(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 963 725**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/59 (2006.01)

C07K 14/61 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2017 PCT/IL2017/050784**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2018 WO18011799**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2017 E 17754492 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 3481855**

(54) Título: **Factor VII de coagulación de acción prolongada y métodos para producir el mismo**

(30) Prioridad:

11.07.2016 US 201662360767 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2024

(73) Titular/es:

OPKO BIOLOGICS LTD. (100.0%)
16 Ashlegan Street
Kiryat Gat, 8211804, IL

(72) Inventor/es:

HERSHKOVITZ, OREN y
MOSCHCOVICH, LAURA

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

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

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

Factor VII de coagulación de acción prolongada y métodos para producir el mismo

Campo de la divulgación

Se describen polipéptidos que comprenden tres péptidos carboxi-terminales (CTP) de gonadotropina coriónica fijados al extremo carboxi de un factor de coagulación y polinucleótidos que codifican el mismo. También se describen composiciones farmacéuticas y formulaciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos y métodos de producir los mismos.

Antecedentes

El desarrollo de la terapia de reemplazo del factor de coagulación ha transformado la vida de muchas personas con hemofilia. La hemofilia es un grupo de trastornos genéticos hereditarios que afectan a la capacidad del cuerpo de controlar la coagulación de la sangre o coagulación. Los pacientes con hemofilia no producen cantidades adecuadas de proteínas del Factor VIII o Factor IX, que son necesarias para una coagulación de la sangre eficaz. En hemofílicos severos, incluso una lesión menor puede ocasionar una pérdida de sangre que continúa durante días o semanas, y es posible que no se produzca una curación completa, lo que conduce a la posibilidad de un daño permanente y debilitante de las articulaciones y otros órganos, y a la muerte prematura.

La hemofilia es un trastorno hemorrágico ligado al cromosoma X hereditario causado por defectos o la ausencia de factores críticos en la cascada de la coagulación. En los pacientes con hemofilia, la generación de trombina y la formación de coágulos de fibrina se ven gravemente comprometidos, lo que conduce a episodios de sangrado espontáneo, más comúnmente en las articulaciones y órganos internos, y a un sangrado excesivo durante y después de una cirugía o trauma. El sangrado frecuente también puede causar inflamación articular, daño articular, deformidad grave, infecciones frecuentes y movilidad reducida en pacientes con hemofilia (Mayo Clinic). La hemofilia A es causada por defectos o falta de expresión del Factor VIII, mientras que la hemofilia B es causada por defectos o falta de expresión del Factor IX.

La hemofilia B da como resultado una deficiencia de la actividad procoagulante de FIX. Pacientes con hemofilia B tienen hemorragias espontáneas de tejidos blandos y hemartrosis recurrentes que a menudo conducen a una artropatía paralizante. El tratamiento actual para estos pacientes incluye una administración intravenosa de FIX recombinante. Sin embargo, los problemas de costos y la eliminación relativamente rápida de FIX de la circulación hacen que desarrollar un FIX de acción prolongada sea una tarea desafiante. La disponibilidad comercial de FVIII y FIX ha conducido a un mejor control de los episodios de hemorragias que amenazan la vida. Muchos pacientes reciben terapia profiláctica, lo que reduce el riesgo de hemorragia y sus complicaciones asociadas. Sin embargo, una proporción significativa de pacientes (10-30%) desarrolla anticuerpos inhibidores contra FVIII y FIX administrados de forma exógena. La administración de FVIIa, que es un producto de derivación, puede inducir la homeostasis y puede proporcionar un tratamiento eficaz para los pacientes con Abs (anticuerpos) inhibidores.

FVIIa recombinante (NovoSeven®) está disponible comercialmente y fue aprobado en 1996 para el tratamiento de episodios de sangrado en pacientes con hemofilia con inhibidores. Sin embargo, rFVIIa se elimina rápidamente con una semivida 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 una homeostasis adecuada después de una hemorragia de leve a moderada. En consecuencia, hay mucho interés en desarrollar una forma de FVIIa de acción prolongada que prolongue la duración de la actividad hemostática después de una dosis única y permita una dosificación mucho menos frecuente. Una FVIIa de acción prolongada también aumentaría la viabilidad de la terapia profiláctica a largo plazo.

Se están desarrollando varias tecnologías para prolongar la semivida de FVIIa. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de lograr una semivida prolongada de esta proteína, al tiempo que se conserve su actividad biológica y se asegure que las modificaciones no induzcan una inmunogenicidad significativa. La presente invención aborda esta necesidad uniendo péptidos carboxi terminales (CTPs) de gonadotropina a FVIIa, modificando así su semivida y su actividad biológica.

Sumario de la divulgación

La presente invención proporciona un polipéptido del factor VII activo (FVIIa) humano modificado por un péptido carboxi-terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana que comprende tres moléculas de CTP unidas en tándem al extremo C-terminal de FVIIa, en donde el polipéptido del FVIIa modificado por CTP está en una forma sustancialmente pura y activa, comprendiendo el polipéptido de FVIIa modificado por CTP: (a) un alto contenido de ácido siálico de al menos 15 mol/mol; (b) una forma de alta glicosilación que comprende un contenido de O-glicano de al menos 10 mol/mol; (c) una forma poco oxidada del FVIIa modificado por CTP que consiste en menos de 5% de forma oxidada; (d) un alto porcentaje de residuos de ácido glutámico carboxilado que consisten en al menos un 90% en residuos de Gla; (e) un alto porcentaje de N-glicanos cargados que

consiste en al menos un 60% de N-glicanos cargados; y (f) una potencia de al menos 10500 U/mg, y en donde la secuencia de aminoácidos del FVIIa modificado por CTP fabricado se recoge en la SEQ ID NO: 7.

En una realización, la secuencia de aminoácidos del FVIIa modificado por CTP está estructuralmente presente como un heterodímero de dos cadenas enlazado con disulfuro que comprende un puente disulfuro (S-S) entre el residuo de cisteína 135 y el residuo de cisteína 262 de la SEQ ID NO: 7, y en donde las dos cadenas comprenden una cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-152 y una cadena pesada que comprende los aminoácidos 153-490 de SEQ ID NO: 7.

En una realización, el porcentaje de N-glicanos cargados en el FVIIa modificado por CTP es 85.3% o 84.2%.

En una realización, la potencia del polipéptido del FVIIa modificado por CTP es 15563 U/mg, 16720 U/mg, 22478 U/mg o 23608 U/mg.

En una realización, el FVIIa modificado por CTP sustancialmente puro y activo comprende al menos el 60% de una forma de alta glicosilación de residuos de ácido glutámico carboxilado (Gla) del FVIIa activo modificado por CTP.

En una realización, la pureza del polipéptido FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos 90% o es 97.3%, 97.6%, 97.4% o 97.0%.

La presente invención también proporciona un método para fabricar un polipéptido de factor VII (FVIIa) activo humano modificado por un péptido carboxi-terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana, en donde el polipéptido comprende tres moléculas de CTP unidas en tándem al extremo C-terminal de FVII, comprendiendo el método las etapas de: transfectar de forma estable un número predeterminado de células con un vector de expresión que comprende una porción codificante que codifica el FVII modificado por CTP, en donde las células transfectadas expresan y secretan el FVII modificado por CTP; obtener clones celulares que sobre-expresan el FVII modificado por CTP; expandir los clones en solución a una escala predeterminada; recolectar la solución que contiene los clones; filtrar la solución que contiene los clones para obtener una solución de recolección clarificada que contiene el FVII modificado por CTP; y purificar y activar el FVII modificado por CTP a partir de la solución de recolección clarificada para obtener una solución de proteína purificada que tiene una concentración deseada del FVIIa modificado por CTP; en donde el FVIIa modificado por CTP fabricado comprende lo siguiente: (a) una forma poco oxidada del FVIIa modificado por CTP que consiste en menos del 5% de forma oxidada; (b) un alto porcentaje de residuos de ácido glutámico carboxilado que consisten en al menos un 90% de residuos de Gla; (c) un alto porcentaje de N-glicanos cargados que consisten en al menos un 60% de N-glicanos cargados; y (d) una potencia de al menos 10500 U/mg; y en donde la secuencia de aminoácidos del FVIIa modificado por CTP fabricado se recoge en la SEQ ID NO: 7.

En una realización, la pureza del polipéptido FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos 90% o es 97.3%, 97.6%, 97.4% o 97.0%.

En una realización, (a) la etapa de expansión comprende expandir clones obtenidos de un banco de células de trabajo (WCB) que expresa y secreta de manera óptima el FVII modificado por CTP o en donde la etapa de expansión comprende expandir clones obtenidos de un banco de células maestras (MCB) que expresan y secretan de manera óptima el FVII modificado por CTP; (b) el método de fabricación es un proceso sin animales; (c) los clones expresan y secretan FVII modificado por CTP a un nivel de al menos 40 mg/L; (d) los clones se expanden en solución a través de una serie de etapas de subcultivo hasta el nivel de biorreactor de producción; (e) el aclaramiento viral muestra un factor de reducción logarítmico viral (LRF) de aproximadamente 22; o cualquier combinación de los mismos.

En una realización, el biorreactor comprende un biorreactor desechable o un biorreactor de acero inoxidable o en donde el biorreactor se hace funcionar como un biorreactor en modo discontinuo alimentado.

En una realización, la purificación de la recolección clarificada comprende realizar las siguientes etapas: hacer pasar secuencialmente la solución de recolección clarificada a través de una columna de afinidad, una columna multimodal o de modo mixto, una columna de interacción hidrófoba y una columna de intercambio aniónico, en donde el material eluido de intercambio aniónico se somete a una etapa de ultrafiltración/diafiltración; inactivar los virus presentes en la recolección clarificada o en el material eluido recolectado después de cualquiera de las columnas de cromatografía, o cualquier combinación de las mismas, en donde inactivar virus comprende incubar en una solución tóxica a los virus o nanofiltración, o cualquier combinación de los mismos; llegando así a un FVII modificado por CTP purificado.

En una realización, el patrón de glicosilación del FVIIa modificado por CTP fabricado comprende glicosilación de al menos 4 sitios de glicosilación enlazados a O por CTP.

En una realización, (a) el FVIIa modificado por CTP comprende un alto contenido de ácido siálico que consiste

en al menos 15 mol/mol; (b) el alto contenido de O-glicano comprende un contenido de O-glicano que consiste en al menos 10 mol/mol; (c) el bajo porcentaje de la forma oxidada del FVIIa modificado por CTP consiste en menos del 5% de forma oxidada; (d) el alto porcentaje de residuos de ácido glutámico carboxilado (Gla) del FVIIa modificado por CTP consiste en al menos 90% de Gla; (e) el porcentaje de N-glicanos cargados es 85.3% o 84.2%; (f) la potencia es 15563 U/mg, 16720 U/mg, 22478 U/mg o 23608 U/mg; (g) el método logra al menos una tasa de recuperación del 20% de un FVIIa modificado por CTP altamente glicosilado; y (h) la tasa de recuperación del polipéptido FVIIa modificado por CTP es al menos 90% o es 97.3%, 97.6%, 97.4% o 97.0%.

En una realización, la secuencia de aminoácidos del FVIIa modificado por CTP fabricado está estructuralmente presente como un heterodímero de dos cadenas enlazadas por disulfuro que comprende un puente disulfuro (S-S) entre el residuo cisteína 135 y el residuo cisteína 262 de SEQ ID NO: 7, y en donde las dos cadenas comprenden una cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-152 y una cadena pesada que comprende los aminoácidos 153-490 de la SEQ ID NO: 7.

