventaja del tratamiento con FVII-CTP₃ sobre NovoSeven®. Esto reafirma adicionalmente la noción de la superioridad de la acción prolongada potencial del FVII-CTP₃ en comparación con NovoSeven®.

5 Estudio de corte de la vena de la cola (TVT) y FVIIa-CTP₃:

Descripción del estudio

Los datos obtenidos de la prueba PK/PD para FVIIa-CTP₃ proporcionó información sobre la funcionalidad del FVIIa-CTP₃, y demostró que FVIIa-CTP₃ tiene una ventaja farmacocinética cuando se compara con NovoSeven®. Sin embargo, la capacidad de la proteína para inducir un coágulo *in vivo*, después de un evento traumático todavía no se ha demostrado. Para evaluar la capacidad de FVIIa-CTP₃ para detener la hemorragia, el mismo modelo de ratones deficientes de FVIII se empleó para un reto de sangrado.

10 15 Los ratones deficientes de FVIII se administraron con una única inyección intravenosa de FVIIa-CTP₃ o NovoSeven®. Los ratones se dosificaron con el fármaco en cantidades que proporcionan una actividad de FVIIa equivalente (1,6E05 unidades, 200 µl), calculada según la potencia de cada fármaco evaluado en el ensayo de actividad de coagulación para FVIIa (tabla 44). Las dosis administradas fueron 9 mg/kg de NovoSeven®, y 40 mg/kg de FVII-CTP₃ debido a la actividad reducida de FVIIa-CTP₃. Un grupo control se 20 inyectó con 200 µl de vehículo.

La vena de la cola se cortó 2,7 cm desde la punta de la cola a los 15 min (inyección 1), 24 horas (inyección 2) o 48 horas (inyección 3) después de la administración, y la supervivencia de los ratones se registró durante 24 horas.

25 Tabla 44: Evaluación de las muestras inyectadas

Inyección núm.	NovoSeven®			FVIIa-CTP ₃			
	conc. de proteínas (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	conc. de proteínas (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Actividad específica (normalizada)
1	0,91	8,0E+05	8,8E+05	3,63	6,6E+05	1,8E+05	2,2E+05
2	0,92	8,3E+05	9,0E+05	3,81	7,8E+05	2,0E+05	2,4E+05
3	0,89	8,8E+05	9,9E+05	3,68	7,3E+05	2,0E+05	2,3E+05

30 La concentración de proteínas se determinó por A280.

35 Resultados

Los datos de los grupos control inyectados con vehículo para las tres inyecciones (5 animales x 3 inyecciones), se resumieron y se presentan en la figura 30. Se observó 30 % de supervivencia a las 24 horas 35 después del corte de la vena de la cola.

40 Los ratones tratados con NovoSeven® y FVIIa-CTP₃ demostraron adecuada actividad hemostática después del corte de la vena de la cola realizado 15 min después de la administración de FVIIa. Se observó un 100 % de la tasa de supervivencia en los animales tratados con FVIIa-CTP₃ y NovoSeven® (figura 30).

45 48 horas después de la administración, se demostró una disminución en la tasa de supervivencia en los grupos tratados con FVIIa-CTP₃ o NovoSeven® (figura 30C). Se observó una ligera mejora en los ratones 50 con FVIIa-CTP, pero la diferencia no alcanzó significación estadística.

Discusión:

55 La fusión de CTP a proteínas recombinantes aumenta el tiempo de vida media en circulación de las proteínas a la vez que mantiene una actividad comparable. A la vez que el mecanismo detrás de la reducción del aclaramiento de la proteína por encima de un valor umbral de 70 KDa se entiende bien con respecto al aclaramiento renal, se logra una protección adicional después de la fusión de CTP. Se considera que la

fusión de CTP barre alrededor del escudo proteico y lo protege de la escisión proteolítica, para aumentar su peso molecular radial debido a la carga altamente negativa y para reducir su afinidad con los receptores hepáticos de eliminación.

- 5 El presente estudio tuvo como objetivo proporcionar información específica sobre el impacto de la fusión de CTP al FVII sobre el tiempo de vida media y el aclaramiento de la proteína y además aborda el paradigma de su actividad específica después de esta modificación. Los ratones deficientes de FVIII se administraron con una única inyección IV de FVIIa-CTP₃ o FVIIa recombinante comercial (NovoSeven®) en dosis similar (basada en la unidad) y se realizó un análisis basado en la actividad PK. FVIIa-CTP₃ demostró una 10 longevidad superior como se refleja por el aumento de 5 y 3,5 veces en su tiempo de vida media y AUC, respectivamente. La actividad específica (U/mg) de FVIIa-CTP según se calculó por el estuche para la actividad Staclot® dividido por la concentración de proteínas medida por A280 se demostró que fue 4-5 veces menor que la actividad específica de NovoSeven®.
- 15 Para contribuir a la comprensión de cómo el CTP afecta los efectos hemostáticos de FVIIa *in vivo*, se investigó la capacidad de FVIIa-CTP₃ para reducir una hemorragia. En el modelo de hemorragia por corte de la vena de la cola en el modelo de ratones hemofílicos, la administración de rFVIIa puede mejorar la tasa de supervivencia de los animales retados y evitar su sangrado hasta la muerte. En el estudio descrito en la 20 presente, los animales se administraron con FVIIa-CTP₃ o NovoSeven®. Ambas moléculas fueron capaces de mantener la homeostasis cuando el corte se realizó 0,25 horas después de la dosificación. Se demostró una duración significativamente prolongada de la actividad para el grupo tratado con FVIIa-CTP₃ cuando el corte de la cola se realizó 24 horas después de la dosificación. La tasa de supervivencia del grupo tratado con vehículo fue mayor que la anticipada y mayor que la obtenida en estudios anteriores (50 % frente a 20 % 25 en estudios anteriores, datos no mostrados). El por ciento de supervivencia de los animales tratados también se evalúa en puntos de tiempo más tempranos, que incluyen a las 36 horas después de la dosificación.

En conclusión, se demostró que FVIIa-CTP₃ tiene una duración aumentada de la actividad en los ratones hemofílicos lo que se traduce en una duración más prolongada del efecto hemostático en comparación con NovoSeven®. Los datos reunidos sugieren que la fusión de CTP a FVII es una tecnología con el potencial de 30 mejorar significativamente el tratamiento profiláctico en pacientes con hemofilia.

Ejemplo 7: Evaluación comparativa del perfil de FVII-CTP₃ purificado frente a FVII-CTP₅ después de una inyección única IV o SC a ratas SD

35 Objetivo del estudio

Se llevaron a cabo dos estudios:

40 El objetivo del primer estudio fue determinar los parámetros farmacocinéticos de rFVII-CTP₃ frente a rFVII-CTP₅ después de la purificación en columna FVII select y HA en ratas macho Sprague Dawley, después de una única administración intravenosa de 50 µg/animal.

45 En el segundo estudio, los parámetros farmacocinéticos de rFVII-CTP3-HA frente a rFVII-CTP5-HA se examinaron en ratas macho Sprague Dawley después de una única administración intravenosa o subcutánea de 100 µg/animal.

Resultados

Determinación del nivel del antígeno FVII-CTP 3 y FVII-CTP 5

50 El nivel del antígeno FVII se determinó mediante el uso del estuche de ELISA para FVII humano (Zymotest HyPhen) (Véase la tabla 45). T

55 Tabla 45. Resumen de la concentración de proteínas calculada, que es el promedio de tres ejecuciones independientes.

	FVII 3 CTP		FVII 5 CTP	
	FVIIIS 46 el.Conc. Dial	FVII HA 46 el.Conc. Dial	FVIIIS el.Conc. Dial	FVII HA 5 100 % BConc. Dial
PROM (ng/ml)	3,78E+06	1,59E+06	1,88E+06	7,92E+05
SD	1,30E+06	6,03E+05	7,15E+05	3,57E+05
CV (%)	3,43E+01	3,80E+01	3,80E+01	4,51E+01

Análisis por transferencia Western de las muestras examinadas

- 5 Las muestras de FVII-CTP_{3,5} se cargaron en 4-12 % de bisTrisgel (*NuPage, Invitrogen*) mediante el uso del marcador de proteína de color dual Precision plus (Bio-Rad). El análisis por SDS-PAGE se realizó mediante inmunotransferencia Western con el uso del Ac políclonal anti-FVII (R&D systems), Ac políclonal anti-CTP (Adar biotech production) o Ac anti Gla (American diagnostic). En resumen, el FVII fusionado a tres y cinco CTP migró a 80 y 100 KDa, respectivamente (véase la figura 31).

10 Evaluación comparativa de la potencia de FVII *in vitro*

- El ensayo de actividad de FVII, que se realizó en Sheba Medical Center, el Centro Nacional de Coagulación, es un ensayo basado en PT con el uso de plasma inmunoadsorbido deficiente en factor VII (Siemens). El reactivo de PT es innovin y el ensayo se realiza en el instrumento Sysmex CA 1500. El intervalo normal del FVII está dentro de 55-145 %. Las actividades de las muestras se resumen en la tabla 46.

Tabla 46: Actividad de las muestras

Muestra	Concentración (mg/ml) según (NANODROP)	Concentración en la muestra analizada (μg/ml)	Resultados (%)	Promedio-% de plasma
FVII-5CTP FVIIIS el. Conc. Dial	2,19	2	87	16 %
		1	30	
		0,5	10	
FVII-5CTP HA 5 100 %B conc. Dial	1	2	97	21 %
		1	36	
		0,5	13	
FVIIIS 46 el. Conc. Dial	3,17	2	100	18 %
		1	35	
		0,5	12	
FVII HA 46 el. Conc. Dial (1)	1,5	2	92	20 %
		1	33	
		0,5	10	

- 20 El nivel normal de FVII circulante en el cuerpo es alrededor de 0,5 μg/ml. Ambos, FVII-CTP₃ y FVII-CTP₅ muestran reducciones de aproximadamente 5 veces en su actividad de coagulación frente al plasma mezclado normal humano.

25 Estudio farmacocinético

- Se realizaron dos estudios farmacocinéticos para determinar el perfil y los parámetros farmacocinéticos (PK) de FVII-CTP₃ y FVII-CTP₅ (después de la columna select para FVII y HA para FVII). En el primer estudio, FVII-CTP₃, y FVII-CTP₅ después de la purificación de FVII por select/ HA se administraron en una única inyección intravenosa a las ratas Sprague Dawley (seis ratas por sustancia) en una dosis de 50 μg/rata.

- 30 Las muestras de sangre se extrajeron de manera retroorbital de 3 ratas alternativamente a las 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,38 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 hasta su análisis.

- 35 En el segundo estudio, solo se analizaron las muestras después de la columna HA. Estas muestras se administraron en una única inyección intravenosa o subcutánea a las ratas Sprague Dawley (seis ratas por sustancia) mediante el uso de una dosis de 100 μg/rata. Las muestras de sangre se recolectaron en los mismos puntos de tiempo y condiciones como en el primer estudio anterior.

- 40 Tabla 47. Diseño del primer estudio (FVII select frente a FVII HA).

Grupos tratados	Elemento de prueba	Núm. de animales/ grupo/	Vía de dosificación	Nivel de dosis (μg por animal)	Vol. inyectado (μl)	Conc. (μg/ml)	Puntos de tiempo (horas después de la dosis)
-----------------	--------------------	--------------------------	---------------------	--------------------------------	---------------------	---------------	--

A	FVII-CTP*3 lote 46 HA	6	IV	50	200	250	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
B	FVII-CTP*3 lote 46 FVII S	6	IV	50	200	250	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
C	FVII-CTP*5 lote 5 HA	6	IV	50	200	250	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
D	FVII-CTP*5 lote 5 FVII S	6	IV	50	200	250	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120

Tabla 18. Diseño del segundo estudio (IV frente a SC)

Grupos tratados	Elemento de prueba	Núm. de animales/grupo/	Vía de dosificación	Nivel de dosis (μg por animal)	Vol. inyectado (μl)	Conc. (μg/ml)	Puntos de tiempo (horas de dosis)
A	FVII-CTP*3 lote 46 HA	6	IV	100	200	500	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
B	FVII-CTP*3 lote 46 HA	6	SC	100	200	500	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
C	FVII-CTP*5 lote 5 HA	6	IV	100	200	500	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
D	FVII-CTP*5 lote 5 HA	6	SC	100	200	500	0 (Antes de la dosis) 0,083, 0,5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120

- 5 Las diferencias principales entre estos dos estudios son las dosificaciones y la vía de administración. En el primer estudio, las ratas se inyectaron IV con 50 μg/rata, mientras en el segundo estudio, las ratas se inyectaron IV o SC con 100 μg/rata (total 500 μg/kg; peso de las ratas 200 g). El aumento en la dosificación se debe al cambio en el tipo de administración; la administración SC requiere mayores cantidades para lograr efectos similares a la administración IV.

10

Análisis del estudio de PK

- 15 La concentración de FVII en las muestras de plasma se cuantificó mediante el uso de estuches de Elisa para FVII humano (zymutest FVII-Biophen). Los perfiles farmacocinéticos se calcularon y reflejan la media para 3 animales en cada punto de tiempo. Los valores del tiempo de vida media terminal se calcularon mediante el uso del programa informático PK solutions 2.0. La tabla más adelante resume las concentraciones calculadas de FVII en los diferentes puntos de tiempo de muestreo. El perfil PK y un resumen de los parámetros PK se presentan en una tabla más adelante.

- 20 Tabla 49. Primer estudio farmacocinético (FVII select frente a FVII HA) -concentraciones de FVII (ng/ml).

Tiempo (hora)	FVII CTP*3 Lote 46 HA	FVII CTP*3 Lote 46 FVII S	FVII CTP*5 Lote 5 HA	FVII CTP*5 Lote 5 FVII S
0,083	1816,3	1633,9	2064,3	1853,5
0,5	1523,7	1409,9	1351,4	1418,0
2	1284,9	1041,7	1389,7	834,4
5	607,9	531,6	722,7	737,2

8	524,2	430,0	712,2	614,6
24	115,5	132,9	272,5	201,8
48	21,1	31,6	62,3	90,4
72	9,5	15,8	29,1	31,8
96	BLQ	5,8	7,0	16,9
120	BLQ	BLQ	8,5	13,4

Tabla 50. Segundo estudio farmacocinético (IV frente a SC) -concentraciones de FVII (ng/ml).

Tiempo (hora)	FVII CTP*3 Lote 46 HA-IV	FVII CTP*5 Lote 5 HA-IV	FVII CTP*3 Lote 46 HA-SC	FVII CTP*5 Lote 5 HA-SC
0,083	6452,6	6153,3	5,0	BLQ
0,5	3930,7	3660,6	14,5	14,6
2	1992,3	2176,2	113,6	96,2
5	1598,9	2087,3	106,6	70,5
8	781,6	1075,6	188,9	129,7
24	268,5	627,2	155,0	239,2
48	51,9	143,3	43,0	88,6
72	8,8	39,0	7,0	36,7
96	BLQ	10,8	BLQ	10,4
120	BLQ	8,2	BLQ	8,7

5 Tabla 51. Análisis PK- primer estudio farmacocinético (FVII S frente a HA).

	FVII CTP*3 Lote 46 HA	FVII CTP*3 Lote 46 FVII S	FVII CTP*5 Lote 5 HA	FVII CTP*5 Lote 5 FVII S
Tiempo de vida media (0,083-8 h) ()	4,3	4,0	5,51	5,59
Tiempo de vida media (8-72/96/120 h) (horas)	11,1	12,1	16,46	20,29
Tiempo de vida media (8-72) (h)	11,1	13,4	13,62	15,64
AUC(O-t)(área obs)(8-72/96/120 h)	14566,9	13686,4	21812,7	19307,9
AUC (∞) área(8-72/96/120 h)	14718,2	13788,1	22013,9	19701
Vd(área)/kg (ml/kg)(8-2/96/120 h)	271,1	316,1	269,7	371,5
CL(área)/kg(ml/h/kg) (8-72/96/120 h)	17,0	18,1	11,356	12,69

La adición de cinco CTP prolongó el tiempo de vida media de FVII en comparación con 3 CTP. Ambas formas de 5 CTP (es decir FVII S y FVII HA) se detectaron en los mayores puntos de tiempo (96 y 120 horas), mientras que FVII-3 CTP HA y FVII-3 CTP se detectaron hasta las 72 horas y 96 horas, respectivamente. Basados en este hecho, el tiempo de vida media de FVII-5 CTP es más prolongado que las variantes de 3CTP (véase la figura 32). La comparación del tiempo de vida media de todos los materiales examinados (3 y 5 CTP) en los mismos puntos de tiempo (8-72 horas) mostró que los tiempos de vida media son similares, aunque los de 5 CTP son considerablemente más prolongados (figura 32).

10

15 Tabla 52: Análisis PK - segundo estudio farmacocinético (IV frente a SC).

	FVII CTP*3 Lote 46 HA- IV	FVII CTP*5 Lote 5 HA- IV	FVII CTP*3 Lote 46 HA- SC	FVII CTP*5 Lote H5 HA- SC	Biodisponibilidad CTP*3	Biodisponibilidad CTP*5
Tiempo de vida media (0,083-8 h) (h)	3,0	3,9	-1,8	-3,18		
Tiempo de vida media (8-72/96/120 h) (h)	9,9	14,6	13,14	22,94		
Tiempo de vida media (8-72) (h)	9,9	13,0	13,14	29,47		
AUC(O-t)(área obs)(8-72/96/120 h)	28866,8	43761,0	6600	9822,7	22,9	22,4
AUC (∞) área(8-72/96/120 h)	28993,0	43934,4	6733	10110,8	23,22	23,01
Vd(área)/kg (ml/kg) (8-72/96/120 h)	246,4	240,5	1407,6	1636,8		
CL(área)/kg(ml/h/kg) (8-72/96/120 h)	17,2	11,4	74,261	49,452		

De nuevo, como se observó en el primer estudio, la adición de 5 CTP prolongó el tiempo de vida media de FVII en comparación con la adición de 3 CTP, en el tiempo de vida media inicial y terminal y en ambas formas de administración (IV y SC, véase la figura 33). Como se esperaba, después de la administración SC, FVII se detectó primero en la sangre a un punto de tiempo más tardío en comparación a cuando se administró IV.

En lo anterior, se resumieron dos estudios PK. El propósito principal del primer estudio fue verificar la diferencia entre FVII-3CTP y FVII-5 CTP después de 2 columnas diferentes: FVII select y FVII HA. En nuestros estudios anteriores, se verificaron las proteínas de cosecha frente a las purificadas y se encontró que la diferencia entre las versiones 3 y 5 CTP del FVII fue mayor cuando se inyectó la cosecha a las ratas.

No hubo diferencia significativa entre los resultados de FVII 3\5 CTP después de ambas columnas, por tanto, se decidió inyectar FVII HA 3\5 CTP en el segundo estudio.

Ejemplo 8: Estudio de supervivencia con FVIIa-CTP₃ (MOD-5014) en ratones decientes de FVIII después de una inyección subcutánea

Objetivo del estudio

Evaluar la eficacia de NovoSeven®, MOD-5014 (FVIIa-CTP₃) y MOD-5019 (FVIIa-CTP₅) en un estudio con corte de la vena de la cola, después de una administración subcutánea.

Propiedades analíticas de FVIIa-CTP₃(MOD-5014) y FVIIa-CTP₅(MOD 5019):

Determinación de proteínas por A280

El coeficiente de extinción teórico de NovoSeven® se calculó mediante el uso del algoritmo ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>). El cálculo se basa en la secuencia de aminoácidos. El coeficiente de extinción calculado para NovoSeven® es 1,406, y para MOD-5019 es 1,075 (los valores representan la absorbancia de 1 g/l a 280 nm). El coeficiente de extinción de MOD-5014 se determinó mediante un análisis de aminoácidos en Mscan. El coeficiente de extinción para MOD-5014 es 1,27.

Ensayo de coagulación de FVIIa - STACLOT VIIa-rTF

5 FVIIa se deriva de una escisión intracatenaria del FVII monocatenario. El factor tisular nativo (TF) es un cofactor de FVIIa, tras la unión al TF, el FVII media la activación del Factor X a Xa, mientras que él mismo se transforma a FVIIa. El factor tisular soluble es la parte extracelular del factor tisular nativo. Éste ya no puede activar el FVII por autoactivación, pero el FVIIa unido al factor tisular puede activar FX a FXa.

10 El factor tisular recombinante soluble (rsTF) usado en este ensayo utiliza la especificidad al FVIIa para construir una prueba de coagulación del FVIIa. El factor tisular recombinante soluble (rsTF), en presencia de FVIIa, calcio y fosfolípidos, produce coagulación del plasma sin activar FVII a FVIIa.

El tiempo de coagulación observado en este sistema tiene una relación inversa con el contenido de FVIIa en la muestra analizada, sin interferencia de la presencia de FVII en la muestra.

15 La actividad de FVIIa se evaluó para NovoSeven® reconstituido, y para MOD-5014 y MOD-5019 antes de cada estudio.

20 La actividad específica de FVIIa (que se calcula como la actividad/ ml dividida por la concentración de proteínas) se calculó basado en A280 y se presenta en la tabla 53. Cuando se compara la actividad específica de las dos moléculas, que difieren en el peso molecular, debe realizarse la compensación para normalizar la actividad (es decir debido a la diferencia de peso molecular, la cantidad de sitios activos en 1 mg de NovoSeven® es 1,185 veces mayor que en MOD-5014 y 1,307 veces mayor que en MOD-5019). Por tanto, el cálculo del factor de conversión se presenta en la siguiente fórmula:

$$\text{AE_normalizada} = \frac{\text{AE}(\text{FVIIa-CTP}_1)}{\text{PM}(\text{FVII_nativo})} =$$

$$= \frac{\text{AE}(\text{FVIIa-CTP}_1)}{45079,10} \times 53419,50 = \text{AE}(\text{FVIIa-CTP}_1) \times 1,185$$

25

Tabla 53- Actividad específica de MOD-5014 en comparación con NovoSeven®

Muestra	Conc. de proteínas Por A280 (mg/ml)	Actividad específica (U/mg FVIIa)	Disminución en veces de NovoSeven®
NovoSeven®	0,93	52 487	1,0
MOD-5014 lote 73	1,4	25 490	2,05
MOD-5019 lote 9	3,0	11 698	4,48

30 Descripción del estudio

La medición más significativa es la capacidad de la proteína para inducir un coágulo *in vivo*, después de un evento traumático. Para evaluar la capacidad de MOD-5014 para detener una hemorragia, se empleó el mismo modelo de ratones deficientes de FVIII para un reto de sangrado.

35

Los ratones deficientes de FVIII se administraron con una única inyección subcutánea de MOD-5014, MOD-5019 o NovoSeven®. Los grupos A y B se dosificaron con NovoSeven® y MOD-5014 respectivamente, en cantidades equivalentes a la actividad de FVIIa. El grupo C se dosificó con MOD-5019 en una cantidad equivalente a la proteína FVIIa como MOD-5014, para evaluar el factor crítico (actividad o cantidad de proteína). Las dosis administradas fueron 4,2 mg/kg de NovoSeven®, y 8,6 mg/kg de MOD-5014 y MOD-5019. La vena de la cola se cortó 2,7cm desde la punta de la cola, 12 horas después de la administración, y la supervivencia de los ratones se registró durante 24 horas.

Tabla 54 – Designación de los grupos

45

Grupo	Fecha de la inyección	Elemento de prueba	Dosis administrada		Volumen inyectado (μl)	Núm. de ratones por grupo	Tiempo de sangrado, horas después de la dosificación
			mg de FVII/Kg	mU/Kg			
A	13.1.13	®NovoSeven	4,23	221 876	100	10	12

B	15.1.13	MOD-5014, lote 73	8,59	218 750	160	10	12
C	27.1.13	MOD-5019, lote 9	8,59	100 496	160	10	12

Resultados

Los datos del experimento se resumen en la tabla 55 y en la figura 34.

5

Tabla 55. Resultados del estudio de TVT

Tiempo Después de TVT (h)	Núm. de ratones sobrevivientes			% de supervivencia		
	NovoSeven®	MOD-5014	MOD-5019	NovoSeven®	MOD-5014	MOD-5019
0	9	10	10	100	100	100
1	9	10	10	100	100	100
2	9	10	10	100	100	100
3	8	10	8	89	100	80
4	6	9	8	67	90	80
5	5	9	7	56	90	70
6	4	8	5	44	80	50
7	3	8	5	33	80	50
8	2	7	5	22	70	50
9	1	6	5	11	60	50
10	1	5	5	11	50	50
11	1	3	5	11	30	50
12	1	3	5	11	30	50
24	1	3	4	11	30	40

10 24 horas después de TVT, solo 11 % de los ratones inyectados con NovoSeven® habían sobrevivido. El 30 % de MOD-5014 y el 40 % de MOD-5019 habían sobrevivido hasta este punto de tiempo. MOD-5014 y MOD-5019 inyectados por vía subcutánea muestran mejor supervivencia de los ratones en comparación con NovoSeven®. Sin embargo, los resultados no son óptimos ya que más del 50 % de los animales murieron durante el experimento.

15 15 El factor VIIa, como otros factores de coagulación, se inyecta normalmente por vía intravenosa, para que esté disponible directamente en el torrente sanguíneo. Sin embargo, la presente invención muestra que las 20 composiciones proporcionadas en la presente sorprendentemente se absorben más eficazmente en el torrente sanguíneo después de la administración SC. La posibilidad de administrar el FVIIa por vía subcutánea constituye una ventaja ya que puede usarse para aplicaciones profilácticas. Además, es mucho más fácil que los pacientes se inyecten ellos mismos las inyecciones subcutáneas, y son una ventaja cuando los pacientes son muy jóvenes y sus venas son pequeñas y difíciles de encontrar.

Por tanto, la aplicación subcutánea puede usarse para un tratamiento profiláctico,

25 25 Ejemplo 9: Estudio de PK-PD comparativo de MOD-5014 recombinante vs. NOVOSEVEN® después de una administración subcutánea en ratas SD

Objetivos del estudio

30 30 Determinar los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de MOD-5014 frente a rFVIIa comercial en ratas SD después de una única administración SC.

35 35 Comparar dos experimentos independientes (05010 y 05034) que contienen los productos MOD-5014 originados a partir de dos clones diferentes (clon núm. 28 frente al 61) según sus parámetros farmacocinéticos.

Métodos experimentales

Animales

24 ratas SD machos arribaron de Harlan Laboratories Israel, Ltd, al menos 4 días antes de iniciar las inyecciones. Los animales eran adultos jóvenes saludables, de ~200 gr al inicio del estudio. La variación del

5 peso corporal de los animales en el momento de iniciar el tratamiento no debía exceder \pm 20 % de la media del peso de cada sexo. El estado de salud de los animales usados en este estudio se examinó a su llegada. Solo los animales con buen estado de salud se adaptan a las condiciones del laboratorio y se usan en el estudio.

10 Ensayo de coagulación de FVIIa - STACLOT VIIa-Rtf

El factor tisular recombinante soluble (rsTF) usado en este ensayo utiliza la especificidad al FVIIa para construir una prueba de coagulación de FVIIa. rsTF, en la presencia de FVIIa, calcio y fosfolípidos produce coagulación del plasma, sin activar FVII a FVIIa.

15 15 El tiempo de coagulación observado en este sistema tiene una relación inversa con el contenido de FVIIa en la muestra analizada, sin interferencia de la presencia de FVII en la muestra.

20 20 Se evaluó la actividad de FVIIa para NovoSeven® después de la reconstitución y para MOD-5014 antes de cada estudio. La actividad específica de FVIIa se calculó basada en A280. Cuando se compara la actividad específica de las dos moléculas, que difieren en PM, debe realizarse la compensación para normalizar la actividad (es decir debido a la diferencia de peso molecular, la cantidad de sitios activos en 1 mg de NovoSeven® es 1,185 veces mayor que en MOD-5014).

25 Programa informático PK solver

30 Los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante el uso del programa informático PK solver. La curva de administración IV se analizó como bolo CA de dos compartimentos, y la administración SC como análisis trapezoidal lineal Log - NCA Extravascular. Se calcularon las especificaciones del tiempo de vida media, el AUC, el aclaramiento y la distribución de volumen y los parámetros de salida se estudiaron en comparación entre los grupos de los experimentos.