La invención también proporciona una composición que comprende el FVIIa modificado por CTP y un soporte farmacéuticamente aceptable.

Otras características y ventajas resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, ejemplos y figuras.

Breve descripción de los dibujos

El archivo de patente o solicitud original contiene al menos un dibujo ejecutado en color.

Figura 1. Muestra el mapa del plásmido pCI-dhfr-MOD-5014.

Figura 2A. Muestra un diagrama esquemático del proceso de purificación de FVII-CTP$_3$. El Lote 31 se produjo para el estudio PK/PD.

Figura 2B. Muestra un diagrama esquemático del proceso de purificación de FVII-CTP$_3$. El Lote 38 se produjo para el estudio de supervivencia.

Figura 3A. Muestra una SDS-PAGE y transferencia Western de FVII y FVIIa finales. Se cargaron 10 µg (Lote 31) o 5 µg (Lote 38) en cada pista de SDS-PAGE teñida con Coomassie. 1. Polipéptido de FVII-CTP$_3$; 2. Cadena pesada, incluyendo 3x CTP; 3. Cadena ligera. Los tres anticuerpos detectan FVII.

Figura 3B. Muestra una SDS-PAGE y transferencia Western de FVII y FVIIa finales. Se cargaron 10 µg (Lote 31) o 5 µg (Lote 38) en cada pista de SDS-PAGE teñida con Coomassie. 1. Polipéptido de FVII-CTP$_3$; 2. Cadena pesada, incluyendo 3x CTP; 3. Cadena ligera.

Figura 3C. Muestra una SDS-PAGE y transferencia Western de FVII y FVIIa finales. Se cargaron 10 µg (Lote 31) o 5 µg (Lote 38) en cada pista de SDS-PAGE teñida con Coomassie. 1. Polipéptido de FVII-CTP$_3$; 2. Cadena pesada, incluyendo 3x CTP; 3. Cadena ligera.

Figura 3D. Muestra una SDS-PAGE y transferencia Western de FVII y FVIIa finales. Se cargaron 10 µg (Lote 31) o 5 µg (Lote 38) en cada pista de SDS-PAGE teñida con Coomassie. 1. Polipéptido de FVII-CTP$_3$; 2. Cadena pesada, incluyendo 3x CTP; 3. Cadena ligera.

Figura 3E. Muestra una SDS-PAGE y transferencia Western de l FVII y FVIIa finales. Se cargaron 10 µg (Lote 31) o 5 µg (Lote 38) en cada pista de SDS-PAGE teñida con Coomassie. 1. Polipéptido de FVII-CTP$_3$; 2. Cadena pesada, incluyendo 3x CTP; 3. Cadena ligera.

Figura 3F. Muestra una SDS-PAGE y transferencia Western de FVII y FVIIa finales. Se cargó 1 µg de proteína en cada pista l de transferencia Western. 1. Polipéptido FVII-CTP$_3$; 2. Cadena pesada, incluyendo 3x CTP; 3. Cadena ligera. Los tres anticuerpos detectan FVII. Se detecta la cadena ligera de FVIIa con ambos α-FVII.

Figura 3G. Muestra una SDS-PAGE y transferencia Western de FVII y FVIIa finales. Se cargó 1 µg de proteína en cada pista de transferencia Western. 1. Polipéptido FVII-CTP$_3$; 2. Cadena pesada, incluyendo 3x CTP; 3. Cadena ligera. Los tres anticuerpos detectan FVII. La cadena pesada de FVIIa fue detectada por α-CTP.

Figura 3H. Muestra una SDS-PAGE y transferencia Western de FVII y FVIIa finales. Se cargó 1 µg de proteína en cada pista de transferencia Western . 1. Polipéptido FVII-CTP$_3$; 2. Cadena pesada, incluyendo 3x CTP; 3. Cadena ligera. Los tres anticuerpos detectan FVII. La cadena pesada de FVIIa fue detectada por α-Gla.

Figura 4. Muestra que la actividad cromogénica del FVII-CTP3 se potencia como resultado de la purificación en una columna de hidroxiapatito cerámico (HA). Se realizó una evaluación comparativa de la potencia *in vitro* de la

recolección de FVII-CTP$_3$, las fracciones en proceso y el FVII-CTP3 purificado en comparación con el plasma de la agrupación humana utilizando un kit de prueba de actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). La recolección de FVII-CTP3 y la proteína se diluyeron en serie y la potencia se evaluó comparando una curva de pérdida de respuesta con una preparación de referencia de plasma humano normal.

Figura 5. Muestra el perfil PK de FVIIa-CTP$_3$ en comparación con NovoSeven® en ratones deficientes en FVIII. El FVIIa-CTP$_3$ se produjo después de la selección del FVII, el proceso de purificación de HA y la activación. Se administró FVIIa-CTP$_3$ o NovoSeven® en una sola inyección intravenosa a ratones hemofílicos con FVIII -/-. Las muestras de sangre se extrajeron retro-orbitalmente a 0.083, 0.5 2, 8, 24, 48 y 72 horas después de la dosificación. Se preparó plasma citratado (0.38%) inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 °C hasta el análisis, y se estableció un perfil de PK basado en la actividad de coagulación del FVIIa utilizando un kit comercial STACLOT.

Figura 6A. Muestra que FVIIa-CTP$_3$ se produjo después de la selección de FVII, el proceso de purificación de HA y la activación. Se administró FVIIa-CTP$_3$ o NovoSeven® en una única inyección intravenosa a ratones hemofílicos con FVIII -/-. Las muestras de sangre se extrajeron retro-orbitalmente a 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 ºC hasta el análisis. Los parámetros de generación de trombina se evaluaron durante el experimento PK, y se evaluaron los parámetros que incluían la cantidad máxima hasta el pico.

Figura 6B. Muestra que FVIIa-CTP$_3$ se produjo después de la selección de FVII, el proceso de purificación de HA y la activación. Se administró FVIIa-CTP$_3$ o NovoSeven® en una sola inyección intravenosa a ratones hemofílicos con FVIII -/-. Las muestras de sangre se extrajeron retro-orbitalmente a 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 ºC hasta el análisis. Los parámetros de generación de trombina se evaluaron durante el experimento PK, y se evaluaron los parámetros que incluían la cantidad de trombina hasta el momento.

Figura 6C. Muestra que FVIIa-CTP$_3$ se produjo después de la selección de FVII, el proceso de purificación de HA y la activación. Se administró FVIIa-CTP$_3$ o NovoSeven® en una sola inyección intravenosa a ratones hemofílicos con FVIII -/-. Las muestras de sangre se extrajeron retro-orbitalmente a 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 ºC hasta el análisis. Los parámetros de generación de trombina se evaluaron durante el experimento PK, y se evaluaron los parámetros que incluyen la tasa de generación de trombina.

Figura 7A. Muestra curvas de supervivencia de ratones hemofílicos después de la transección en la vena de la cola (TVT). La TVT se realizó 15 minutos después de la administración. La supervivencia de los ratones se observó durante 24 horas después de la TVT y se registró cada hora durante las primeras 12 horas y después de 24 horas. Los datos del grupo de control (vehículo) son la suma de los 3 experimentos con 5 ratones/experimento.

Figura 7B. Muestra curvas de supervivencia de ratones hemofílicos después de la transección en la vena de la cola (TVT). La TVT se realizó 24 horas después de la administración. La supervivencia de los ratones se observó durante 24 horas después de la TVT y se registró cada hora durante las primeras 12 horas y después de 24 horas. Los datos del grupo de control (vehículo) son la suma de los 3 experimentos con 5 ratones/experimento.

Figura 7C. Muestra curvas de supervivencia de ratones hemofílicos después de la transección en la vena de la cola (TVT). La TVT se realizó 48 horas después de la administración. La supervivencia de los ratones se observó durante 24 horas después de la TVT y se registró cada hora durante las primeras 12 horas y después de 24 horas. Los datos del grupo de control (vehículo) son la suma de los 3 experimentos con 5 ratones/experimento.

Figura 7D. Resume la supervivencia del ratón según lo registrado 24 horas después de la TVT.

Figura 8. Muestra una comparación de la actividad de escisión del sustrato (Pefachrome FVIIa) entre FVIIa (NovoSeven) y el factor VIIa modificado por CTP (MOD-5014).

Figura 9. Muestra una comparación de la actividad del sustrato (Pefachrome FVIIa) entre FVIIa (NovoSeven) y el factor VIIa modificado por CTP (MOD-5014) cuando se une al factor tisular.

Figura 10. Muestra una comparación de la generación de Factor X activado por FVIIa (NovoSeven) o FVIIa modificado por CTP (MOD-5014), a la vista de la concentración de Factor VIIa.

Figura 11. Muestra una comparación de la generación de Factor X activado por FVIIa (NovoSeven) o FVIIa modificada por CTP (MOD-5014), a la vista de la concentración de Factor X.

Figuras 12A y 12B. Muestra una comparación de la tasa de generación de Factor X activado por FVIIa (NovoSeven) o FVIIa modificado por CTP (MOD-5014), en ausencia de factor tisular y a la vista de la concentración de lípidos (Figura 12A). Muestra una comparación de la generación de Factor X activado por FVIIa (NovoSeven) o FVIIa

modificado por CTP (MOD-5014), en ausencia de factor tisular y a la vista de la concentración de lípidos (Figura 12B).

Figura 13. Muestra una comparación de la generación de Factor X activado entre FVIIa (NovoSeven) y MOD-5014, en ausencia de factor tisular a la vista de la concentración de Factor X.

Figura 14. Muestra una comparación de la inhibición de la escisión del sustrato (Pefachrome FVIIa) por FVIIa (NovoSeven) y FVIIa modificado por CTP (MOD-5014) a la vista de polibreno.

Figuras 15A-15C. Muestran una comparación de la inhibición de la escisión del sustrato (Pefachrome FXa) por FVIIa (NovoSeven) y FVIIa modificado por CTP (MOD-5014) a la vista de la concentración de TFPI (Figura 15A) y la duración de la exposición a TFPI para FVIIa (Figura 15B) y MOD-5014 (Figura 15C).

Figura 16. Muestra el diagrama de producción de flujo de proceso aguas arriba del FVII-CTP_3 modificado por CTP.

Figura 17. Presenta un diagrama de flujo del proceso de purificación de FVII-CTP_3 modificado por CTP.

Figura 18. Presenta resultados reducidos de SDS-PAGE o FVII-CTP_3 modificado por CTP purificado.

Figura 19. Muestra que el porcentaje de N-glicanos cargados del total de N-glicanos fue consistente durante el proceso de purificación, el porcentaje inicial de N-glicanos cargados se efectúa a partir del proceso de cultivo celular aguas arriba.

Figura 20. Presenta que el contenido de formas oxidadas y otras formas relacionadas se reduce a lo largo del proceso de purificación. Las columnas Multimodel y HIC son las etapas de purificación con el efecto más significativo en la reducción de formas oxidadas y formas relacionadas.

Figura 21. Presenta la eliminación de la proteína no gamma-carboxilada por la columna multimodal. La columna CHT enriquece la fracción gamma-carboxilada eliminando la proteína no gamma-carboxilada.

Figura 22. Presenta el contenido de ácido siálico en todo el proceso de purificación. El contenido de ácido siálico fue consistente durante el proceso de purificación, el contenido inicial de ácido siálico se efectúa a partir del proceso de cultivo celular anterior.

Descripción detallada

La presente invención invención proporciona un método para fabricar un polipéptido del factor VII activo (FVIIa) humano modificado por el péptido terminal carboxi (CTP) de gonadotropina coriónica humana, en donde dicho polipéptido comprende tres moléculas de CTP unidas en tándem en su extremo C-terminal del FVII, comprendiendo el método las etapas de: transfectar de manera estable un número predeterminado de células con un vector de expresión que comprende una parte codificante que codifica dicho FVII modificado por CTP, en donde dichas células transfectadas expresan y secretan dicho FVII modificado por CTP; obtener clones celulares que sobre-expresan dicho FVII modificado por CTP; expandir dichos clones en solución a una escala predeterminada; recoger dicha solución que contiene dichos clones; filtrar dicha solución que contiene dichos clones para obtener una solución de recolección clarificada que contiene el FVII modificado por CTP; y purificar y activar el FVII modificado por CTP de la solución de recolección clarificada para obtener una solución de proteína purificada que tiene una concentración deseada del FVIIa modificado por CTP; en donde dicho FVIIa modificado por CTP fabricado comprende lo siguiente: (a) una forma poco oxidada de dicho FVIIa modificado por CTP consiste en menos de 5% de forma oxidada; (b) un alto porcentaje de residuos de ácido glutámico carboxilados que consisten en al menos 90% de residuos Gla; (c) al menos 60% de N-glicanos cargados; y (d) una potencia de al menos 10500 U/mg, fabricando con ello un FVIIa modificado por CTP y en donde la secuencia de aminoácidos del FVIIa modificado por CTP fabricado se recoge en la SEQ ID NO: 7.

La presente invención también proporciona un factor VII activo (FVIIa) humano modificado por péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana que comprende tres moléculas de CTP unidas en tándem al extremo C-terminal de FVIIa, en donde el polipéptido de FVIIa modificado por CTP está en una forma sustancialmente pura y activa, comprendiendo el polipéptido de FVIIa: (a) un alto contenido de ácido siálico de al menos 15 mol/mol; (b) una forma de alta glicosilación que comprende un contenido de O-glicano de al menos 10 mol/mol; (c) consistiendo una forma poco oxidada del FVIIa modificado por CTP en menos de 5% de forma oxidada; (d) un alto porcentaje de residuos de ácido glutámico carboxilados que consiste en al menos 90% de residuos Gla; (e) un alto porcentaje de N-glicanos cargados que consiste en al menos 60% de N-glicanos cargados; y (f) una potencia de al menos 10500 U/mg, y en donde la secuencia de aminoácidos del FVII modificado por CTP fabricado se recoge en la SEQ ID NO: 7.

La presente invención también proporciona una composición que comprende el FVIIa modificado por CTP y un soporte farmacéuticamente aceptable.

Polipéptido del Factor VII modificado por el Péptido Terminal Carboxi (CTP) de Gonadotropina Coriónica Humana

El factor de coagulación VII (FVII) es una glicoproteína de 444 aminoácidos (50 KDa) secretada por los hepatocitos en el torrente sanguíneo como una proenzima inactiva (zimógeno). Tras la lesión tisular y la 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 mediante diversas células localizadas en las capas más profundas de la pared vascular. La formación de este complejo FVII-TF conduce a la activación de FVII. El FVII activado (FVIIa) inicia la ruta de coagulación extrínseca activando el Factor IX y el Factor X.

FVII pertenece a un grupo de glicoproteínas dependientes de la vitamina K asociadas con el sistema de coagulación. El FVII se sintetiza como un precursor con un propéptido N-terminal seguido de una secuencia de aminoácidos madura. El propéptido contiene un sitio de acoplamiento para gamma carboxilasa que convierte los residuos de ácido glutámico (Glu) en residuos de ácido gamma carboxi glutámico (Gla). El ácido carboxiglutámico (Gla) es un aminoácido poco común introducido en las proteínas por una carboxilación posterior a la traducción de los residuos de ácido glutámico. Esta modificación introduce una afinidad por los iones calcio, en donde se requiere que la vitamina K introduzca la carboxilación de los factores de coagulación, incluido el factor FVII. El dominio Gla es el responsable de la unión de alta afinidad de los iones calcio, que tiene un papel importante que desempeñar en la coagulación. Este dominio es seguido por dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF), una región de conexión (CR) y un dominio de la serina proteasa C-terminal. Antes de la secreción, el propéptido de FVII se escinde, en donde se elimina el péptido señal, formando una glicoproteína FVII de zimógeno de cadena sencilla de 406 aminoácidos. Después de la secreción, la proteína puede activarse en un heterodímero de dos cadenas unido por disulfuro, FVIIa, por escisión en la CR. La concentración plasmática de FVII es 10 nM y aproximadamente el 1% circula en forma activa en individuos sanos.

Como se describe aquí, unir tres CTPs al extremo carboxi de FVII o FVIIa prolonga con ello la semivida biológica o mejora el área bajo la curva (AUC) de FVII o FVIIa.

Como se describe aquí, unir tres péptidos terminales carboxi (CTPs) de gonadotropina coriónica al extremo carboxi del polipéptido FVIIa reduce con ello la frecuencia de dicho polipéptido FVIIa.

Como se describe aquí, unir tres péptidos terminales carboxi (CTPs) de gonadotropina coriónica al extremo carboxi del polipéptido FVIIa reduce la tasa de aclaramiento de dicho polipéptido FVIIa.

En una realización, el FVIIa es un FVIIa recombinante. En otra realización, el FVIIa comprende un péptido señal. En otra realización, un FVIIa recombinante no comprende un péptido señal. En otra realización, un factor de coagulación activado no comprende un péptido señal. En otra realización, el FVIIa comprende 3 repeticiones de CTP unidas al extremo C y ningún CTPs unido al extremo N.

En una realización, la forma sustancialmente pura y activa del FVIIa modificado por CTP comprende al menos el 60% de una forma de alta glicosilación de dicho FVIIa modificada por CTP. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 90%. En una realización adicional, el porcentaje de pureza se selecciona del grupo que consiste en 97.3%, 97.6%, 97.4% y 97.0%. En una realización adicional, la potencia del FVIIa modificado por CTP se selecciona del grupo que consiste en 15563 U/mg 16720 U/mg, 22478 U/mg y 23608 U/mg.

En una realización, la secuencia de aminoácidos de dicho FVIIa modificado por CTP está presente estructuralmente como un heterodímero de dos cadenas enlazado por disulfuro que comprende un puente de disulfuro (S-S) entre el residuo de cisteína 135 y el residuo de cisteína 262 de la SEQ ID NO: 7, y en donde dichas dos cadenas comprenden una cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-152 y una cadena pesada que comprende los aminoácidos 153-490 de la SEQ ID NO: 7.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor VII comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggctgcctggctgcagtcttcgtaacccag

gaggaagcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttcctggaggagctgcggccgggctccctggagagg

gagtgcaaggaggagcagtgctccttcgaggaggcccgggagatcttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttct
tacagtgatggggaccagtgtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctg
cctccctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggctgtgagc
agtactgcagtgaccacacgggcaccaagcgctcctgtcggtgccacgaggggtactctctgctggcagacggggtgtcctgca
cacccacagttgaatatccatgtggaaaaatacctattctagaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtgggggg
caaggtgtgccccaaaggggagtgtccatggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgtgtgggggggaccctgatcaac
accatctgggtggtctccgcggcccactgtttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtgctgggcgagcacgac
ctcagcgagcacgacggggatgagcagagccggcgggtggcgcaggtcatcatccccagcacgtacgtccccgggcaccacc
aaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgaccatgtggtgccccctctgcctgccccgaacggacgt
tctctgagaggacgctggccttcgtgcgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcgccacggccctgga
gctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgacccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtgggagactccccaaatatcac
ggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaaggggggacagtggaggcccacatgccacccacta
ccggggcacgtggtacctgacgggcatcgtcagctggggccagggctgcgcaaccgtgggccactttggggtgtacaccagg
gtctcccagtacatcgagtggctgcaaaagctcatgcgctcagagccacgcccaggagtcctcctgcgagccccatttccctgag
gatgcggccgc (SEQ ID NO: 1).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos de Factor VII comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLEREC
KEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLP
AFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTP
TVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINT
IWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTN
HDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALE
LMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHAT
HYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAP
FP (SEQ ID NO: 2).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos de Factor VII comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLEREC
KEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLP
AFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTP
TVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINT
IWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTN
HDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALE
LMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHAT
HYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAP
FPGCGR (SEQ ID NO: 3).

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor VII-CTP-CTP CTP (unido al extremo carboxi) comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggctgcctggctgcagtcttcgtaacccag
gaggaagcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttcctggaggagctgcggccgggctccctggagagg
gagtgcaaggaggagcagtgctccttcgaggaggcccgggagatcttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttct
tacagtgatggggaccagtgtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctg
cctccctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggctgtgagc
agtactgcagtgaccacacgggcaccaagcgctcctgtcggtgccacgaggggtactctctgctggcagacggggtgtcctgca
cacccacagttgaatatccatgtggaaaaatacctattctagaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtgggggg
caaggtgtgccccaaagggagtgtccatggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgtgtgggggacccctgatcaac
accatctgggtggtctccgcggcccactgtttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtgctgggcgagcacgac
ctcagcgagcacgacggggatgagcagagccggcgggtggcgcaggtcatcatccccagcacgtacgtcccgggcaccacc
aaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgaccatgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacgt
tctctgagaggacgctggccttcgtgcgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcgccacggccctgga
gctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgacccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtgggagactccccaaatatcac
ggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaaggggacagtggaggcccacatgccacccacta
ccggggcacgtggtacctgaccggcatcgtgagctggggccagggctgcgccaccgtgggccacttcggcgtgtacaccagg
gtgtcccagtacatcgagtggctgcagaaactgatgagaagcgagcccagacccggcgtgctgctgagagcccccttccccag
cagcagctccaaggcccctccccctagcctgcccagccctagcagactgcctgggcccagtgacacccctatcctgcctcagtc
cagctccagcaaggccccacccccctagcctgccttctccttctcggctgcctggccccagcgatactccaattctgccccagtcctc
cagcagtaaggctccccctccatctctgccatcccccagcagactgccaggcccttctgatacacccatcctcccacagtgatgag
gatccgcggccgcttaattaa (SEQ ID NO: 4).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos de Factor VII-CTP-CTP-CTP (unida al extremo carboxi) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVL-
HRRRRANAFLEELRPGSLEREC KEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQS-
YICFCLP AFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTP
TVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINT
IWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTN
HDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALE
LMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHAT
HYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAP
FPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSS
KAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 5).