Materiales experimentales

35 Experimento núm. 05010:

A. NovoSeven® RT: (Lote # AU61553 preparado el 31.7.12*) Concentración de FVIIa por A280: 0,86 mg/ml. Ensayo de actividad de FVIIa Staclot: 56 867 U/mg. Dosis inyectada: 946 μ g/kg. *Mezcla de alícuotas de NovoSeven®, todas del mismo lote núm.

40 B. Clon 28: MOD-5014 RS12-001: 0,77 mg/ml** basado en A280. Ensayo de actividad de FVIIa Staclot: 34 162 U/mg. Dosis inyectada: 850 μ g FVIIa/kg.

45 Experimento núm. 05034:

A. NovoSeven® RT: (Lote #AU61347 preparado el 1.1.13) Concentración de FVIIa por A280: 0,82 mg/ml, diluida a 0,4 mg/ml con tampón NS estéril. Ensayo de actividad de FVIIa Staclot: 55 688 U/mg. Dosis inyectada: 360 μ g/kg y 20 047,7 U/kg.

50 B. Clon 61: MOD-5014 Lote 75: 1,9 mg/ml** basado en A280, diluida a 0,89 mg/ml con tampón de formulación. Dosis inyectada: 20 047,7 U/kg. Actividad de coagulación del FVIIa: 25 002* U/mg basado en el ensayo de actividad de FVIIa Staclot.

55 C. Clon 61: MOD-5014 Lote 81A: 2,36 mg/ml basada en A280 (filtrado en la mañana del día del estudio y se volvió a medir a 280 nm), diluida a 0,4 mg/ml con tampón de formulación. Dosis inyectada: 360 μ g FVIIa/kg. Actividad de coagulación del FVIIa: 24943U/mg basada en el ensayo de actividad de FVIIa Staclot.

60 D. Clon 61: MOD-5014 Lote 81A: 2,36 mg/ml basada en A280, diluida a 0,89 mg/ml con tampón de formulación. Dosis inyectada: 20 047,7 U/kg. Actividad de coagulación del FVIIa: 24 943 U/mg basada en el ensayo de actividad de FVIIa Staclot.

Descripción de los estudios

Experimento núm. 05010

65 MOD-5014 y NovoSeven® se administraron en una única inyección intravenosa o subcutánea a las ratas SD

en una dosis de 0,9 mg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron a partir del seno orbital del ojo de 3 ratas alternativamente a las 0,5, 4, 8, 12, 24, 34, 48 y 58 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,32 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a - 20 °C hasta su análisis. El estudio se realizó en "Science in Action", Nes-Ziona. Se evaluó el nivel de actividad de coagulación del FVIIa y se realizó un análisis PK detallado en Prolor-Biotech.

5

Tabla 55: Diseño del estudio 05010

Grupos Tratados	Elemento de prueba	Num. animales/ grupo	Núm. animales/grupo/ punto de tiempo	Vía de dosificación	Género	Nivel de dosis (μg/kg)	Vol. inyectado (μl)	Puntos de tiempo (horas después de la dosificación)
A	rFVIIa (Novo Seven®)	6	3	IV	M	946	220	0, 0,5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58
B	rFVIIa RS 12-001 (clón 28)	6	3	IV	M	850	220	0, 0,5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58
C	rFVIIa (Novo Seven®)	6	3	SC	M	946	220	0, 0,5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58
D	rFVIIa RS 12-001 (clón 28)	6	3	SC	M	850	220	0, 0,5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58

10 Experimento núm. 05034

MOD-5014 y NovoSeven® se administraron en una única inyección subcutánea a las ratas SD en una dosis de 0,9 mg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron del seno orbital del ojo de 3 ratas alternativamente a las 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48 y 72 horas después de la dosificación. El plasma citratado (0,32 %) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. El estudio se realizó en "Science in Action", Nes-Ziona.

15

Se evaluó el nivel de actividad de coagulación del FVIIa y se realizó un análisis PK detallado en Prolor-Biotech.

20

Tabla 56: Diseño del estudio 05034

Tratados. Grupos	Elemento de prueba	Núm. de animales/grupo/ punto de tiempo***	Vía de dosificación	Género	Nivel de dosis por animal (μg/kg)	Nivel de dosis por animal (U/kg)	Vol. inyectado (μl)	Puntos de tiempo (horas después de la sdosis)
A	FVIIa (NovoSeven®)	3	SC	M	360	20047.7	207	0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72
B	FVIIa 75 (clón 61)	3	SC	M	801,8 4	20047.7	207	0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72
C	FVIIa 81A (clón 61)	3	SC	M	360	8979,48	207	0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72
D	FVIIa 81A (clón 61)	3	SC	M	803,7 4	20047.7	207	0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72

Resultados

25

La actividad del FVIIa en las muestras de sangre se cuantificó mediante el uso del estuche STACLOT VIIa-RTF (Stago). El perfil farmacocinético se calculó para cada proteína y es la media de 3 animales en cada

punto de tiempo.

Experimento númer. 05010

5 Después de la reducción de fondo: 15 mU/ml.

La figura 35 presenta el perfil PK de FVIIa después de la administración IV y SC de NovoSeven® o MOD-5014. En la tabla 57 se presenta un resumen de los valores de actividad del FVIIa para cada punto de tiempo. La administración IV y SC tienen un patrón PK diferente (véase la figura 35; después de la reducción de fondo: 15 mU/ml). La Cmáx después de la inyección IV es mayor que la obtenida después de la inyección SC, debido a la presencia del fármaco en la sangre inmediatamente después de la administración (medida a las 0,5 hora, tabla 57 y tabla 58). Sin embargo, después de la administración SC las moléculas del fármaco se transfieren a la matriz intracelular y los tejidos, por lo tanto, la Cmáx puede medirse solo después de 2 horas de la inyección. La recuperación total del fármaco después de la administración SC es menor que el valor de Cmáx después de la inyección IV.

8 horas después de la inyección, NovoSeven® manifestó un patrón PK igual cuando se inyectó IV o SC, (después de la reducción de fondo: 15 mU/ml, figura 35). Además, no se detectó actividad de coagulación para los ratones tratados con NovoSeven® en los puntos de tiempo después de las 12 horas, mientras que los ratones tratados con MOD-5014 retuvieron la actividad medible a las 58 horas después de la dosificación (tabla 57; después de la reducción de fondo: 15 mU/ml; figura 35).

20 Tabla 57. Actividad de coagulación del FVIIa de MOD-5014 frente a NovoSeven® después de la administración IV o SC

Tiempo (h)	NovoSeven® IV (A)		MOD-5014 IV (B)		NovoSeven® SC (C)		MOD-5014 SC (D)	
	mU/ml	% CV	mU/ml	% CV	mU/ml	% CV	mU/ml	% CV
0,5	304651,7	18,7	232818,3	5,0	11491,7	2,4	3691,7	19,0
4	40068,3	7,8	62085,0	9,5	21385,0	22,6	12018,3	15,8
8	5276,7	2,5	25931,7	6,1	5525,0	32,5	6445,0	2,2
12	255,0	13,8	5633,3	9,3	297,7	41,4	924,7	24,1
24	1,3	7,1	251,3	11,8	1,3	89,2	249,3	60,3
34	0,0		78,3	4,5	0,0		63,7	85,5
48			29,0	9,9	0,0		35,0	47,2
58			10,3	4,6	0,0		13,7	33,5
Después de la reducción de fondo: 15 mU/ml.								

25 Tabla 58: Parámetros PK de MOD-5014 vs. NovoSeven® después de la administración IV o SC

A. IV		
Parámetros PK	NovoSeven® RT (A)	MOD-5014 (RS 12-001) (B)
Tiempo de vida media- α (0,5-4 h)	0,24	1,04
Tiempo de vida media- β (4-58 h)	1,31	3,17
AUC 0-inf mU/ml*h	702467,95	820778,67
Vss [U/Kg/(mU/ml)]	0,13	0,13
CL [(U/Kg)/(mU/ml)/h]	0,08	0,04
MRT (h)	1,74	3,62

30 B. SC

Parámetros PK	NovoSeven® RT (B)	MOD-5014 (RS 12-001) (C)
Tiempo de vida media (h)	1,40	7,78

Cmáx (mU/ml)	21385,00	12018,33
AUC 0-inf (mU/ml*h)	115099,72	84158,87
MRT 0-inf (h)	4,32	7,04
Vz/F (U/Kg)/(mU/ml)	0,95	3,88
Cl/F (U/Kg)/(mU/ml)/h	0,47	0,35

Experimento núm. 05034

La figura 36 presenta el perfil PK de FVII a después de la administración SC de NovoSeven® o MOD-5017.

5 Dos lotes diferentes del clon núm. 61 (#75 y #81) se examinaron a la misma concentración o las mismas unidades de actividad, en comparación con NovoSeven®. En la tabla 59 se presenta un resumen de los valores de actividad del FVIIa para cada punto de tiempo.

10 Los resultados indican un patrón PK similar después de la administración SC correspondiente a los experimentos anteriores. Además, no se detectó actividad de coagulación para los ratones tratados con NovoSeven® en los puntos de tiempo después de las 12 horas, mientras que los ratones tratados con MOD-5014 retuvieron una actividad medible a las 24 horas después de la dosificación (tabla 59 y figura 36; y después de la reducción de fondo: 56 mU/ml (8, 12 horas) o 32 mU/ml (0,5, 2, 6, 14 horas)).

15 El clon núm. 61 lote #81 (D) Cmáx (1,301 mU/ml) fue menor que los valores de Cmáx del clon núm. 61 lote #75 (B) y NovoSeven® (A) (3,521 mU/ml y 5,908 mU/ml respectivamente), aunque todos se inyectaron con la misma actividad unitaria (tabla 6). Sin embargo, el lote #75 (B) y #81 (D) tienen las mismas unidades de actividad (559 mU/ml y 478 mU/ml respectivamente) medidas 8 horas después de la inyección (figura 36 y tabla 59; y después de la reducción de fondo: 56 mU/ml (8, 12 horas) o 32 mU/ml (0,5, 2, 6, 14 horas)).

20 Tabla 59: Actividad de coagulación del FVIIa de MOD-5014 (Clon 61 #75, #81) frente a NovoSeven® después de una única administración SC.

Tiempo (h)	NovoSeven® (A)		MOD-5014 Clon 61 Lote 75 (B) - igual U/kg		MOD-5014 Clon 61 Lote 81A (C) - igual conc.FVIIa µg/kg		MOD-5014 Clon 61 Lote 81A (D) - igual U/kg	
	mU/ml	% CV	mU/ml	% CV	mU/ml	% CV	mU/ml	% CV
0,5	3271,3	46,5	350,3	26,6	101,3	24,1	208,7	51,2
2	5908,0	18,1	3521,3	70,9	1294,7	7,0	1301,3	31,6
6	1411,7	23,6	1349,7	45,6	425,3	27,6	663,0	13,4
8	1029,0	12,4	559,3	52,7	152,7	19,5	478,0	25,4
12	121,3	9,9	563,0	17,4	148,7	36,3	712,7	16,2
24	1,0	25,0	117,0	41,9	21,3	36,4	99,0	36,7

25 Después de la reducción de fondo: 56 mU/ml (8,12 horas) o 32 mU/ml (0,5, 2, 6, 14 horas).

Tabla 60: Parámetros PK de MOD-5014 (Clon 61 #75, #81) frente a NovoSeven® después de una única administración SC.

Parámetros de Pk	NovoSeven® RT (A)	MOD-5014 Clon 61 Lote 75 (B)-igual U/kg	MOD-5014 Clon 61 Lote 81A (C)- igual conc.FVIIa µg/kg	MOD-5014 Clon 61 Lote 81A (D)-igual U/kg
Tiempo de vida media (horas)	1,67	5,70	4,62	6,41
Cmáx (mU/ml)	5908,00	3521,33	1294,67	1301,33
AUC 0-inf (mU/ml*h)	24688,18	20456,96	6260,23	13098,16
MRT 0-inf (horas)	3,73	7,86	6,40	10,59

Vz/F (U/Kg)/(mU/ml)	1,96	8,06	9,55	14,15
Cl/F (U/Kg)/(mU/ml)/h	0,81	0,98	1,43	1,53

- Este informe resume dos estudios PK; 05010 y 05034. Nuestro objetivo fue proporcionar información específica sobre el impacto de la fusión de CTP a FVII en el tiempo de vida media y el aclaramiento de la proteína en una administración subcutánea y abordar el paradigma de su actividad específica después de esta modificación. En estos estudios, las ratas SD se administraron con una única inyección SC de MOD-5014 originado de dos clones, y dos lotes diferentes, en comparación con el FVIIa recombinante comercial (NovoSeven®). Los componentes se inyectaron a una concentración similar de FVIIa ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) o al mismo nivel de actividad (U/Kg) y se realizó el análisis basado en la actividad PK.
- El propósito principal del primer estudio fue verificar los diferentes parámetros PK después de una administración IV y SC. Basados en este estudio podemos concluir que existe una diferencia entre el patrón PK medido después de una administración IV o SC. A un $t^{1/2}$ de 7,78 horas medido después de la inyección SC de MOD-5014, y solo 4,2 horas después de la inyección IV. Los valores de AUC fueron los mismos (tabla 58).
- El segundo estudio, sin embargo, estuvo destinado a las diferencias entre dos lotes de MOD-5014 clon núm. 61, que se inyectaron con la misma concentración de FVIIa o en igual unidad de actividad, en comparación con NovoSeven®. En este estudio demostramos que el clon 61 lote #75 manifestó mejores parámetros PK que el lote #81. El lote #81, que se inyectó al mismo nivel de actividad unitaria, tuvo menor Cmáx por un motivo desconocido. Además, se midió la misma Cmáx cuando se inyectó el clon 61 lote #81 en dos dosis diferentes (por la concentración de FVIIa o por la actividad unitaria), en lugar de 2,5 veces entre los dos valores de actividad. Después del análisis de ambos estudios en conjunto, podemos concluir que el clon 28 manifestó un parámetro de $t^{1/2}$ prolongado que el clon 61 #75 (el mejor lote) después de la inyección SC (7,78 horas y 5,7 horas respectivamente, tabla 60). Podemos concluir además que las muestras en puntos de tiempo diferentes crean un patrón PK diferente, que conduce a una variación en las curvas PK. Los patrones de las curvas pueden enseñarnos más sobre el comportamiento del fármaco en la sangre. Por lo tanto, decidimos determinar los puntos de tiempo similares a los detectados por Baxter (0, 0,5, 2, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72 horas). Además, la concentración de FVIIa en el experimento 05010 fue demasiado alta, y se revisó en el siguiente experimento SC (05034). Para futuros estudios PK, decidimos inyectar el componente a 360 μg de FVIIa/kg para una dosis.