En otra realización, los aminoácidos 1-38 de la SEQ ID NO: 5 comprende una señal de secuencia. En otra realización, la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal comprende MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRR

(SEQ ID NO: 6).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos de Factor VII-CTP-CTP-CTP (unido al extremo carboxi) carece de un péptido señal y comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: ANAFLEELRP GSLERECKEE QCSFEEAREI FKDAERTKLF WISYSDGDQC ASSPCQNGGS CKDQLQSYIC FCLPAFEGRN CETHKDDQLI CVNENGGCEQ YCSDHTGTKR SCRCHEGYSL LADGVSCTPT VEYPCGKIPI LEKRNASKPQ GRIVGGKVCP KGECPWQVLL LVNGAQLCGG TLINTIWVVS AAHCFDKIKN WRNLIAVLGE HDLSEHDGDE QSRRVAQVII PSTYVPGTTN HDIALLRLHQ PVVLTDHVVP LCLPERTFSE RTLAFVRFSL VSGWGQLLDR GATALELMVL NVPRLMTQDC LQQSRKVGDS PNITEYMFCA GYSDGSKDSC KGDSGGPHAT HYRGTWYLTG IVSWGQGCAT VGHFGVYTRV SQYIEWLQKL MRSEPRPGVL LRAPFPSSSS KAPPPSLPSP SRLPGPSDTP ILPQSSSSKA PPPSLPSPSR LPGPSDTPIL PQSSSSKAPP PSLPSPSRLP GPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 7)

En otra realización, la secuencia de aminoácidos de Factor VII activado -CTP-CTP-CTP (fijado al extremo carboxi) (FVIIa-CTP_3) carece de un péptido señal y comprende la secuencia de aminoácidos como se recoge en la SEQ ID NO: 7. En otra realización, la secuencia de aminoácidos de FVIIa-CTP_3 se escinde entre la arginina (R) en el residuo

152 y la isoleucina (I) en el residuo 153. En otra realización, la secuencia de aminoácidos de FVIIa-CTP$_3$ está estructuralmente presente como un heterodímero de dos cadenas enlazadas por disulfuro que comprende un puente de disulfuro S-S entre los residuos de cisteína presentes en cada una de las cadenas. En otra realización, la secuencia de aminoácidos de FVIIa-CTP$_3$ está estructuralmente presente como un heterodímero de dos cadenas enlazadas por disulfuro que comprende un puente S-S entre el residuo de cisteína 135 y el residuo de cisteína 262 de la SEQ ID NO: 7, en donde dichas dos cadenas comprenden una cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-152 y una cadena pesada que comprende los aminoácidos 153-490 de la SEQ ID NO: 7.

En otra realización, la cadena ligera migra a aproximadamente 25 kDA en una SDS-PAGE en condiciones de desnaturalización. En otra realización, la cadena pesada migra a aproximadamente 50 kDA en una SDS-PAGE en condiciones de desnaturalización. En otra realización, la cadena pesada migra a aproximadamente 60 kDA en una SDS-PAGE en condiciones de desnaturalización.

En otra realización, se añade furina a una célula que expresa el factor de coagulación FVIIa-CTP$_3$. En otra realización, la furina aumenta la eficiencia de producción del FVIIa-CTP$_3$ en una célula. En otra realización, la furina se co-transfecta con el vector que comprende la secuencia codificante del FVIIa-CTP$_3$. 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 de codificación de furina se inserta en pCI-DHFR. En otra realización, la secuencia codificante de furina está diseñada en pCI-dhfr/smaI+NotI, Furin/AsisI F.I.+NotI.

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica furina comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

tctagagtcgaccccgccatggagctgaggccctggttgctatgggtggtagcagcaacaggaaccttggtcctgctagcagctg

atgctcagggccagaaggtcttcaccaacacgtgggctgtgcgcatccctggaggcccagcggtggccaacagtgtggcacgg

aagcatgggttcctcaacctgggccagatcttcggggactattaccacttctggcatcgaggagtgacgaagcggtccctgtcgcc

tcaccgcccgcggcacagccggctgcagagggagcctcaagtacagtggctggaacagcaggtggcaaagcgacggactaa

acgggacgtgtaccaggagcccacagaccccaagtttcctcagcagtggtacctgtctggtgtcactcagcgggacctgaatgtg

aaggcggcctgggcgcagggctacacagggcacggcattgtggtctccattctggacgatggcatcgagaagaaccaccggga

cttggcaggcaattatgatcctggggccagttttgatgtcaatgaccaggaccctgacccccagcctcggtacacacagatgaatg

acaacaggcacggcacacggtgtgcgggggaagtggctgcggtggccaacaacggtgtctgtggtgtaggtgtggcctacaac

gcccgcattggaggggtgcgcatgctggatggcgaggtgacagatgcagtggaggcacgctcgctgggcctgaaccccaacc

acatccacatctacagtgccagctggggccccgaggatgacggcaagacagtggatgggccagcccgcctcgccgaggaggc

cttcttccgtggggttagccagggccgaggggggctgggctccatctttgtctgggcctcggggaacgggggccgggaacatga

cagctgcaactgcgacggctacaccaacagtatctacacgctgtccatcagcagcgccacgcagtttggcaacgtgccgtggtac

agcgaggcctgctcgtccacactggccacgacctacagcagtggcaaccagaatgagaagcagatcgtgacgactgacttgcg

gcagaagtgcacggagtctcacacgggcacctcagcctctgccccctttagcagccggcatcattgctctcaccctggaggccaat

aagaacctcacatggcgggacatgcaacacctggtggtacagacctcgaagccagcccacctcaatgccaacgactgggccac

caatggtgtgggccggaaagtgagccactcatatggctacgggctttggacgcaggcgccatggtggccctggcccagaattg

gaccacagtggcccccccagcggaagtgcatcatcgacatcctcaccgagcccaaagacatcgggaaacggctcgaggtgcgg

aagaccgtgaccgcgtgcctgggcgagcccaaccacatcactcggctggagcacgctcaggcgcggctcaccctgtcctataat

cgccgtggcgacctggccatccacctggtcagccccatgggcacccgctccaccctgctggcagccaggccacatgactactcc

gcagatgggtttaatgactgggccttcatgacaactcattcctgggatgaggatccctctggcgagtgggtcctagagattgaaaac
accagcgaagccaacaactatgggacgctgaccaagttcaccctcgtactctatggcaccgcccctgaggggctgcccgtacct
ccagaaagcagtggctgcaagaccctcacgtccagtcaggcctgtgtggtgtgcgaggaaggcttctccctgcaccagaagagc
tgtgtccagcactgccctccaggcttcgcccccccaagtcctcgatacgcactatagcaccgagaatgacgtggagaccatccggg
ccagcgtctgcgcccccctgccacgcctcatgtgccacatgccaggggccggccctgacagactgcctcagctgccccagccac
gcctccttggaccctgtggagcagacttgctcccggcaaagccagagcagccgagagtccccgccacagcagcagccacctcg
gctgcccccggaggtggaggcggggcaacggctgcgggcagggctgctgccctcacacctgcctgaggtggtggccggcct
cagctgcgccttcatcgtgctggtcttcgtcactgtcttcctggtcctgcagctgcgctctggctttagttttcgggggggtgaaggtgt
acaccatggaccgtggcctcatctcctacaaggggctgccccctgaagcctggcaggaggagtgcccgtctgactcagaagag
gacgagggccgggggcgagaggaccgcctttatcaaagaccagagcgccctctgaacgcggccgc (SEQ ID NO: 10).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos de la furina comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHG
FLNLGQIFGDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKR
DVYQEPTDPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTGHGIVVSILDDGIEKNHP
DLAGNYDPGASFDVNDQDPDPQPRYTQMNDNRHGTRCAGEVAAVANNGVCGV
GVAYNARIGGVRMLDGEVTDAVEARSLGLNPNHIHIYSASWGPEDDGKTVDGPA
RLAEEAFFRGVSQGRGGLGSIFVWASGNGGREHDSCNCDGYTNSIYTLSISSATQF
GNVPWYSEACSSTLATTYSSGNQNEKQIVTTDLRQKCTESHTGTSASAPLAAGIIA
LTLEANKNLTWRDMQHLVVQTSKPAHLNANDWATNGVGRKVSHSYGYGLLDA
GAMVALAQNWTTVAPQRKCIIDILTEPKDIGKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHA
QARLTLSYNRRGDLAIHLVSPMGTRSTLLAARPHDYSADGFNDWAFMTTHSWDE
DPSGEWVLEIENTSEANNYGTLTKFTLVLYGTAPEGLPVPPESSGCKTLTSSQACV
VCEEGFSLHQKSCVQHCPPGFAPQVLDTHYSTENDVETIRASVCAPCHASCATCQ
GPALTDCLSCPSHASLDPVEQTCSRQSQSSRESPPQQQPPRLPPEVEAGQRLRAGLL
PSHLPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVLQLRSGFSFRGVKVYTMDRGLISYKGLPPE
AWQEECPSDSEEDEGRGERTAFIKDQSAL (SEQ ID NO: 11).

En otra realización, el CTP está unido al factor de coagulación a través de un enlazador. En otra realización, el enlazador que conecta la secuencia de CTP al factor de coagulación es un enlace covalente. En otra realización, el enlazador que conecta la secuencia de CTP al factor de coagulación es un enlace peptídico. En otra realización, el enlazador que conecta la secuencia de CTP al factor de coagulación es un enlace peptídico sustituido.

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

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

glicosilados.

En algunas realizaciones, la modificación de la secuencia de CTP es ventajosa para permitir el uso de dosis más bajas. En algunas realizaciones, la modificación de las secuencias de CTP es ventajosa para permitir menos dosis. En algunas realizaciones, la modificación de las secuencias de CTP es ventajosa para permitir un efecto seguro y de acción prolongada.

En algunas realizaciones, "polipéptido", "factor de coagulación modificado por ingeniería genética" o "proteína" como se usa aquí abarca polipéptidos nativos (ya sea productos de degradación, polipéptidos sintetizados sintéticamente o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (polipéptidos sintetizados típicamente de forma sintética), 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 aún más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar en las células.

En algunas realizaciones, las modificaciones incluyen, pero están limitadas a la modificación del extremo C, modificación del enlace polipeptídico, que incluye, pero no se limita a, CH2-NH, CH2-S, CH2-S=O, O=C-NH, CH2-O, CH2-CH2, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones en la cadena principal y modificación de residuos. Métodos para preparar compuestos peptidomiméticos son bien conocidos en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992).

En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos (-CO-NH-) dentro del polipéptido están sustituidos. En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos con enlaces N-metilados (-N(CH3)-CO-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos con enlaces éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos con enlaces cetometileno (-CO-CH2-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos con enlaces α-aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es cualquier alquilo, p. ej., metilo, enlaces carba (-CH2-NH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos con enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH2-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos con enlaces tioamida (-CS-NH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos con dobles enlaces olefínicos (-CH=CH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos con enlaces retroamida (-NH-CO-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos están sustituidos con derivados polipeptídicos (-N(R)-CH2-CO-), en donde R es la cadena lateral "normal", que se presentan de forma natural en el átomo de carbono. En algunas realizaciones, estas modificaciones se producen en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena polipeptídica y en una realización en varios (2-3 enlaces) al mismo tiempo.

En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos aquí incluyen uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros que no son aminoácidos (p. ej., ácido graso, carbohidratos complejos, etc.).

En algunas realizaciones, el aminoácido natural, ácido glutámico (Glu), se carboxila después de la traducción, dando como resultado la presencia de ácido carboxiglutámico (Gla) en un FVII modificado por CTP o FVIIa modificado por CTP descrito aquí.

En una realización, se entiende que "aminoácido" o "secuencia de aminoácidos" incluye los 20 aminoácidos de origen natural. En una realización, "aminoácido" incluye tanto D- como L-aminoácidos.

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

En algunas realizaciones, técnicas de proteínas recombinantes se usan para generar los factores de coagulación de FVII modificados por ingeniería genética descritos aquí. En algunas realizaciones, las técnicas de proteínas recombinantes se utilizan para la generación de polipéptidos relativamente largos (p. ej., más largos que 18-25 aminoácidos). En algunas realizaciones, las técnicas de proteínas recombinantes se utilizan para la generación de grandes cantidades de los factores de coagulación descritos aquí. En algunas realizaciones, las técnicas recombinantes están descritas por Bitter et al., (1987) Methods in Enzymol. 153: 516-544, Studier et al. (1990) Methods in Enzymol. 185: 60-89, Brisson et al. (1984) Nature 310: 511-514, Takamatsu et al. (1987) EMBO J. 6: 307-311, Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3: 1671-1680 y Brogli et al., (1984) Science 224: 838-843, Gurley et al. (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.

En otra realización, la divulgación proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un factor de coagulación y tres péptidos carboxi terminales de gonadotropina unidos al extremo carboxi del factor de coagulación, como se describe anteriormente aquí. En una realización, el polinucleótido es una secuencia de polinucleótido. En una realización, el polinucleótido es una molécula de polinucleótido.

En otra realización, la divulgación proporciona un vector de expresión que comprende una molécula polinucleotídica como se describe aquí. En otra realización, aquí se describe un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido modificado por CTP que consiste en un polipéptido del Factor VII y tres péptidos carboxi terminales (CTPs) de gonadotropina unidos al extremo carboxi de dicho polipéptido del FVII. En otra realización, el FVII modificado por CTP expresado a partir de un vector de expresión descrito aquí, puede activarse en algún momento después de la expresión, dando como resultado FVIIa modificado por CTP.

En otra realización, la divulgación proporciona una célula que comprende el vector de expresión como se describe aquí. En otra realización, aquí se describe una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido modificado por CTP que consiste en un polipéptido del Factor VII (FVII) y tres péptidos carboxi terminales (CTPs) de gonadotropina unidos al extremo carboxi de dicho polipéptido del FVIIa. En otra realización, un CTP-FVII expresado a partir de un vector de expresión descrito aquí y comprendido dentro de una célula, puede activarse después de la secreción de la célula.

En otra realización, la célula que comprende el vector de expresión es una célula eucariótica. En otra realización, la célula es una célula procariótica.

En otra realización, los factores de coagulación FVII modificados por ingeniería genética descritos aquí se sintetizan utilizando una molécula de polinucleótido que codifica un polipéptido como se describe aquí. En algunas realizaciones, la molécula de polinucleótido que codifica los factores de coagulación modificados por ingeniería genética se liga en un vector de expresión, que comprende un control transcripcional de una secuencia reguladora en cis (p. ej., secuencia de promotor). En algunas realizaciones, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión constitutiva de un factor de coagulación descrito aquí. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión específica para el tejido de los factores de coagulación modificados por ingeniería genética. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión inducible de los factores de coagulación modificados por ingeniería genética.

En alguna realización, promotores específicos para el tejido adecuados para uso con la presente divulgación incluyen secuencias que son funcionales en una o más poblaciones de células específicas. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, promotores tales como la albúmina que es específica del hígado [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1: 268-277], promotores específicos de linfoides [Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43: 235-275]; en particular promotores de receptores de células T [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8: 729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) Cell 33729-740], promotores específicos de neuronas tales como el promotor de neurofilamentos [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477], promotores específicos del páncreas [Edlunch et al. (1985) Science 230: 912-916] o promotores específicos de la glándula mamaria tales como el promotor de suero de leche (Patente de EE.UU. Nº 4.873.316 y Publicación de Solicitud Europea Nº 264,166). Promotores inducibles adecuados para uso con la presente invención incluyen, por ejemplo, el promotor inducible por tetraciclina (Srour, M.A., et al., 2003. Thromb. Haemost. 90: 398-405).

En una realización, la expresión "una molécula de polinucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla o doble que se aísla y se proporciona en forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótidos complementaria (ADNc), una secuencia de polinucleótidos genómica y/o una secuencia de polinucleótidos compuesta (p. ej., una combinación de lo anterior).

En una realización, una "secuencia de polinucelótidos complementaria" se refiere a una secuencia, que resulta de la transcripción inversa del ARN mensajero utilizando una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. En una realización, la secuencia puede amplificarse posteriormente *in vivo* o *in vitro* utilizando una ADN polimerasa.

En una realización, una "secuencia de polinucleótidos genómica" se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y, por lo tanto, representa una parte contigua de un cromosoma.

En una realización, una "secuencia de polinucleótidos compuesta" se refiere a una secuencia, que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. En una realización, una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exonales requeridas para codificar el polipéptido descrito aquí, así como algunas secuencias intrónicas que se interponen entre ellas. En una realización, las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier fuente, incluidas de otros genes, y típicamente incluirán secuencias de señal de corte y empalme conservadas. En una realización, las secuencias intrónicas incluyen elementos reguladores de la expresión que actúan en cis.

En una realización, después de la expresión y antes de la secreción, los péptidos señal se escinden de los factores de coagulación modificados por ingeniería genética por el precursor, dando como resultado los factores de coagulación modificados por ingeniería genética maduros que carecen de un péptido señal. En otra realización, después de la secreción, dicho factor de coagulación modificado por ingeniería genética maduro se activa.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos descritos aquí se preparan usando 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 et al., John Wiley & Sons, 1992).

En una realización, los polinucleótidos descritos aquí que codifican los factores de coagulación FVII modificados por ingeniería genética se insertan en vectores de expresión (es decir, una construcción de ácido nucleico) para permitir la expresión del polipéptido recombinante. En una realización, el vector de expresión descrito aquí incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en procariotas. En una realización, el vector de expresión descrito aquí incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en eucariotas. En una realización, el vector de expresión descrito aquí incluye un vector lanzadera que hace que este vector sea adecuado para la replicación y la integración tanto en procariotas como en eucariotas. En algunas realizaciones, vectores de clonación comprenden secuencias de iniciación de la transcripción y traducción (p. ej., promotores, potenciadore) y terminadores de la transcripción y traducción (p. ej., señales de poliadenilación).

En una realización, se puede usar una variedad de células procariotas o eucariotas como sistemas de expresión del huésped para expresar los factores de coagulación descritos aquí. En algunas realizaciones, estos incluyen, pero no se limitan a microorganismos, tales como bacterias transformadas con un ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vector de expresión de ADN de cósmido que contiene la secuencia codificante del polipéptido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen la secuencia codificante del polipéptido; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes tales como el plásmido Ti, que contienen la secuencia codificante del polipéptido.

En algunas realizaciones, se usan sistemas de expresión no bacterianos (p. ej., sistemas de expresión de mamíferos tales como células CHO) para expresar los factores de coagulación descritos aquí. En una realización, el vector de expresión usado para expresar los polinucleótidos descritos aquí en células de mamíferos es un vector pCI-DHFR que comprende un promotor de CMV y un gen de resistencia a neomicina. La construcción del vector pCI-dhfr se describe en la Solicitud Internacional Nº PCT/IL2016/050645, Publicación Nº WO 2016/203482.

En algunas realizaciones, en sistemas bacterianos descritos aquí, se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el polipéptido expresado. En una realización, se desean grandes cantidades de polipéptido. En una realización, se desean los vectores que dirigen la expresión de altos niveles del producto proteico, posiblemente como una fusión con una secuencia señal hidrófoba, que dirige el producto expresado hacia el periplasma de las bacterias o el medio de cultivo en donde el producto proteico se purifica fácilmente. En una realización, ciertas proteínas de fusión están diseñadas con un sitio de escisión específico para ayudar en la recuperación del polipéptido. En una realización, vectores adaptables a una manipulación de este tipo incluyen, pero no se limitan a la serie pET de vectores de expresión de E. coli [Studier et al., Methods in Enzyrnol. 185: 60-89 (1990)].

En una realización, se usan sistemas de expresión de levadura. En una realización, se pueden usar varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles en levaduras como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 5.932.447, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. En otra realización, se usan vectores que promueven la integración de secuencias de ADN extraño en el cromosoma de levadura.En una realización, el vector expresado aquí descrito puede incluir, además, secuencias de polinucleótidos adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de varias proteínas de un ARNn único tal como un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y secuencias para la integración genómica de polipéptido promotor-quimérico.

Pueden usarse diversos métodos para introducir en células el vector de expresión descrito aquí. Métodos de este tipo se describen en general en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltirnore, Md. (1989), Chang et al., Sornatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular CloningVectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, véanse las patentes de EE.UU. Nºs 5.464.764 y 5.487.992 para los métodos de selección positivos-negativos.

En algunas realizaciones, la introducción de ácido nucleico por infección viral ofrece varias ventajas sobre otros métodos tales como lipofección y electroporación, ya que se puede obtener una mayor eficacia de transfección debido a la naturaleza infecciosa de los virus.

En una realización, se usan vectores de expresión en plantas. En una realización, la expresión de una secuencia codificante de polipéptido es dirigida por varios promotores. En algunas realizaciones se utilizan promotores virales tales como los promotores de ARN 35S y ARN de 19S de CaMV [Brisson et al., Nature 310: 511-514 (1984)], o el

promotor de la proteína de cubierta para TMV [Takamatsu et al., EMBO J. 6: 307-311 (1987)]. En otra realización, se usan promotores de plantas tales como la subunidad pequeña de RUBISCO [Coruzzi et al., EMBO J. 3: 1671-1680 (1984); y Brogli et al., Science 224: 838-843 (1984)] o promotores de choque térmico, p. ej., hspl 7.5-E de soja o hspl 7.3-B [Gurley et al., Mol. Cell. Biol. 6: 559-565 (1986)]. En una realización, las construcciones se introducen en células vegetales utilizando plásmido Ti, plásmido Ri, vectores víricos vegetales, transformación directa de ADN, microinyección, electroporación y otras técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Weissbach y Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, pp 421-463 (1988)]. También se pueden utilizar otros sistemas de expresión tales como sistemas de células huésped de insectos y mamíferos, que son bien conocidos en la técnica.

Se apreciará que, aparte de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica el polipéptido), la construcción de expresión descrita aquí también puede incluir secuencias modificadas por ingeniería genética para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad del polipéptido expresado.

En algunas realizaciones, las células transformadas se cultivan en condiciones efectivas, que permiten la expresión de altas cantidades de factores de coagulación de ingeniería recombinante. En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo efectivas incluyen, pero no se limitan a medios efectivos, biorreactor, temperatura, pH y condiciones de oxígeno que permiten la producción de proteínas. En una realización, un medio eficaz se refiere a cualquier medio en donde se cultiva una célula para producir el polipéptido recombinante descrito aquí. En algunas realizaciones, un medio incluye típicamente una solución acuosa que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables, y sales apropiadas, minerales, metales y otros nutrientes, tales como vitaminas. En algunas realizaciones, las células descritas aquí pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. La determinación de las condiciones de cultivo está dentro de la experiencia de un experto en la técnica.

En algunas realizaciones, dependiendo del vector y del sistema huésped utilizado para la producción, los factores de coagulación modificados por ingeniería genética resultantes que se describen aquí, ya sea que se encuentren dentro de la célula recombinante, se secretan en el medio de fermentación, se secretan en un espacio entre dos membranas celulares tal como el espacio periplásmico en *E. coli*; o se retienen en la superficie exterior de una célula o membrana viral.

En una realización, después de un tiempo predeterminado en cultivo, se efectúa la recuperación del factor de coagulación modificado por ingeniería genética recombinante.

En una realización, la expresión "recuperar el factor de coagulación de modificado por ingeniería genética recombinante" que se usa aquí se refiere a la recolección de todo el medio de fermentación que contiene el polipéptido y no implica necesariamente etapas adicionales de separación o purificación.

En una realización, los factores de coagulación FVII modificados por ingeniería genética aquí se purifican utilizando una variedad de técnicas de purificación de proteínas estándares, tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de concanavalina A, cromatoenfocamiento y solubilización diferencial.