En conjunto, podemos aprender más sobre nuestro producto MOD-5014 después de una administración SC para determinar el clon y lote de más calidad y decidir el mejor método para la cantidad de inyecciones de MOD-5014- por la concentración de FVIIa o por las unidades de actividad.

REIVINDICACIONES

1. Un factor de coagulación modificado con péptido del carboxilo terminal de la gonadotropina coriónica (CTP) que consiste en un factor de coagulación y tres CTP unidos al carboxilo terminal de dicho factor de coagulación, y en donde dicho factor de coagulación modificado con CTP es:
 - a. un polipéptido del factor IX (FIX) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31 o los aminoácidos 47-545 de la sec. con núm. de ident.: 31,
 - b. un polipéptido del factor VII (FVII) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 25 o los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25, o
 - c. un factor VII activado (FVIIa) modificado con CTP que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 39-528 de la sec. con núm. de ident.: 25;
- 15 para su uso en el tratamiento de hemofilia A en sujetos humanos.
2. El factor de coagulación modificado con CTP para su uso según la reivindicación 1, en donde al menos uno de dichos CTP unidos está glicosilado.
- 20 3. El factor de coagulación modificado con CTP para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde un CTP está unido a dicho factor de coagulación a través de un enlazador.
- 25 4. El factor de coagulación modificado con CTP para su uso según la reivindicación 3, en donde dicho enlazador es un enlace peptídico.
- 30 5. El factor de coagulación modificado con CTP para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde durante la activación, el polipéptido FVII se escinde en R152 dando lugar a dominios de cadena pesada y ligera que se mantienen unidos por un único puente disulfuro.
- 35 6. El polipéptido FVII de coagulación modificado con CTP para su uso según la reivindicación 5, en donde dichos dominios de cadena pesada y ligera están separados y migran como bandas separadas de pesos moleculares de 55 kDa y 25 kDa.
- 40 7. El factor de coagulación modificado con CTP para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho factor de coagulación modificado con CTP se administra a dicho sujeto en forma de una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.
8. El factor de coagulación modificado con CTP para su uso según la reivindicación 7, en donde dicha administración es una vez a la semana.
- 45 9. El factor de coagulación modificado con CTP para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, mediante administración subcutánea o intravenosa.
10. El factor de coagulación modificado con CTP para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho sujeto es un sujeto hemofílico, o es un sujeto que padece de una deficiencia de vitamina K o una enfermedad hepática.
- 50 11. El factor de coagulación modificado con CTP para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicho sujeto es un niño.

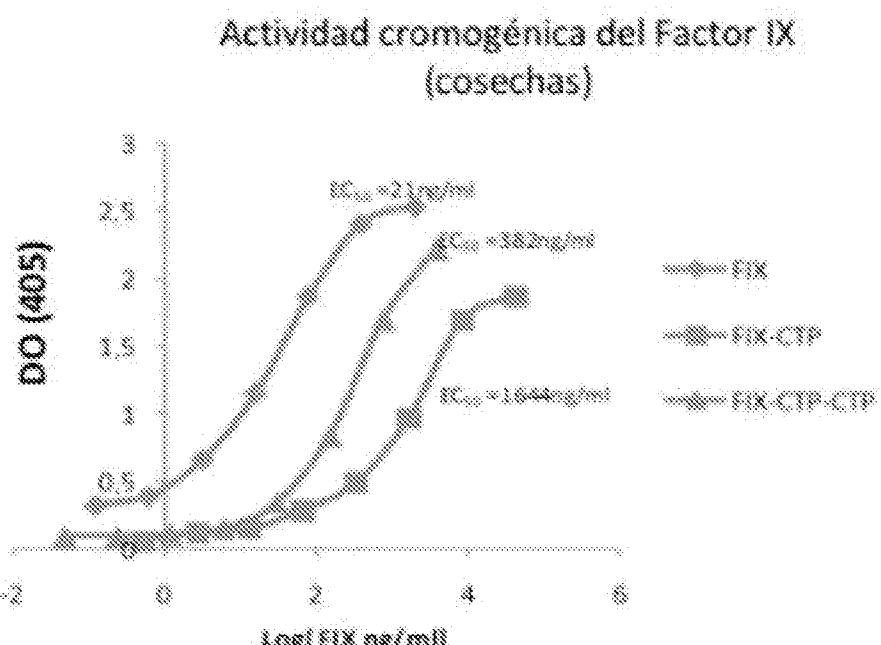
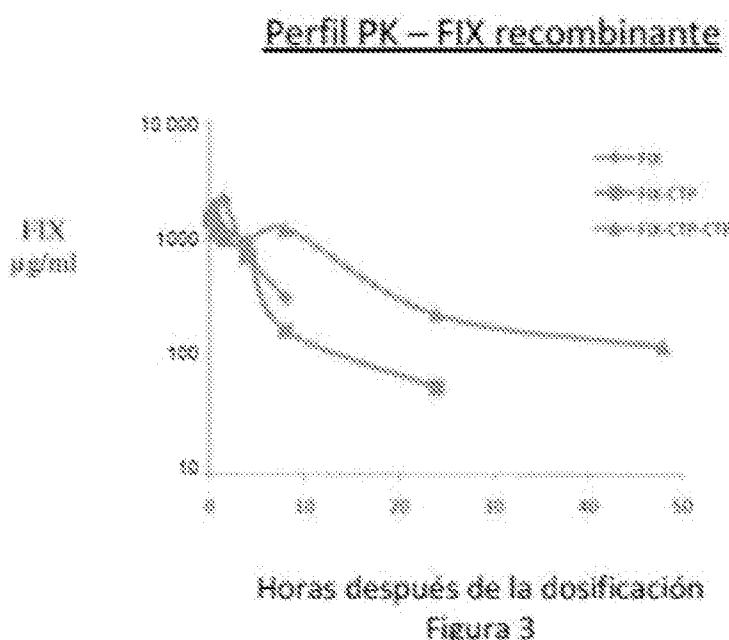


Figura 2



Horas después de la dosificación
Figura 3

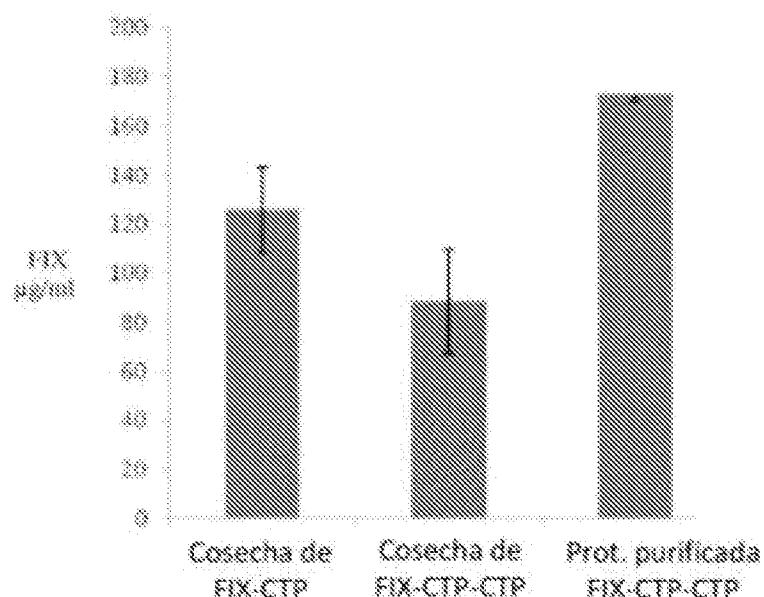
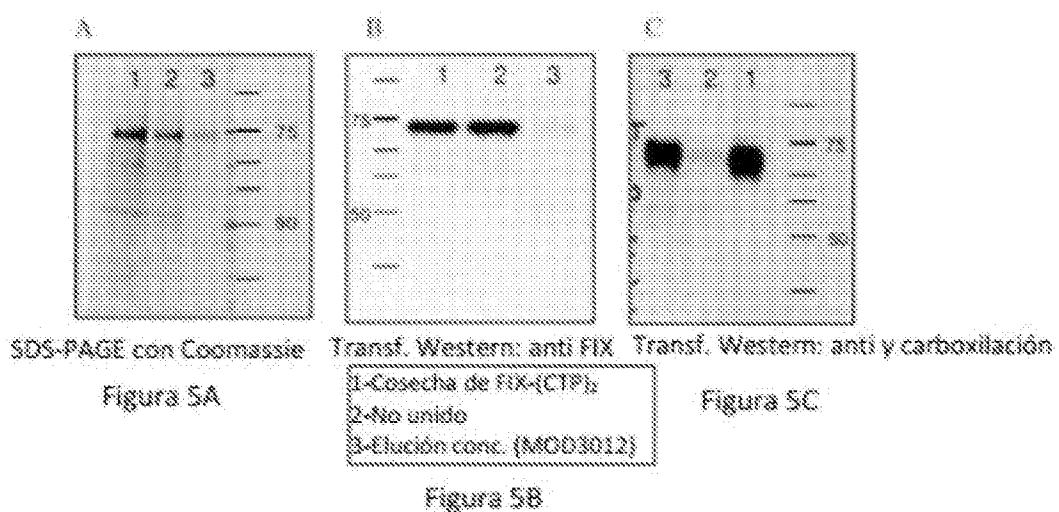


Figura 4



Actividad cromogénica del Factor IX

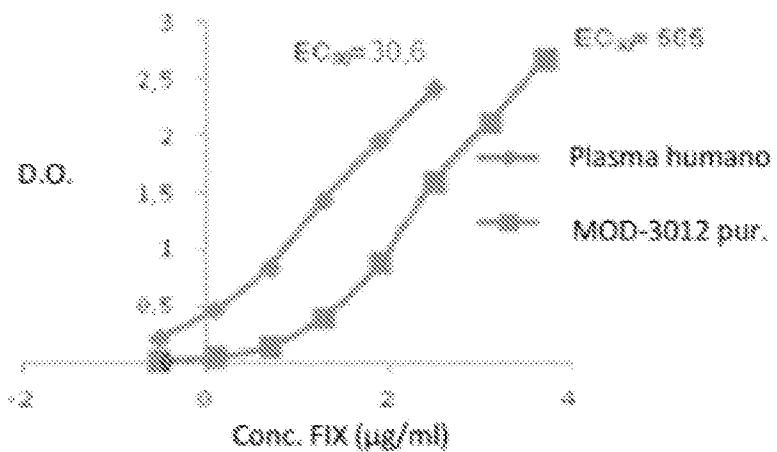


Figura 6

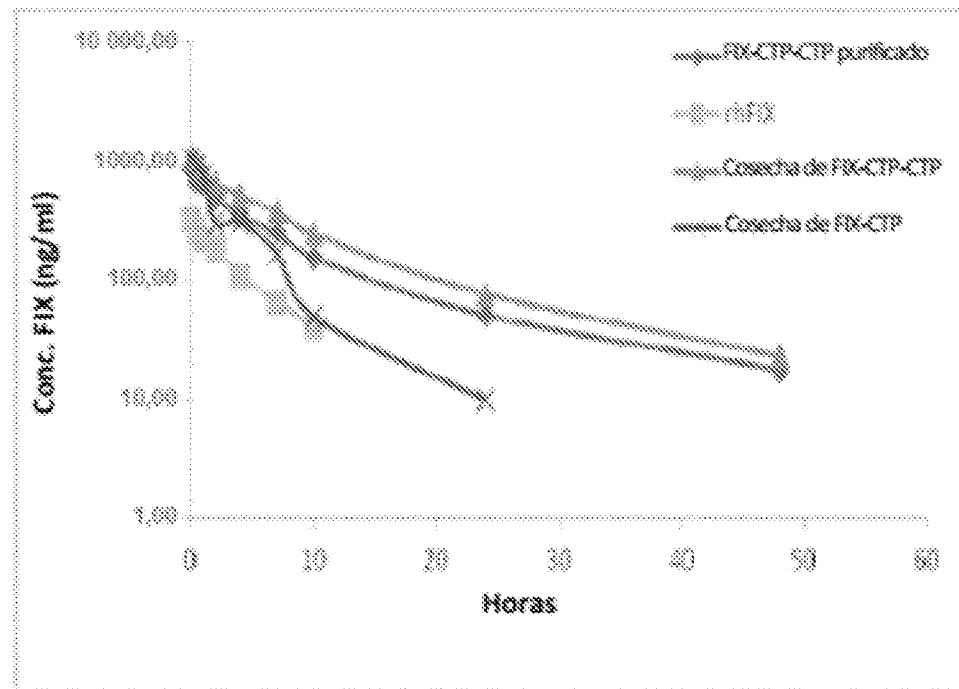


Figura 7

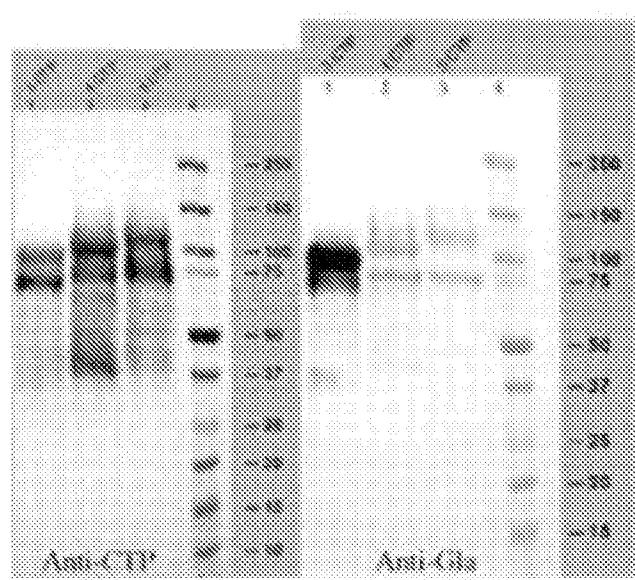


Figure 8a

Figura 88

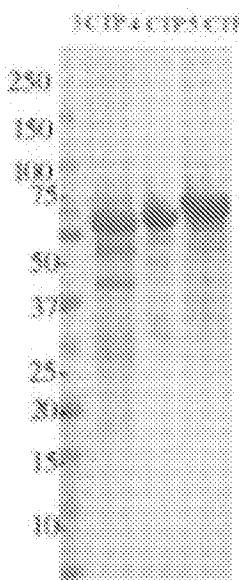


Figure 8

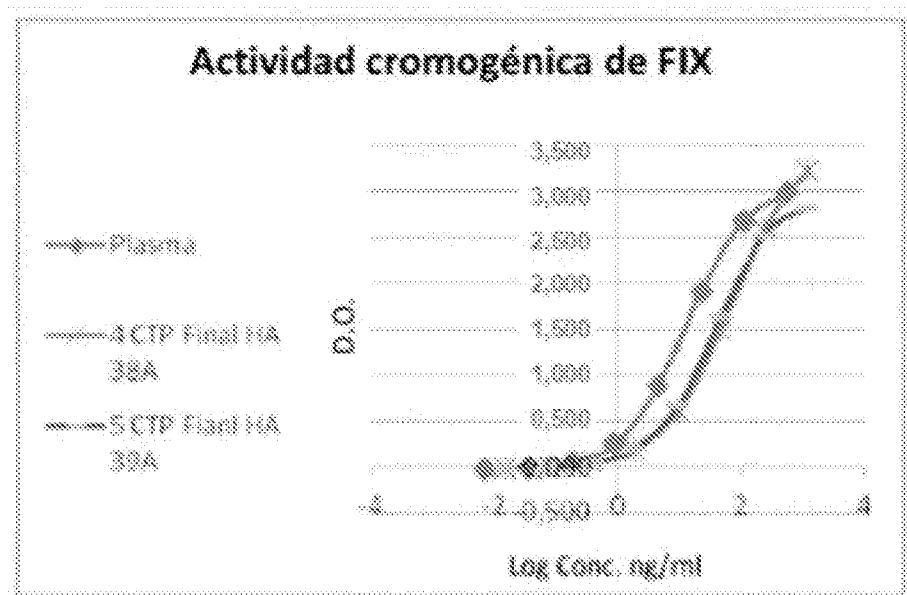


Figura 10

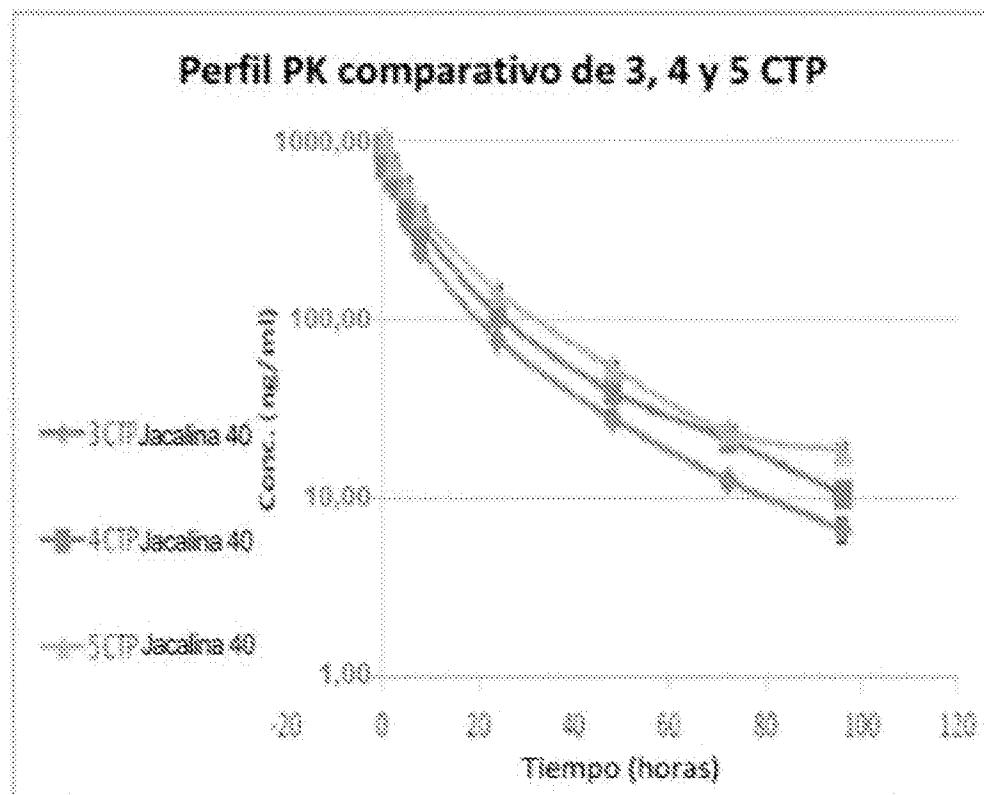


Figura 11

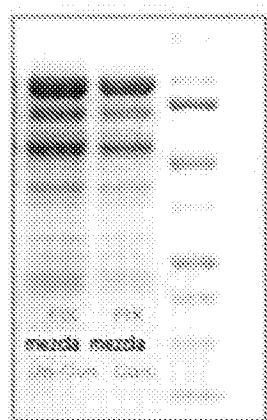


Figura 12A

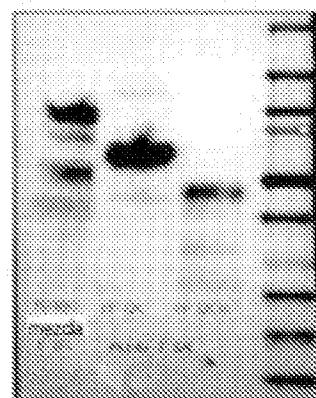


Figure 123



Figura 12C

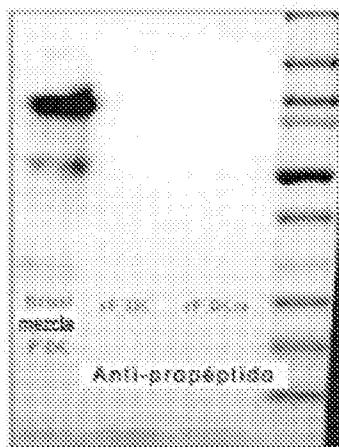


Figura 12D

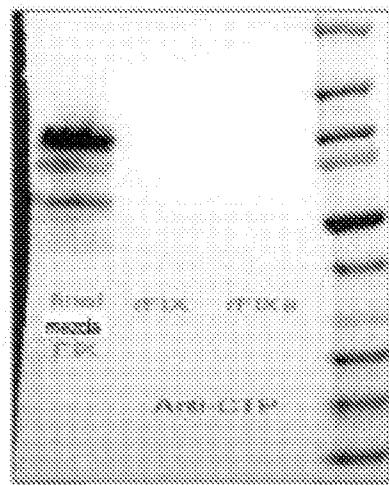


Figura 12E

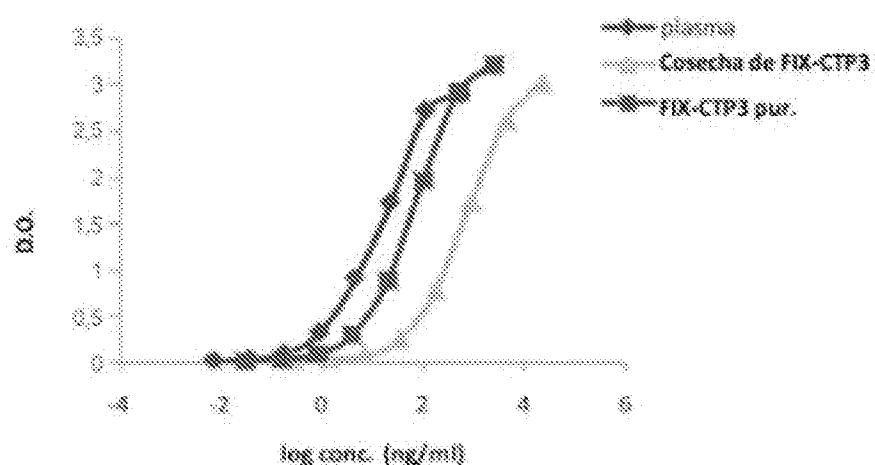


Figura 13

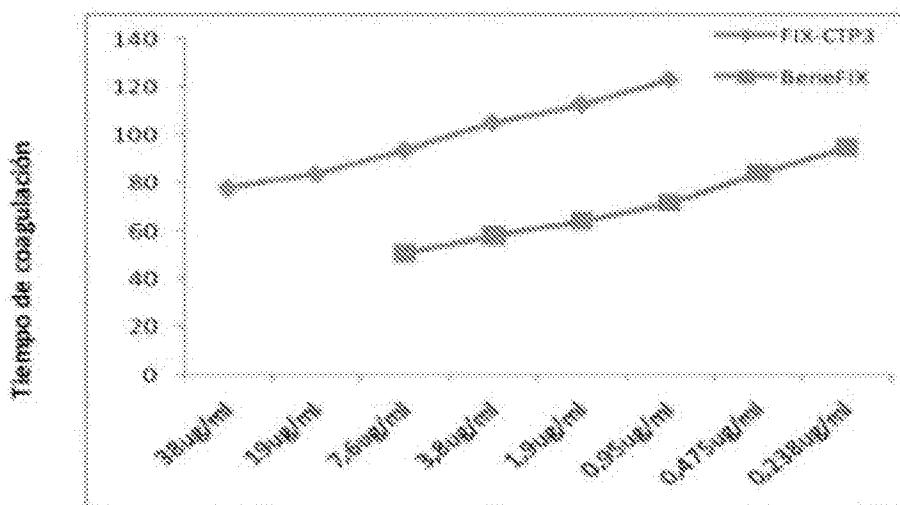


Figura 14

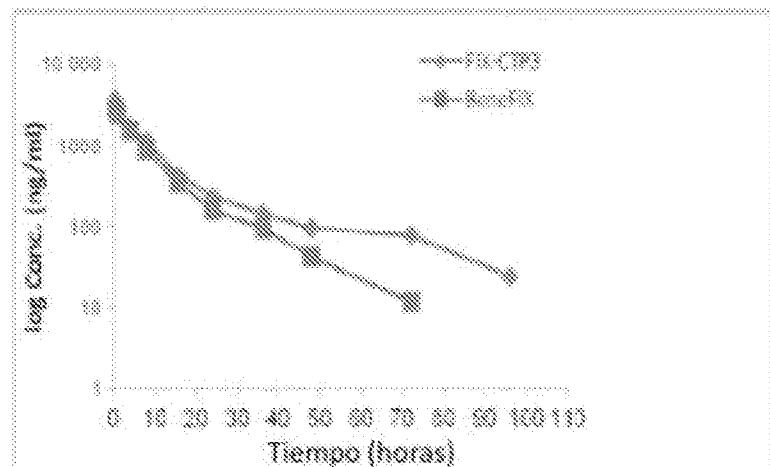


Figura 15

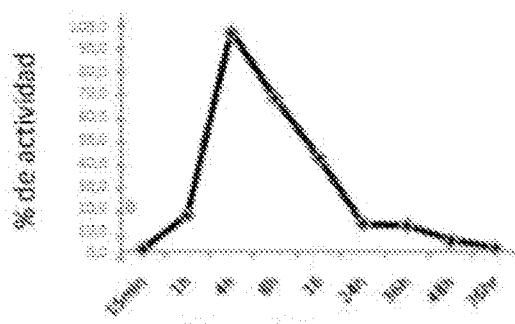


Figura 16A

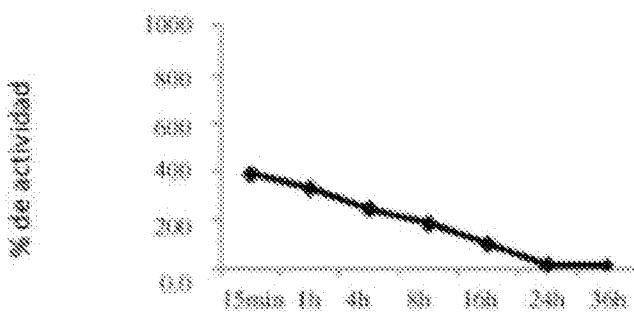


Figura 16B

**Primer reto de sangrado:
Valor de DO de hemoglobina**

	FIX-CTP ₁	Benefix	FIX-XD
#1	6,84	10,26	13,92
#2	6,72	10,14	13,32
#3	4,58	11,16	16,38
#4	8,8	9,18	7,82
#5	7,86	7,77	9,72
#6	4,34	9,15	14,7

Figura 17A

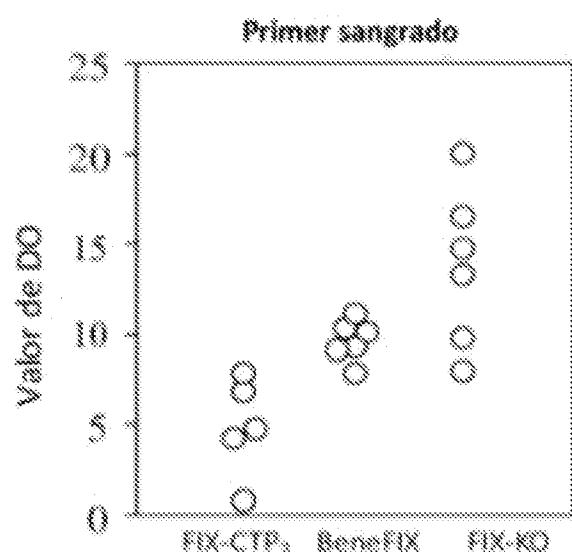


Figura 17B

Tiempo del primer sangrado (min)

	cohorte # 1	cohorte # 3	FIXKO
#1	10	10	10
#2	8,12	10	8,17
#3	10	10	10
#4		10	10
#5	10	7	10
#6	10	10	10