En una realización, un tipo de columna de interacción hidrófoba es la columna Capto Phenil Impress (CIP).

En una realización, para facilitar la recuperación, la secuencia de codificación expresada puede modificarse por ingeniería genética para codificar el factor de coagulación de FVII modificado por ingeniería genética y el resto escindible condensado. En una realización, una proteína de fusión puede diseñarse de modo que el polipéptido pueda aislarse fácilmente mediante cromatografía de afinidad; p. ej., mediante inmovilización en una columna específica para el radical escindible. En una realización, se modifica por ingeniería genética un sitio de escisión entre el factor de coagulación modificados por ingeniería genética y el radical escindible y el polipéptido se puede liberar de la columna cromatográfica por tratamiento con una enzima o agente apropiado que escinde específicamente la proteína de fusión en este sitio [p. ej., véase Booth et al., Immunol. Lett. 19: 65-70 (1988); y Gardella et al., J. Biol. Chem. 265: 15854-15859 (1990)].

En una realización, el factor de coagulación modificado por ingeniería genética se recupera en forma "sustancialmente pura". En otra realización, un factor de coagulación modificado por ingeniería genética sustancialmente puro puede comprender, además, la forma activa del factor de coagulación FVII. En otra realización, una forma sustancialmente pura es al menos 90% pura. En otra realización, una forma sustancialmente pura es al menos 95-99% pura.

En una realización, el factor de coagulación FVII modificado por ingeniería genética también se puede sintetizar utilizando sistemas de expresión *in vitro*. En una realización, métodos de síntesis in vitro son bien conocidos en la

técnica y los componentes del sistema están disponibles comercialmente.

En algunas realizaciones, los factores de coagulación FVII modificados por ingeniería genética recombinante se sintetizan y purifican; su eficacia terapéutica se puede analizar *in vivo* o *in vitro*. En una realización, las actividades de unión de los factores de coagulación modificados por ingeniería genética recombinante descritos aquí pueden determinarse utilizando diversos ensayos, como sabe un experto en la técnica.

Se debe entender que los polipéptidos, las composiciones, formulaciones y los métodos descritos aquí que comprenden los elementos o etapas que se describen aquí pueden, en otra realización, consistir en esos elementos o etapas, en otra realización, pueden consistir esencialmente 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 por CTP, así como la inclusión de otros agentes activos, y los soportes, excipientes, emolientes, estabilizantes, etc., farmacéuticamente aceptables, como son conocidos en la industria farmacéutica. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste esencialmente en" se refiere a una composición, cuyo único ingrediente activo es el ingrediente activo indicado, sin embargo, se pueden incluir otros compuestos que son para estabilizar, preservar, etc., la formulación, pero no están implicados directamente en el efecto terapéutico del ingrediente activo indicado. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste esencialmente en" puede referirse a componentes que facilitan la liberación del ingrediente activo. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste" se refiere a una composición, que contiene el ingrediente activo y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el factor de coagulación FVII-CTP$_3$ modificado por ingeniería genética como se describe aquí tiene una actividad biológica equivalente o mejorada en comparación con el factor de coagulación no modificado por CTP. En otra realización, el factor de coagulación FVII-CTP$_3$ modificado por ingeniería genética tiene medidas farmacológicas equivalentes o mejoradas en comparación con el factor de coagulación no modificado por CTP. En otra realización, el factor de coagulación diseñado como se describe aquí tiene una farmacocinética equivalente o mejorada en comparación con el factor de coagulación no modificado por CTP. En otra realización, el factor de coagulación FVII-CTP$_3$ modificado por ingeniería genética tiene una farmacodinámica equivalente o mejorada en comparación con el factor de coagulación no modificado por CTP.

En otra realización, las expresiones "péptido CTP", "péptido carboxi terminal" y "secuencia de CTP" se usan de manera indistinta aquí. En otra realización, el péptido carboxi terminal es un CTP de longitud completa.

En otra realización, "secuencia señal" y "péptido señal" se usan de manera indistinta aquí que tienen todas las mismas cualidades y significados. En otra realización, "secuencia" cuando se hace referencia a una molécula de polinucleótido puede referirse a una parte de codificación. En una realización, la actividad biológica potenciada se deriva de la semivida más larga del factor de coagulación modificado por ingeniería genética mientras se mantiene al menos alguna actividad biológica. En otra realización, la actividad biológica potenciada se deriva de la actividad biológica potenciada que resulta de la modificación de CTP. En otra realización, la actividad biológica potenciada se deriva de una semivida más larga y de una funcionalidad potenciada del factor de coagulación modificado por CTP.

El factor de coagulación FVII-CTP$_3$ conjugado de esta invención se puede utilizar de la misma manera que un factor de coagulación conjugado no modificado. En otra realización, un factor de coagulación FVII-CTP$_3$ conjugado de esta invención tiene un aumento de la semivida circulante y del tiempo de permanencia en plasma, un aclaramiento disminuido y un aumento de la actividad clínica *in vivo*. Debido a las propiedades mejoradas del factor de coagulación FVII-CTP$_3$ conjugado como se describe aquí, este conjugado se administra con menos frecuencia que la forma no modificada del mismo factor de coagulación.

La frecuencia reducida de administración puede dar como resultado una estrategia de tratamiento mejorada, lo que conducirá a un cumplimiento mejorado del paciente conduciendo a mejores resultados del tratamiento, así como a una mejor calidad de vida del paciente. 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 FVII-CTP$_3$ tienen una potencia mejorada, una estabilidad mejorada, niveles elevados de AUC y una semivida en circulación potenciada.

Composiciones y Usos de las Mismas

El factor de coagulación FVII-CTP$_3$ modificado por ingeniería genética aquí descrito puede proporcionarse al individuo per se. En una realización, el factor de coagulación modificado por ingeniería genética descrito aquí puede proporcionarse al individuo como parte de una composición farmacéutica en donde se mezcla con un soporte farmacéuticamente aceptable.

En una realización, una "composición farmacéutica" o una "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos aquí con otros componentes químicos tales como soportes y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica o una "formulación

farmacéutica" es facilitar la administración de un compuesto a un organismo. En ciertas realizaciones, una "composición farmacéutica" o una "formulación farmacéutica" proporcionan la forma de dosificación farmacéutica de un fármaco. Las "composiciones farmacéuticas" o "formulaciones farmacéuticas" en ciertas realizaciones incluyen tecnologías de liberación lenta, parches transdérmicos o cualquier forma de dosificación conocida en la técnica.

En otra realización, "ingrediente activo" se refiere al FVII-CTP_3, que es responsable del efecto biológico.

En otra realización, se describe aquí una preparación combinada. En una realización, "una preparación combinada" define especialmente un "kit de partes" en el sentido de que los participantes en la combinación tal como se definió anteriormente se pueden dosificar independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de los participantes en la combinación, es decir, simultáneamente, por separado o secuencialmente. En algunas realizaciones, las partes del kit de partes pueden, p. ej., administrarse de forma simultánea o cronológicamente escalonada, es decir, en diferentes momentos y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. En una realización, la preparación combinada puede variar, p. ej., con el fin de hacer frente a las necesidades de la subpoblación de un paciente a tratar o a las necesidades del paciente individual, cuyas diferentes necesidades pueden deberse a una enfermedad particular, la gravedad de una enfermedad, la edad, el sexo o el peso corporal pueden ser fácilmente realizados por un experto en la técnica.

En otra realización, aquí se describe una composición farmacéutica o una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido del Factor VIIa (FVIIa) modificado por CTP que consiste en un polipéptido del FVIIa y tres péptidos carboxi terminales de gonadotropina (CTP) unidos al extremo carboxi de dicho FVIIa.

En una realización, la divulgación proporciona una formulación farmacéutica que comprende el FVII-CTP_3 y un tampón y un agente de tonicidad. En otra realización, el tampón es citrato 20 mM y glicina 13.3 mM, y el agente de tonicidad es NaCl 150 mM. En otra realización, la formulación está a aproximadamente un pH de 6.4. En otra realización, el tampón es citrato 20 mM y glicina 13.3 mM, y el agente de tonicidad es NaCl 150 mM, y el pH es 6.4. En otra realización, el tampón es citrato 20 mM, arginina 100 mM, trehalosa al 2%, y el pH es 6.2. En otra realización, la formulación es una formulación líquida. En otra realización, la formulación es una formulación liofilizada. En otra realización, la formulación líquida se puede formar usando un factor de coagulación modificado por CTP liofilizado.

En otra realización, aquí se proporciona una forma de dosificación una vez a la semana que comprende la formulación farmacéutica proporcionada aquí. En otra realización, aquí se proporciona una forma de dosificación una vez al día que comprende la formulación farmacéutica proporcionada aquí. En otra realización, se proporciona aquí una forma de dosificación cada dos días que comprende la formulación farmacéutica proporcionada aquí. En otra realización, se proporciona aquí una forma de dosificación cada tres días que comprende la formulación farmacéutica proporcionada aquí. En otra realización, aquí se proporciona una forma de dosificación dos veces por semana que comprende la formulación farmacéutica proporcionada aquí. En otra realización, aquí se proporciona una forma de dosificación dos veces por semana que comprende la formulación farmacéutica proporcionada aquí. En otra realización, se proporciona aquí una forma de dosificación semanal que comprende la formulación farmacéutica proporcionada aquí. En otra realización, se proporciona aquí una forma de dosificación quincenal (cada dos semanas) que comprende la formulación farmacéutica proporcionada aquí.

En otra realización, aquí se describe una formulación que comprende un polipéptido que consiste en un factor de coagulación y tres CTPs de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi del factor de coagulación, y en donde dicho polipéptido consiste opcionalmente en un péptido señal, en donde dicha formulación tiene una estabilidad incrementada. En una realización, la formulación es estable durante al menos un año. En otra realización, la formulación es estable durante al menos dos años.

En una realización, elFactor FVIIa modificado por CTPs se formula en una formulación líquida. En otra realización, el Factor VII modificado con CTPs se formula en una forma de dosificación intranasal. En otra realización, el factor de coagulación modificado con CTPs se formula en una forma de dosificación inyectable.

Como se describe aquí, proporcionar a un sujeto que lo necesite un factor de coagulación modificado por CTPs, aumenta con ello el cumplimiento en el uso de la terapia del factor de coagulación.

El factor de coagulación modificado por CTPs se puede administrar a un sujeto una vez al día. En otra realización, un polipéptido que comprende un factor de coagulación modificado por CTPs se puede administrar a un sujeto una vez cada dos días. En otra realización, un factor de coagulación modificado por CTPs se puede administrar a un sujeto una vez cada tres días. En otra realización, un factor de coagulación modificado por CTPs se puede administrar a un sujeto una vez cada cuatro días. En otra realización, un factor de coagulación modificado por CTPs se puede administra a un sujeto una vez cada cinco días. En otra realización, un factor de coagulación modificado por CTPs se puede administrar a un sujeto una vez cada seis días. En otra realización, un factor de coagulación modificado por CTPs se puede administrar a un sujeto una vez por semana. En otra realización, un factor de coagulación modificado por CTPs se puede administrar a un sujeto una vez cada 7-14 días. En otra realización, un

factor de coagulación modificado por CTPs se puede administrar a un sujeto una vez cada 10-20 días. En otra realización, un factor de coagulación modificado por CTPs se puede administra a un sujeto una vez cada 5-15 días. En otra realización, un factor de coagulación modificado por CTPs se puede administrar a un sujeto una vez cada 15-30 días.