Figura 17C

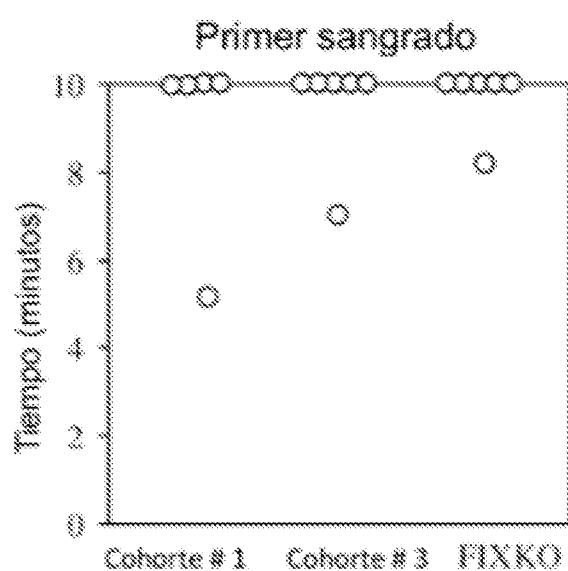


Figura 17D

Segundo sangrado: valor de DC

	RX-CTP ₂	BenefIX	FIXKO
#1	0,324	1,368	1,32
#2	0,358	0,516	0,43
#3	0,066	0,548	0,6
#4			1,26
#5	0,064	0,158	0,46
#6	0,045	0,992	0,384

Figura 18A

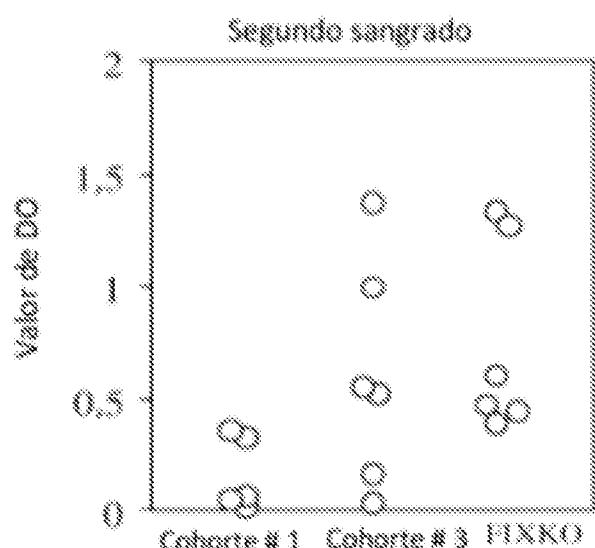


Figura 18B

Tiempo del segundo sangrado (min)

	Cohorte # 1	Cohorte # 3	FIXKO
#1	4.63	10	10
#2	2.8	10	8.3
#3	1.2	10	7.13
#4		5	10
#5	3.87	7.4	10
#6	1.83	10	6.5

Figura 18C

Segundo sangrado

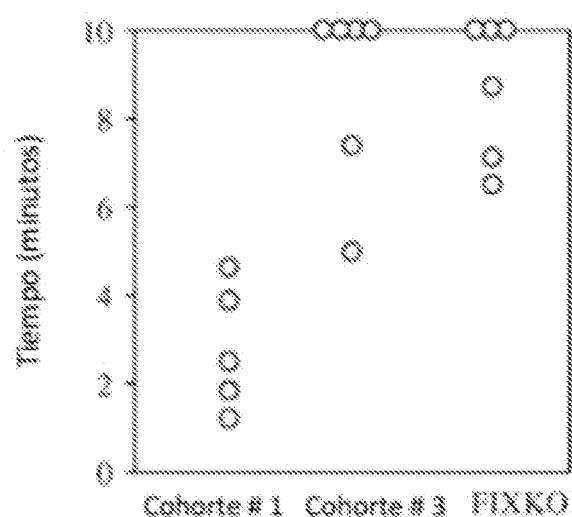


Figura 18D

Figura 19A

FVII-CTP
FVII-CTP-CTP

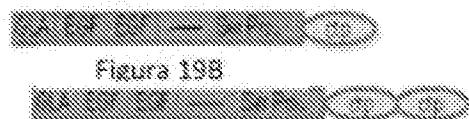


Figura 19C

FIX-CTP
FIX-CTP-CTP

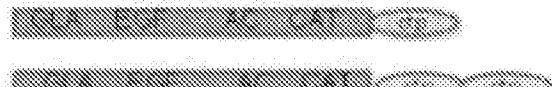


Figura 19D

Nivel del antígeno rFVII

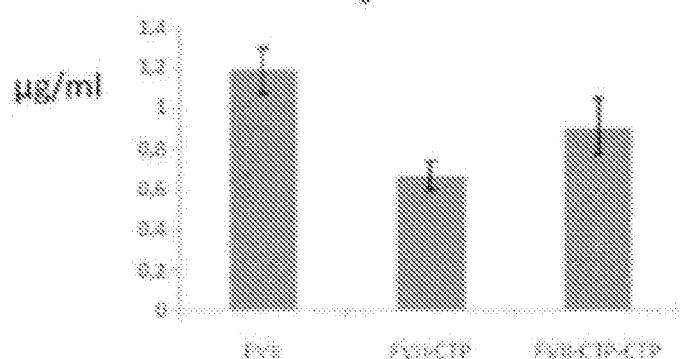


Figura 20A

Actividad cromogénica de rFVII

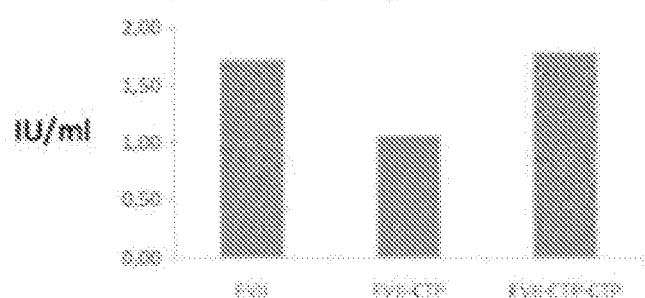


Figura 20B



Figura 20C

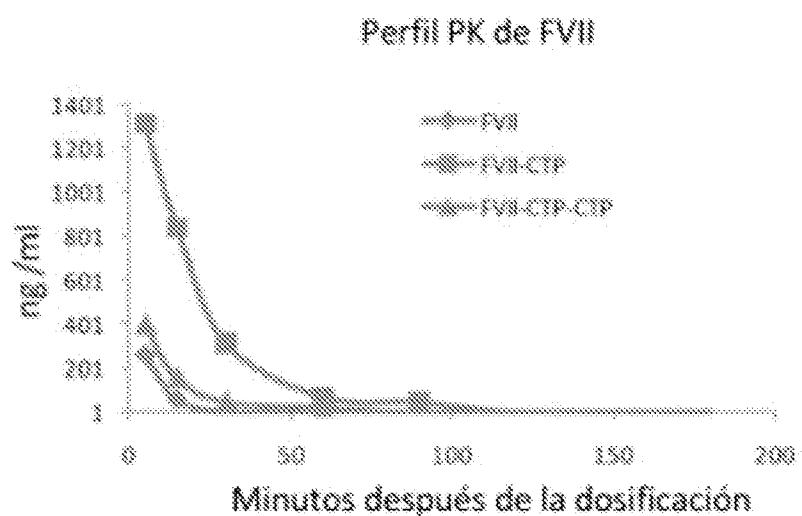


Figura 20D

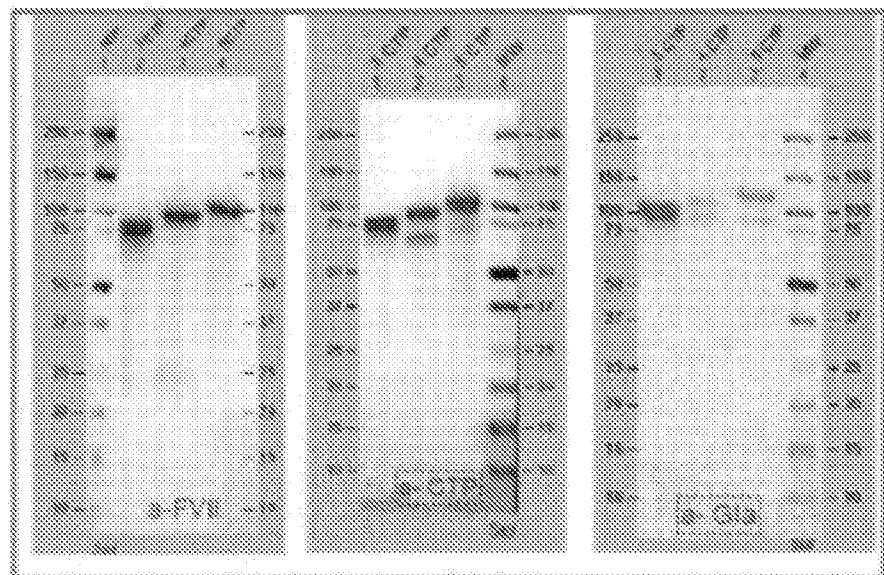


Figura 21A

Figure 218

Figura 21C

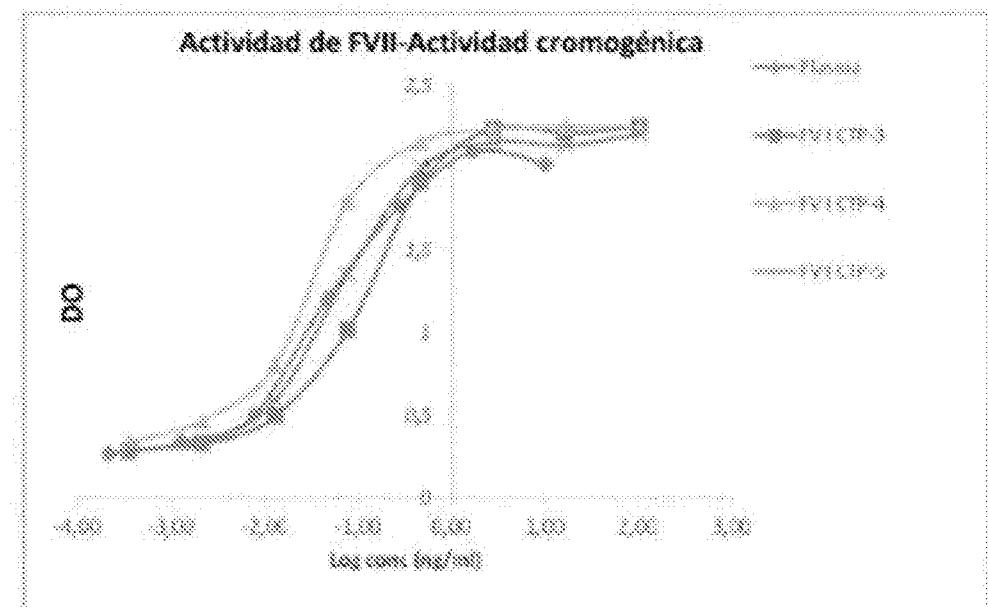


Figura 22

Perfil PK comparativo - primer estudio - FVII-CTP 3, 4 y 5 CTP

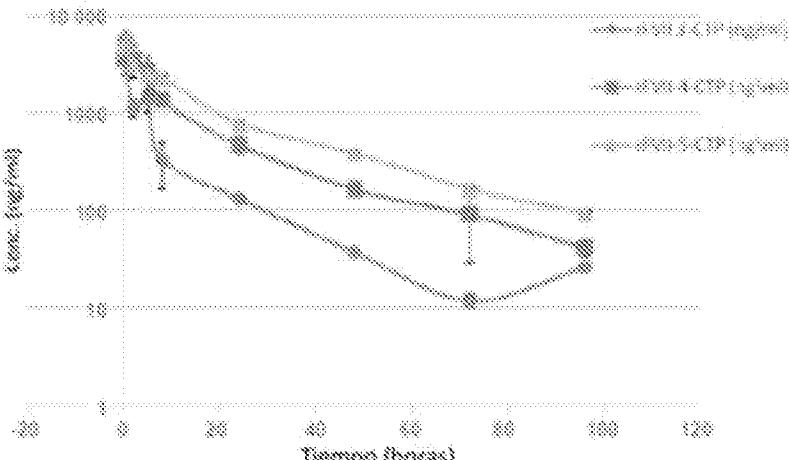


Figura 23

Perfil PK comparativo - segundo estudio - FVII-CTP 3, 4 y 5

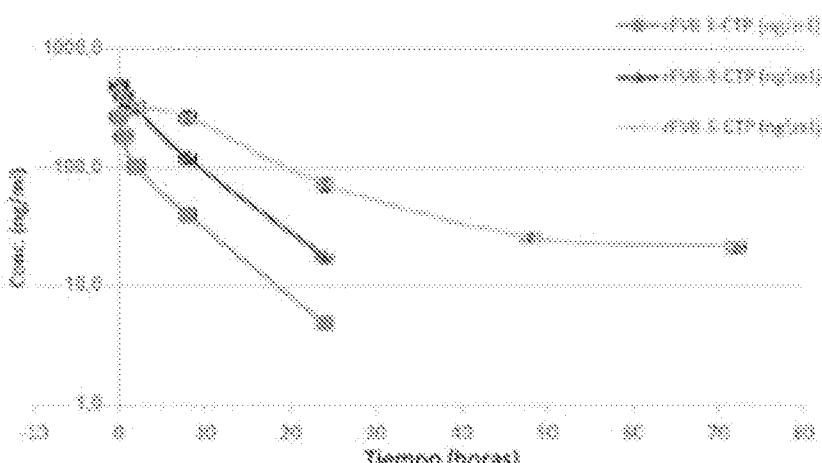


Figura 24

Figura 25A

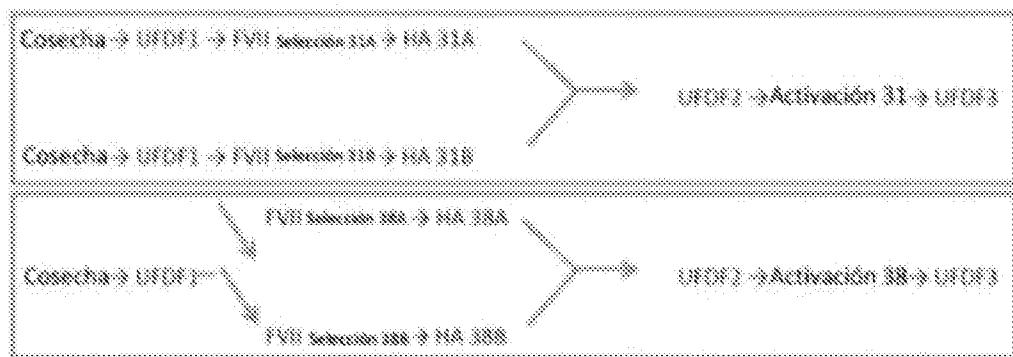


Figura 25B

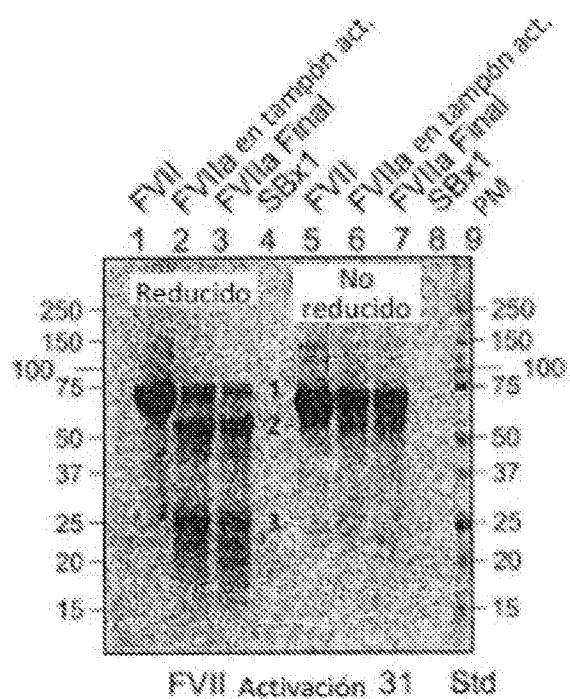


Figura 26A

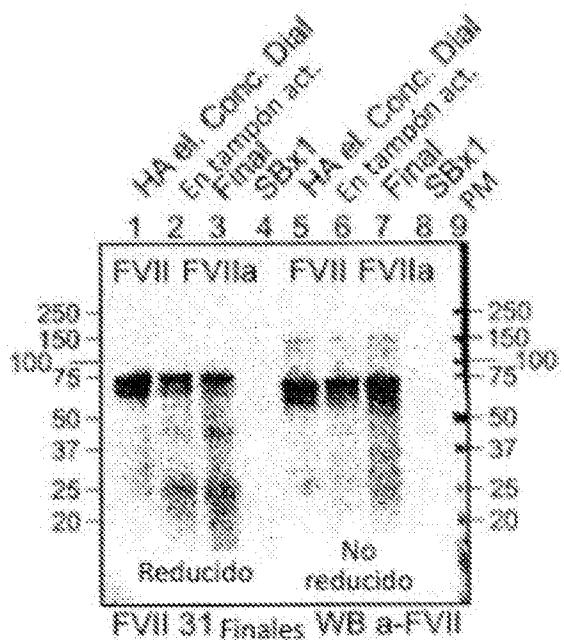
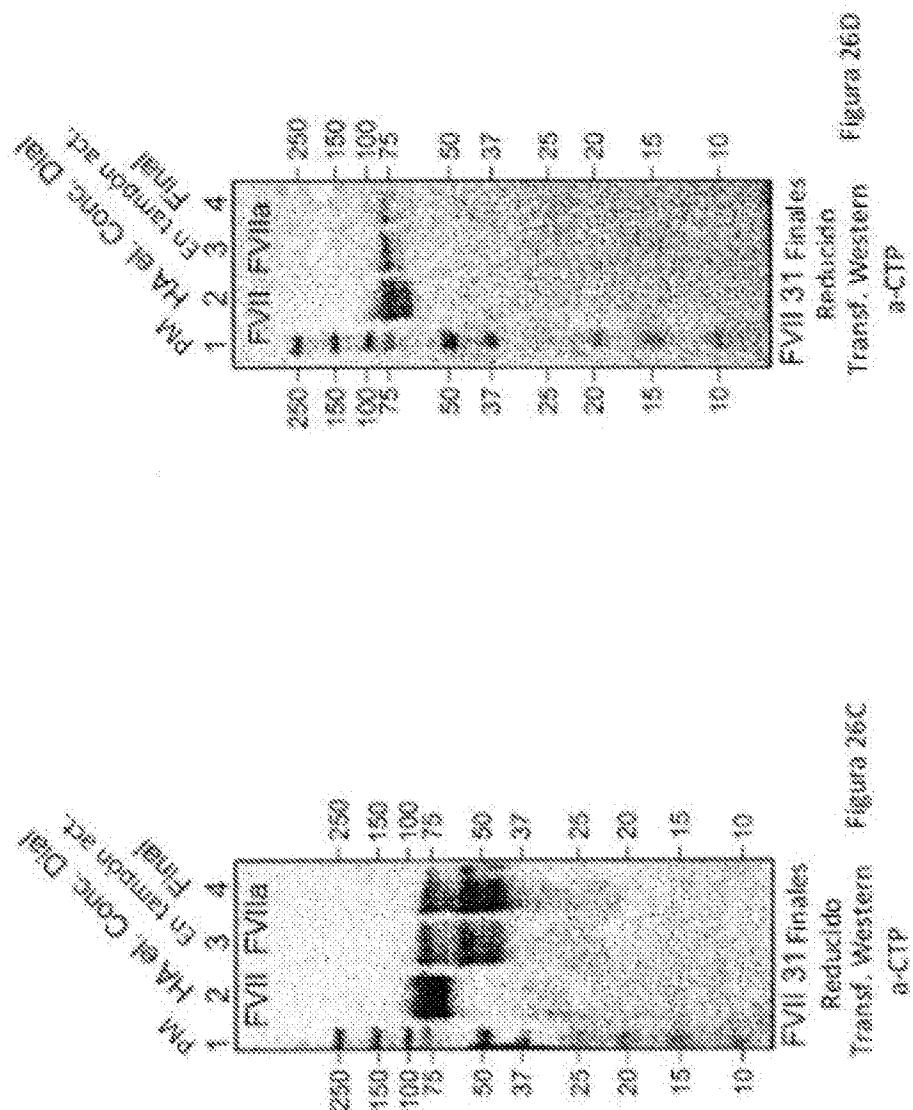


Figura 26B



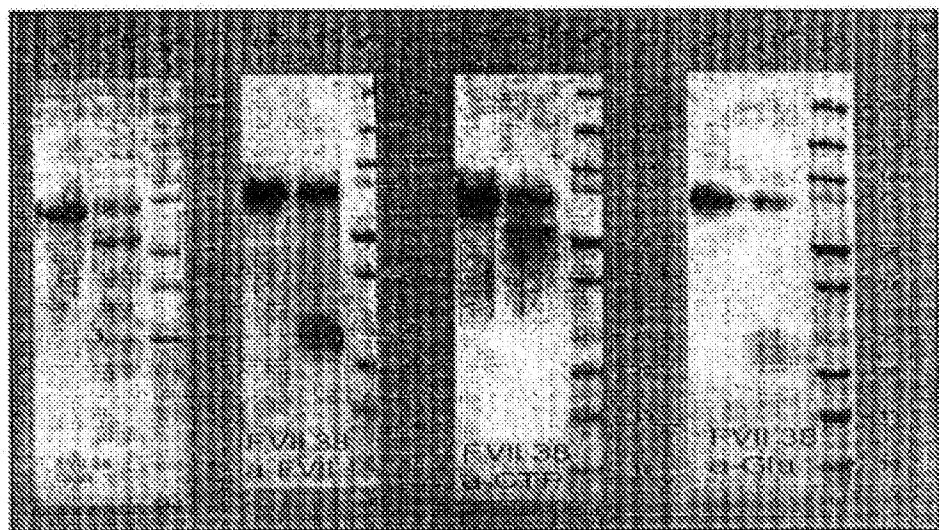


Figura 26E

Figura 26F

Figura 26G

Figura 26H

Figura 27

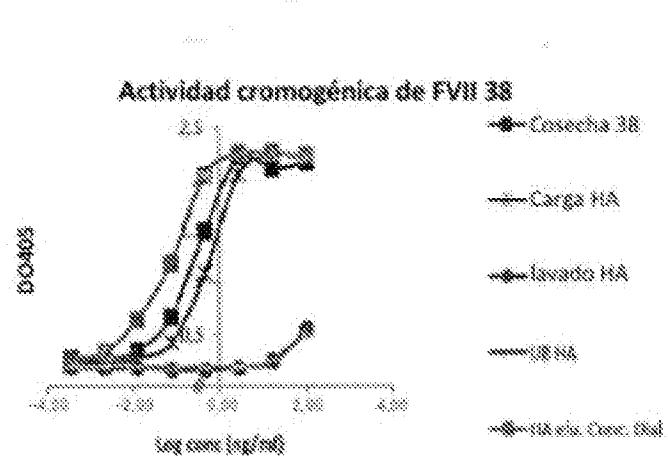


Figura 28

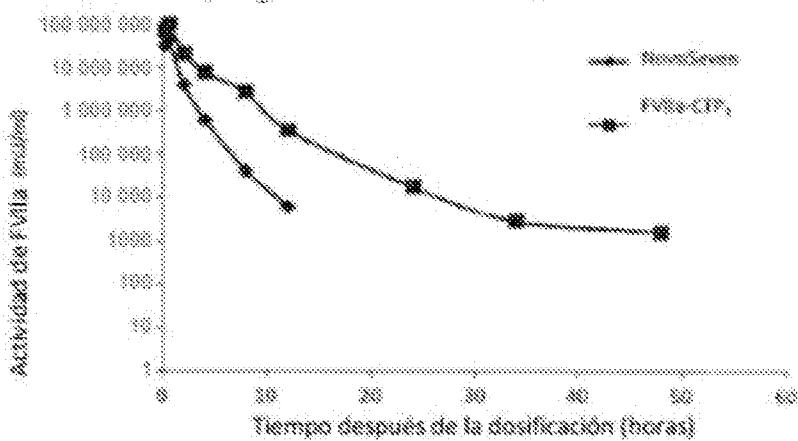


Figura 29A

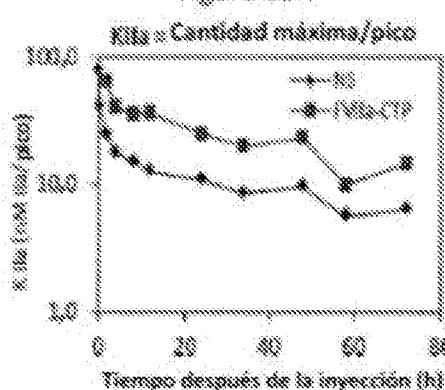


Figura 29B

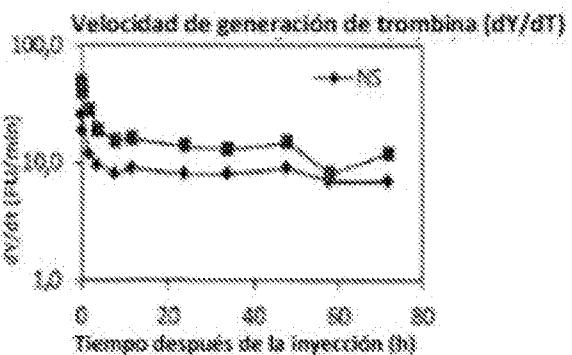
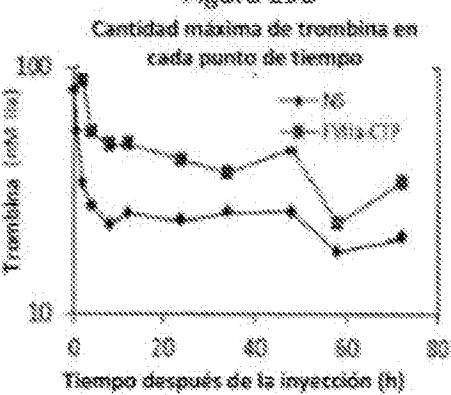


Figura 29C

Figura 30A

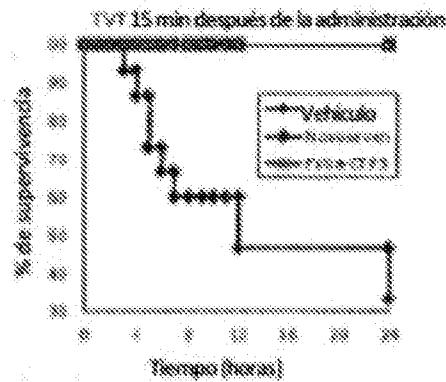


Figura 30B

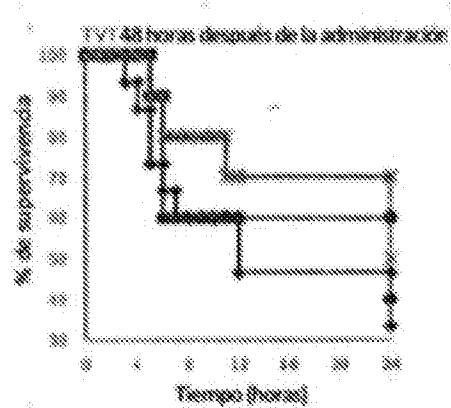
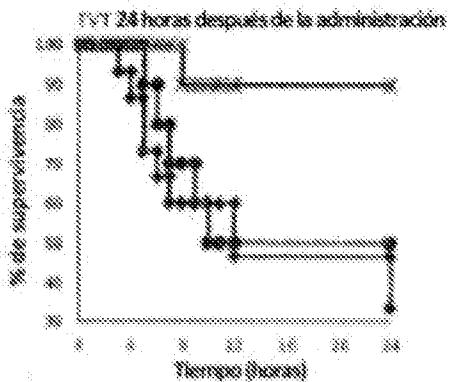