En una realización, la preparación descrita aquí se formula en formulaciones líquidas para inyección a través de una jeringa o dispositivo de pluma.

En una realización, las formulaciones proporcionadas aquí también comprenden conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal y similares; agentes quelantes, tales como edetato sódico y otros; tampones, tales como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerol, manitol y otros; antioxidantes, tales como ácido ascórbico, acetilcistina, metabisulfote de sodio y otros; agentes aromáticos; ajustadores de la viscosidad, tales como polímeros, incluyendo celulosa y derivados de la misma; y poli(alcohol vinílico) y ácido y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas según sea necesario. Las composiciones también comprenden anestésicos locales u otros agentes activos. Las composiciones se pueden usar como pulverizaciones, nieblas, gotas y similares.

Se describe que un factor de coagulación conjugado como se describe aquí es útil en el tratamiento de sujetos afectados por untrastorno de coagulación. En otra realización, el trastorno de coagulación es la hemofilia. En otra realización, un factor de coagulación conjugado como se describe aquí es útil en la terapia profiláctica de la hemofilia, reduciendo así el riesgo de hemorragia y complicaciones asociadas. En otra realización, reducir el riesgo de hemorragia y las complicaciones asociadas reduce el riesgo de sangrado espontáneo. En otra realización, reducir el riesgo de sangrado y las complicaciones asociadas reduce el riesgo de un sangrado excesivo. En otra realización, un factor de coagulación conjugado como se describe aquí es útil en el tratamiento de sujetos que padecen hemofilia al tiempo que reduce el riesgo de desarrollar anticuerpos inhibidores frente a factores de coagulación administrados de forma exógena. En otra realización, un factor de coagulación conjugado como se describe aquí es útil en el tratamiento de sujetos afectados con hemofilia que induce homeostasis.

En una realización, un FVIIa modificado por CTP descrito aquí tiene usos terapéuticos. En otra realización, un FVIIa modificado por CTP descrito aquí tiene usos profilácticos.

También se describe que un FVIIa FVIIa conjugado como se describe aquí es útil en el tratamiento de sujetos que experimentan un sangrado excesivo o hematomas o que tienen un tiempo de protrombina (PT) o tiempo de tromboplastina parcial (PTT) prolongado. En otra realización, un FVIIa FVIIa conjugado como se describe aquí es útil en el tratamiento de sujetos que tienen una afección adquirida que está causando un sangrado, tal como deficiencia de vitamina K o enfermedad hepática. En otra realización, un FVIIa conjugado como se describe aquí es útil en el tratamiento de sujetos que tienen deficiencias en los factores de coagulación que se adquieren (debido a otras enfermedades) o heredados, leves o graves, permanentes o temporales. En otra realización, un FVIIa conjugado como se describe aquí es útil en el tratamiento de sujetos que padecen hemofilia A. En otra realización, un FVIIa conjugado como se describe aquí es útil en el tratamiento de sujetos que padecen hemofilia B. En otra realización, un FVIIa conjugado como se describe aquí es útil en el tratamiento de sujetos que tienen deficiencias adquiridas debido a enfermedades crónicas, tales como enfermedad hepática o cáncer; a una afección aguda, tal como la coagulación intravascular diseminada (DIC), que utiliza los factores de coagulación a una tasa rápida; o a una deficiencia de vitamina K o tratamiento con un antagonista de la vitamina K tal como warfarina (la producción de los factores II, VII, IX y X requieren vitamina K). En otra realización, un FVIIa conjugado como se describe aquí es útil en el tratamiento de sujetos con una enfermedad en donde causa desequilibrios de la coagulación tales como, pero no limitados a: 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 de anticoagulación, una ingestión accidental de la warfarina anticoagulante, múltiples transfusiones de sangre (unidades de sangre almacenadas pierden algunos de sus factores de coagulación), o una combinación de ellas. En otra realización, el FVIIa modificado por CTP descrito aquí se puede utilizar para tratar la trombosis venosa profunda en un sujeto. En otra realización, el FVIIa modificado por CTP descrito aquí se pùede utilizar para prevenir el sangrado no controlado en un sujeto con hemofilia. En otra realización, el FVIIa modificado por CTP descrito aquí se puede utilizar para prevenir episodios de sangrado en un sujeto con hemofilia. En otra realización, el FVIIa modificado por CTP descrito aquí se puede utilizar para controlar los episodios de sangrado en un sujeto con hemofilia B (deficiencia congénita del factor IX).

En una realización, el FVIIa modificado por CTP descrito aquí se puede utilizar para prevenir o tratar un trastorno de coagulación.En otra realización, el Factor VIIa modificado con CTP descrito en el presente documento puede utilizarse para prevenir o tratar la hemofilia. para prevenir o tratar la hemofilia en un sujeto..

En una realización, la hemofilia es hemofilia A. En otra realización, la hemofilia es hemofilia B. En otra realización, el FVIIa modificado por CTP de la invención es para prevenir o tratar pacientes con hemofilia adquirida (hemofilia sin inhibidores). En otra realización, el FVIIa modificado por CTP de la invención es para prevenir o tratar un trastorno de la coagulación que previenen o tratan la hemofilia A o B sin inhibidores. En otra realización, la hemofilia es hemofilia grave. En otra realización, la hemofilia es hemofilia moderada. En otra realización, la hemofilia es

hemofilia moderada a grave con o sin inhibidores. Un experto en la técnica apreciará que la expresión "hemofilia moderada a grave" se refiere a un sujeto que tiene menos de o igual a 3% de FVIII o FIX. En otra realización, la hemofila grave puede abarcar niveles de factor de coagulación iguales a aproximadamente 0-1%. En otra realización, la hemofilia es hemofilia moderada, que en otra realización describe la hemofilia en donde los niveles de factor de coagulación son del 1-5%. En otra realización, la hemofilia es hemofilia leve, que en otra realización describe la hemofilia en donde los niveles de factor de coagulación son del 5-50%.

En otra realización, el Factor VIIa modificado por CTP descrto aquí se puede utilizar para prevenir o tratar la hemofilia en un sujeto mediante administración por vía subcutánea o intravenosa a dicho sujeto.

En otra realización, la administración subcutánea (SC) da como resultado una mayor biodisponibilidad del FVII modificado por CTP en comparación con el FVII recombinante. En otra realización, la semivida es más larga y la biodisponibilidad (AUC SC/AUC IV) es mayor después de la administración SC de FVIIa-CTP_3 cuando se compara con la administración SC de NovoSeven®. En otra realización, el MOD-5014 inyectado por vía subcutánea muestra una supervivencia mejorada de los ratones en comparación con el FVII recombinante (NovoSeven®).

En una realización, MOD-5014 es FVIIa-CTP_3 (que tiene tres péptidos CTP unidos en el extremo C-terminal). En una realización, MOD-5014 proporciona un factor de coagulación de acción prolongada. En una realización, MOD-5014 proporciona una respuesta de coagulación sanguínea más sostenida y prolongada en comparación con FVIIa humano recombinante. Un experto en la técnica apreciará que los términos MOD-5014 o FVIIa-CTP3 se pueden usar de manera indistinta con las mismas cualidades y significados, y se refieren en una realización a una estructura de heterodímero de dos cadenas unidas por disulfuro que comprende el aminoácido de la SEQ ID NO: 7. Además, un experto en la técnica apreciaría que al describir los factores de coagulación o los factores de coagulación modificados por CTP aquí, por ejemplo, FVII-CTP_3, el término FVII-CTP_3 puede referirse en ciertos casos a la forma inactiva de FVII-CTP_3. El experto en la técnica sin duda reconocerá a qué forma se hace referencia en base a los detalles asociados tales como la actividad. De manera similar, mientras que el término MOD-5014 es intercambiable con el término FVIIa-CTP_3, es decir, representa la forma activa del factor de coagulación modificado por CTP, en ciertos casos el término MOD-5014 puede usarse para designar una forma activa de FVII o una secuencia de nucleótidos que codifica un FVII-CTP_3, que luego se expresará y secretará de una célula, y se purificará y activará *in vitro*, dando como resultado que la forma activa de FVIIa esté presente en una molécula MOD-5014.

En una realización, la desactivación de MOD-5014 por el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI) depende de la dosis. En una realización, la desactivación de MOD-5014 por TFPI muestra un patrón de desactivación dependiente de la dosis similar al de FVIIa recombinante (NovoSeven®) por TFPI. En una realización, MOD-5014 es inhibido por la antitrombina III. En una realización, la inhibición de MOD-5014 por la antitrombina III se aumenta en presencia de heparina. En una realización, la inhibición de MOD-5014 por la antitrombina III muestra un patrón de inhibición similar al de FVIIa recombinante (NovoSeven®), en presencia o ausencia de heparina.

En una realización, MOD-5014 genera trombina de una manera dependiente de la dosis. En una realización, MOD-5014 disminuye la fase de retardo de la generación de trombina. En una realización, MOD-5014 reduce el tiempo de coagulación de la sangre. En una realización, MOD-5014 aumenta la eficacia de la formación de coágulos de sangre. En una realización, la administración de MOD-5014 disminuye el tiempo de coagulación sanguínea en un sujeto. En una realización, la administración de MOD-5014 aumenta la eficacia de la formación de coágulos de sangre en un sujeto. En una realización, la generación de trombina por MOD-5014 es similar a la producida por FVIIa recombinante (NovoSeven®). En una realización, la disminución de la fase de retardo de la generación de trombina por MOD-5014 es similar a la producida por FVIIa recombinante (NovoSeven®). En una realización, disminuir el tiempo de coagulación de la sangre por MOD-5014 es similar al producido por FVIIa recombinante (NovoSeven®). En una realización, el aumento de la eficacia de la formación de coágulos de sangre por MOD-5014 es similar al producido por FVIIa recombinante (NovoSeven®).

Como se describe aquí, las uniones de CTP a factores de coagulación sanguínea, por ejemplo el factor FVII, aumentan la semivida del factor de coagulación sanguínea. Ejemplos demuestran que, tres CTPs fijados a FVIIA no parecen afectar a las actividades de coagulación sanguínea. Como se describe aquí, las uniones de CTP a FVII no interfieren con la formación de coágulos de sangre. Como se describe aquí, las uniones de CTP a FVII no interfieren con el aumento de la eficacia de la formación de coágulos de sangre. En una realización, las uniones de CTP a FVII no interfieren con la disminución en el tiempo de coagulación de la sangre. Como se describe aquí, la unión de fosfolípido a FVII se mantiene después de la unión de CTPs al factor de coagulación sanguínea. Como se describe aquí, las uniones de CTP a FVIIA no interfieren con la formación de coágulos de sangre. Como se describe aquí, las uniones de CTP a FVIIA no interfieren con el aumento de la eficacia de la formación de coágulos de sangre. Como se describe aquí, las uniones de CTP a FVIIA no interfieren con la disminución de la formación de coágulos de sangre. En una realización, la unión de fosfolípido a FVIIA se mantiene después de la unión de CTPs al factor de coagulación de la sangre. En otras realizaciones, el factor de coagulación modificado por ingeniería genética se puede utilizar para el tratamiento de pacientes con hemofilia B. Resultados de la administración de MOD-5014 a un mamífero grande (perros). La administración de MOD-5014 proporcionó un FVIIa de acción prolongada efectivo y seguro para la coagulación de la sangre (véase el documento WO

2016/203482). El tratamiento utilizando MOD-5014 puede ser profiláctico o bajo demanda. Por consiguiente, descrito aquí, es el tratamiento de la hemofilia en un sujeto, evitando un sangrado excesivo en dicho sujeto o tratando profilácticamente la hemofilia en un sujeto administrando MOD-5014 a dicho sujeto.