Figura 30C

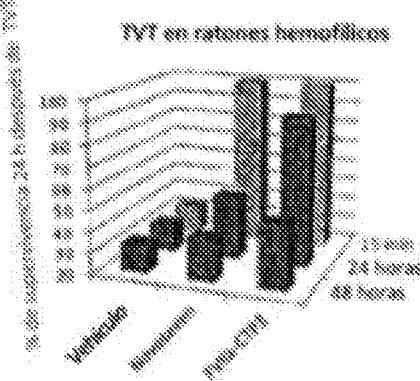


Figura 30D

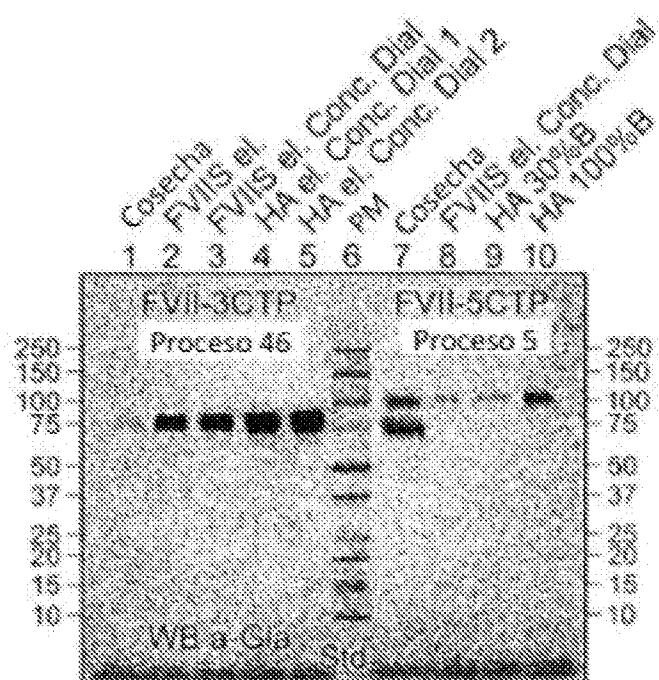


Figura 31A

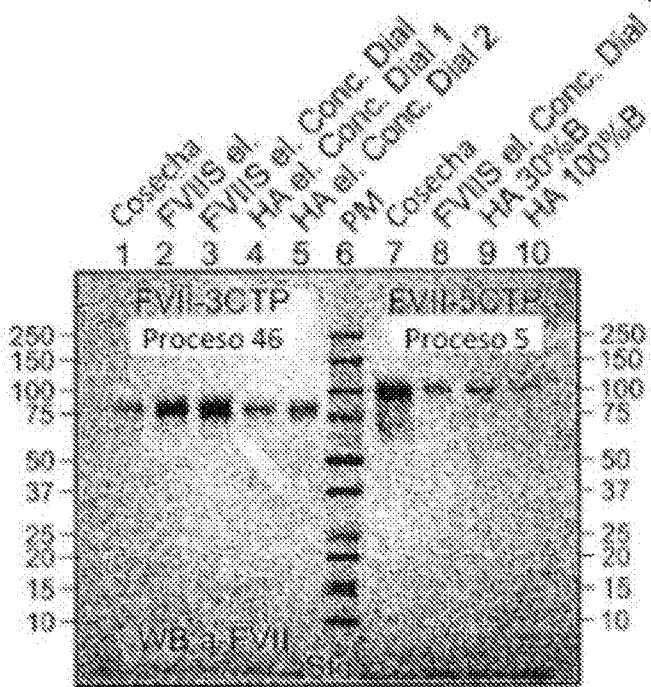


Figura 31B

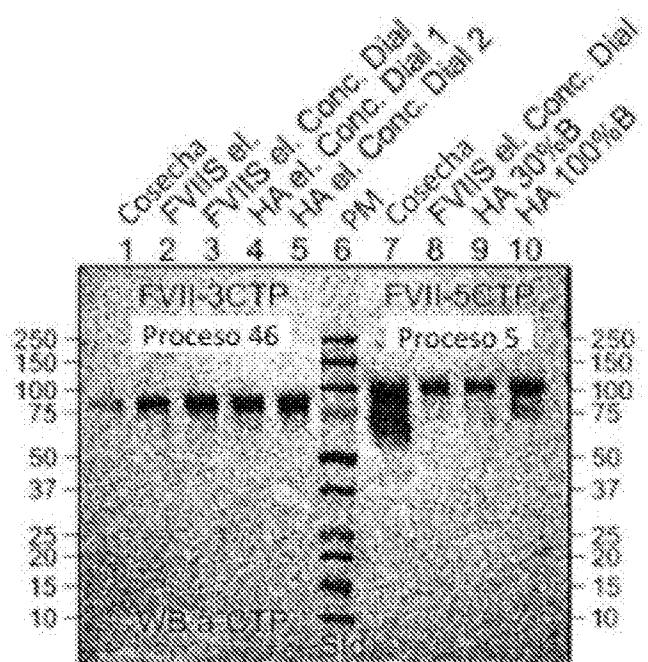


Figura 31C

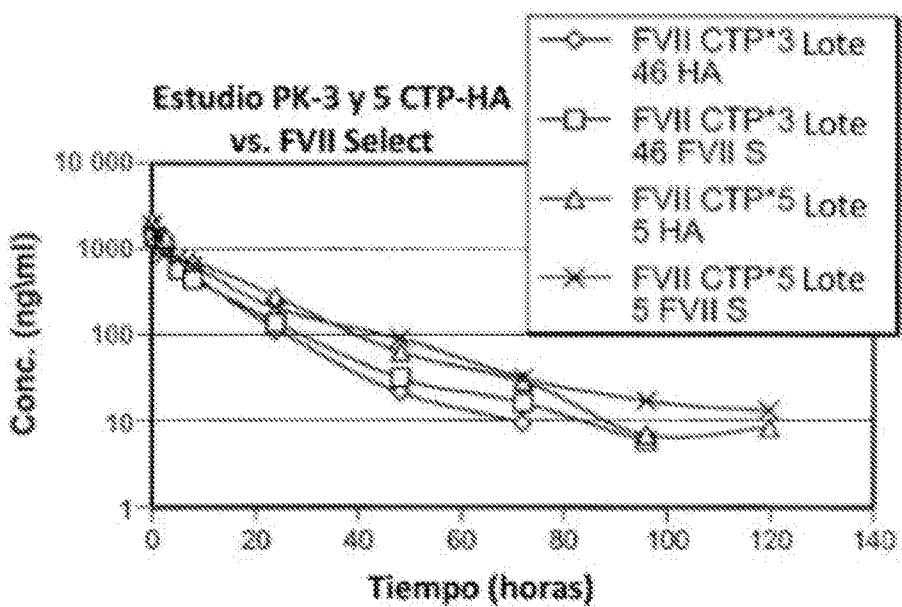


Figura 32

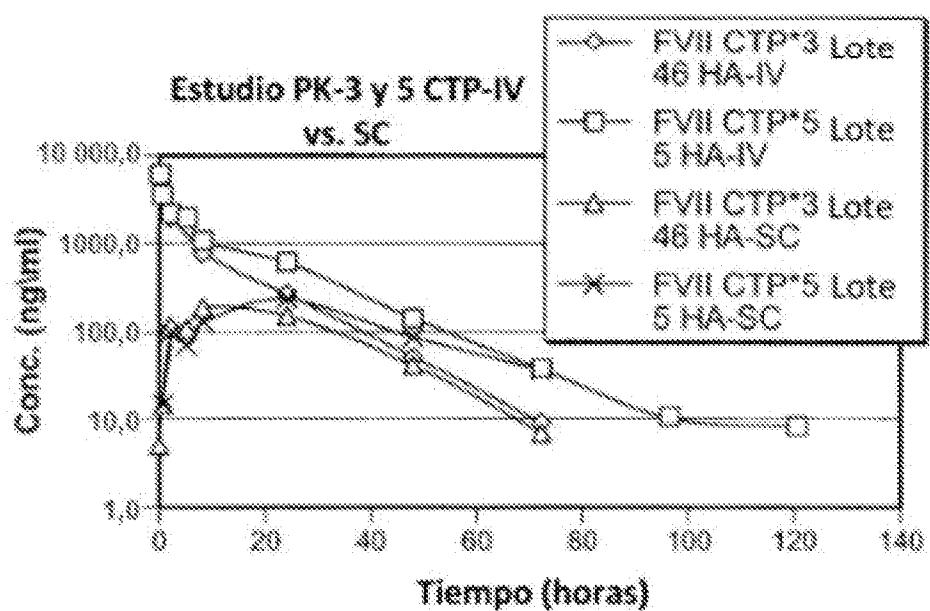


Figura 33

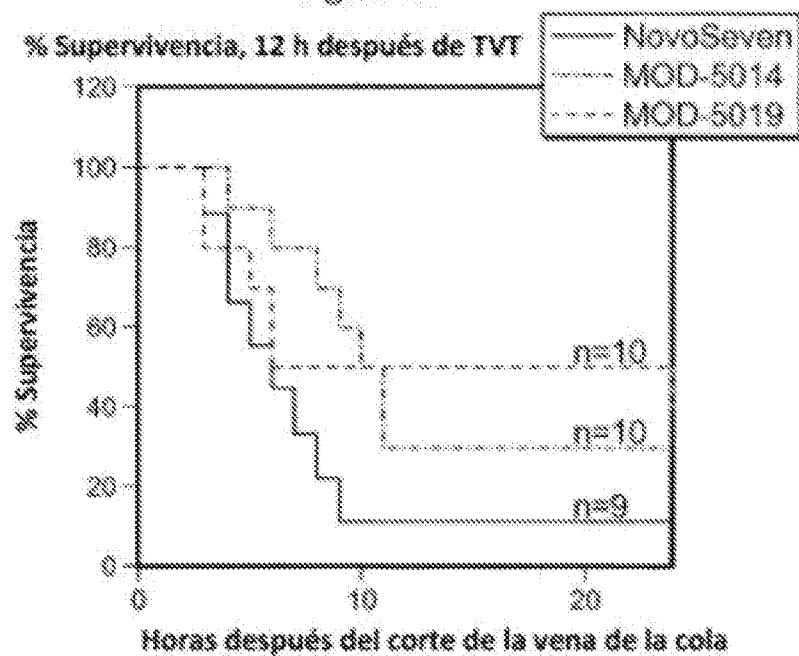


Figura 34

Figura 35A

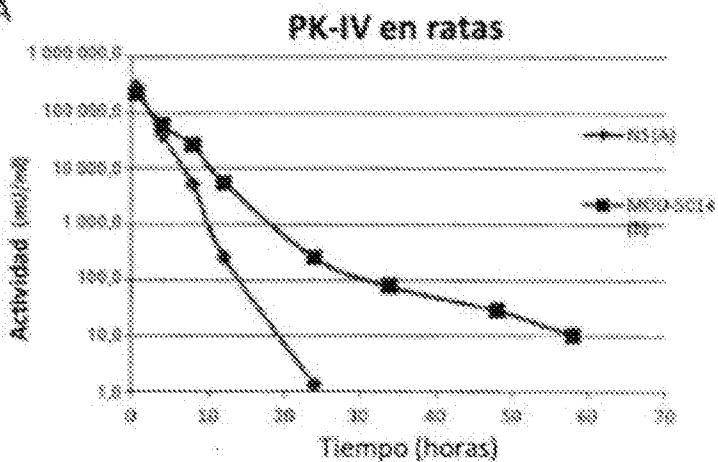
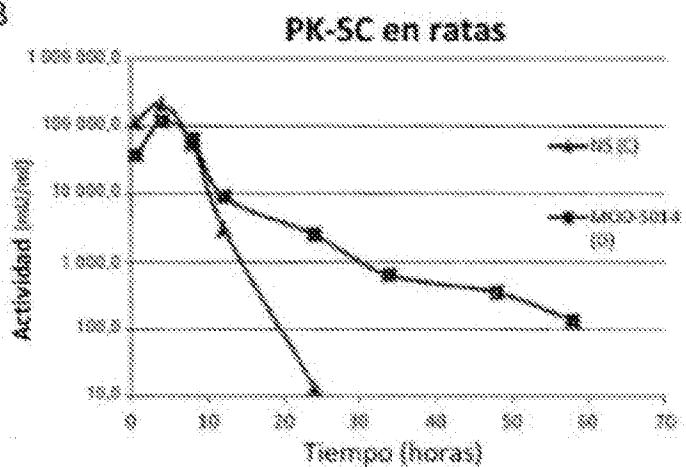


Figura 35B



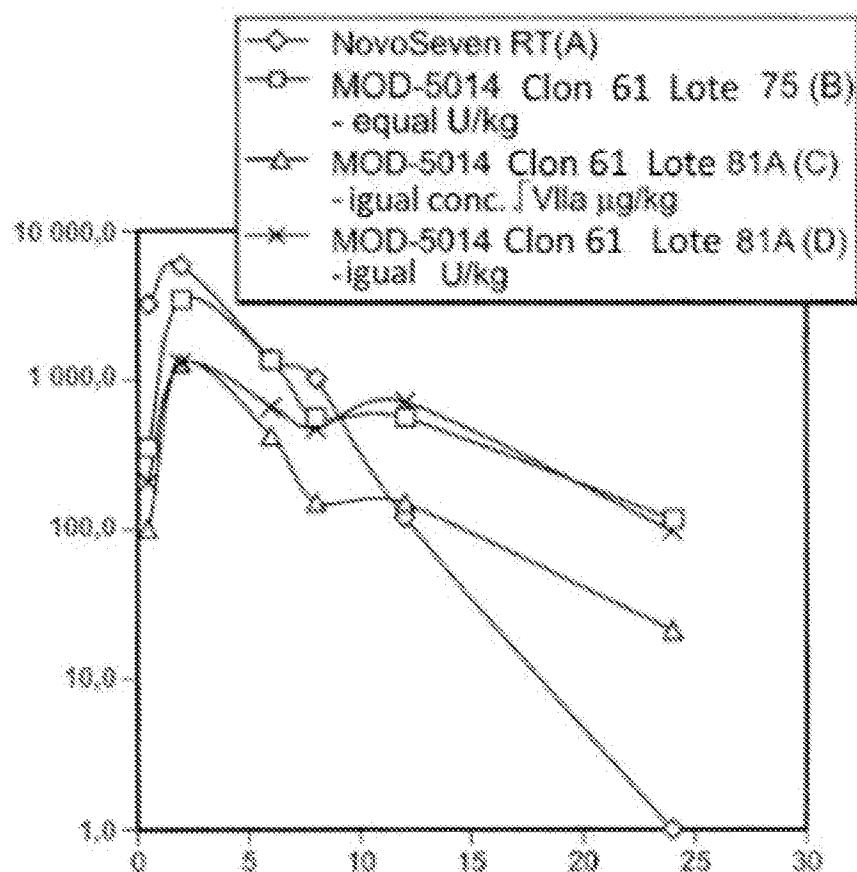


Figura 36