En una realización, el tratamiento de la hemofilia en un sujeto con MOD-5014 comprende una frecuencia reducida de administración de MOD-5014, en comparación con FVIIa recombinante (NovoSeven®). En una realización, el tratamiento profiláctico de la hemofilia en un sujeto con MOD-5014 comprende una frecuencia reducida de administración de MOD-5014, en comparación con FVIIa recombinante (NovoSeven®). En una realización, prevenir el exceso de sangrado en un sujeto con MOD-5014 comprende una frecuencia reducida de administración de MOD-5014, en comparación con FVIIa recombinante (NovoSeven®).

En una realización, el Factor VII de coagulación que comprende 3 CTPs en tándem en su extremo carboxi exhibe un perfil PK mejorado al tiempo que mantiene su actividad de coagulación frente a NovoSeven®.

El Factor FVIIa modificado por CTP y las composiciones del mismo se pueden utilizar para el tratamiento de episodios de sangrado en pacientes con hemofilia A o B con inhibidores de FVIII o FIX y en pacientes con hemofilia adquirida; prevención de sangrado en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con hemofilia A o B con inhibidores de 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. La hemofilia adquirida es un trastorno autoinmune espontáneo en donde los pacientes con hemostasia previamente normal desarrollan auto-anticuerpos contra los factores de coagulación, con mayor frecuencia FVIII. El desarrollo de auto-anticuerpos contra FVIII conduce a la deficiencia de FVIII, lo que resulta en una generación insuficiente de trombina por el factor IXa y el complejo de factor VIIIa a través de la vía intrínseca de la cascada de coagulación. Las siguientes afecciones pueden estar asociadas con la hemofilia A adquirida: trastornos idiopáticos, en el embarazo, autoinmunes, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, trastornos dermatológicos (p. ej., psoriasis, pénfigo), enfermedades respiratorias (p. ej., asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), reacciones por fármacos alérgicos, diabetes, infección aguda por hepatitis B, infección aguda por hepatitis C, tumores malignos sólidos (próstata, pulmón, colon, páncreas, estómago, conducto biliar, cabeza y cuello, cuello uterino, mama, melanoma, riñón), neoplasias malignas hematológicas. El experto en la técnica apreciará que los trastornos autoinmunes pueden incluir artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, arteritis temporal, síndrome de Sjögren, anemia hemolítica autoinmune, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, enfermedad de Graves, hipotiroidismo autoinmune. El experto en la técnica apreciará que pueden producirse reacciones alérgicas en un sujeto al que se le administra penicilina y sus derivados, sulfamidas, fenitoína, cloranfenicol, metildopa, tioxanteno de depósito, interferón alfa, fludarabina, vacunación de baciloCalmette-Guérin (BCG), desvenlafaxina. El experto en la técnica apreciará que las neoplasias malignas hematológicas pueden incluir leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, síndrome mielodisplásico, mielofibrosis y eritroleucemia. Por lo tanto, el FVIIa modificado por CTP y las composiciones del mismo proporcionados aquí se pueden utilizar para tratar la hemofilia adquirida en un sujeto.

En otra realización, el FVIIa modificado por CTP y las composiciones del mismoi se pueden utilizar para el tratamiento o la prevención de hemorragias musculares. En otra realización, se pueden utilizar para el tratamiento o la prevención de hemorragias articulares, para el tratamiento terapéutico o profiláctico de epistaxis y sangrado de las encías, sangrado de la membrana mucosa o sangrado en el sistema nervioso central, para el tratamiento terapéutico o profiláctico de hemorragia gastrointestinal o cerebral, o para el tratamiento terapéutico o profiláctico de hemorragias leves de baja frecuencia, hemorragias moderadas de baja frecuencia, hemorragias leves de alta frecuencia o hemorragias moderadas de alta frecuencia.

En una realización, el FVIIa modificado por CTP y las composiciones del mismo proporcionan un tratamiento terapéutico o profiláctico de la hemofilia asintomática, de la hemofilia leve a moderada o de la hemofilia grave.

En una realización, el FVIIa modificado por CTP y las composiciones del mismo se pueden utilizar para proporcionar un tratamiento terapéutico o profiláctico de la hemorragia que, en una realización, es una hemorragia incontrolable y, en otra realización, una hemorragia intracerebral. En otra realización, el FVIIa modificado por CTP y las composiciones del mismo se pueden utilizar para proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de coagulopatías neonatales; enfermedad hepática severa; procedimientos quirúrgicos de alto riesgo; pérdida de sangre traumática; trasplante de médula ósea; trombocitopenia y trastornos de la función plaquetaria; reversión urgente de la anticoagulación oral; deficiencias congénitas de los factores V, VII, X y XI; o enfermedad de von Willebrand, en una realización, enfermedad de von Willebrand con inhibidores del factor de von Willebrand.

En una realización, el factor de coagulación FVIIa modificado por CTP se puede utilizar para el tratamiento de la hemofilia o una enfermedad relacionada como se describe aquí en un sujeto. En una realización, el sujeto es humano. En otra realización, el sujeto es un niño humano. En otra realización, el sujeto es un animal domesticado. En otra realización, el sujeto es un mamífero. En otra realización, el sujeto es un animal de granja. En otra realización, el sujeto es un mono. En otra realización, el sujeto es un caballo. En otra realización, el sujeto es una vaca. En otra realización, el sujeto es un ratón. En otra realización, el sujeto es una rata. En otra realización, el

sujeto es canino. En otra realización, el sujeto es felino. En otra realización, el sujeto es bovino, ovino, porcino, equino, murino o cervino. En una realización, el sujeto es masculino. En otra realización, el sujeto es femenino. 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.

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

En otra realización, "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un ingrediente activo. En una realización, excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

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

La dosis del factor de coagulación FVIIa modificado por ingeniería genética descrito aquí, en una realización, está en el intervalo de 0.005-100 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 0.005-5 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 0.01-50 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 0.1-20 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 0.1-10 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 0.01-5 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 0.001-0.01 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 0.001-0.1 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 0.1-5 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 0.5-50 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 0.2-15 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 0.8-65 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 1-50 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 5-10 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 8-15 mg/día. En otra realización, la dosis está en un intervalo de 10-20 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 20-40 mg/día. En otra realización, la dosis está en un intervalo de 60-120 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 12-40 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 40-60 mg/día. En otra realización, la dosis está en un intervalo de 50-100 mg/día. En otra realización, la dosis está en un intervalo de 1-60 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 15-25 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 5-10 mg/día. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 55-65 mg/día.

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

En una realización, la dosis es de 20 mg/día. En una realización, la dosis es de 30 mg/día. En una realización, la dosis es de 40 mg/día. En una realización, la dosis es de 50 mg/día. En una realización, la dosis es de 0.01 mg/día. En otra realización, la dosis es de 0.1 mg/día. En otra realización, la dosis es de 1 mg/día. En otra realización, la dosis es de 0.530 mg/día. En otra realización, la dosis es de 0.05 mg/día. En otra realización, la dosis es de 50 mg/día. En otra realización, la dosis es de 10 mg/día. En otra realización, la dosis es de 20-70 mg/día. En otra realización, la dosis es de 5 mg/día.

En una realización, la dosis del factor de coagulación FVIIa modificado por CTP es 1-5 mg/día. En una realización, la dosis del factor de coagulación FVIIa modificado por CTP es 1-3 mg/día. En otra realización, la dosis del factor de coagulación FVIIa modificado por CTP es de 2 mg/día.

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

En otra realización, la dosis del factor de coagulación es de 10-50 mg/día. En otra realización, la dosis es de 10-50 mg/2 días. En otra realización, la dosis es de 10-50 mg/3 días. En otra realización, la dosis es de 10-50 mg/4 días. En otra realización, la dosis es de 10-50 microgramos mg/5 días. En otra realización, la dosis es de 10-50 mg/6 días. En otra realización, la dosis es de 10-50 mg/semana. En otra realización, la dosis es de 10-50 mg/9 días. En otra realización, la dosis es de 10-50 mg/11 días. En otra realización, la dosis es de 10-50 mg/14 días.

En otra realización, el FVIIa modificado por CTP se formula en una forma de dosificación intranasal.En otra realización, el FVIIa modificado con CTP se formula en una forma farmacéutica inyectable. En otra realización, el FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto en una dosis que varía de 0.0001 mg a 0.6 mg, o en una dosis que varía de 0.001 mg a 0.005 mg. o en una dosis que varía de 0.005 mg a 0.01 mg, o en una dosis que varía de 0.01 mg a 0.3 mg, o en una dosis que varía de 0.2 mg a 0.6 mg. En otra realización, el FVIIa modificado por CTP está libre de CTPs en su extremo amino.

En otra realización, el FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto en una dosis que oscila entre 1-100 microgramos. En otra realización, el FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto en una dosis que oscila entre 10-80 microgramos o en una dosis que varía de 20-60 microgramos, o en una dosis que oscila entre 10-50 microgramos, o en una dosis que oscila entre 40-80 microgramos, o en una dosis que oscila entre 10-30 microgramos, o en una dosis que varía de 30-60 microgramos.

En otra realización, el FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto en una dosis que varía de 0.2 mg a 2 mg. En otra realización, el FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto en una dosis que varía de 2 mg a 6 mg, o en una dosis que oscila entre 4 mg y 10 mg, o en una dosis que oscila entre 5 mg y 15 mg.

En una realización, el FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto en una dosis que oscila entre 10 µg/kg-1000 µg/kg. En otra realización, el FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto en una dosis que oscila entre 25 µg/kg-600 µg/kg, o en una dosis que oscila entre 50 µg/kg-400 µg/kg, o en una dosis de aproximadamente 25 µg/kg, o en una dosis de aproximadamente 50 µg/kg, o en una dosis de aproximadamente 100 µg/kg, o en una dosis de aproximadamente 200 µg/kg, o en una dosis de aproximadamente 300 µg/kg, o en una dosis de aproximadamente 400 µg/kg, o en una dosis de aproximadamente 500 µg/kg, o en una dosis de aproximadamente 600 µg/kg.

En una realización, la dosis del FVIIa modificado por CTP comprende el 50% de la cantidad de FVIIa administrada en la dosis recomendada de FVIIa recombinante (p. ej., NovoSeven®) a los pacientes durante el mismo período de tiempo. En una realización, la dosis del FVII modificado por CTP comprende el 50% de la cantidad de FVII administrada en la dosis recomendada de FVII recombinante a pacientes durante el mismo período de tiempo. Por ejemplo, si NovoSeven® se administra en una dosis de 90 mcg/kg cada dos horas a un paciente antes o después de la operación (es decir, 7.65 mg cada dos horas o 45.9 mg en seis dosis durante un período de 12 horas, para un paciente de 85 kg), un factor de coagulación modificado por CTP descrito aquí se puede dar a una dosis que es el 50% de la dosis de 12 horas de FVIIa recombinante del paciente (es decir, a una dosis de 23 mg administrada una vez durante un período de 12 horas).

En otra realización, la dosificación del FVIIa modificado por CTP es tal que contiene un 45% de la cantidad del factor de coagulación que la administrada usando el factor de coagulación no modificado por CTP. En otra realización, la dosis del factor de coagulación FVIIa modificado por CTP es tal que contiene un 10% o 25% o 35% o 75% o 100% de la cantidad del factor de coagulación que la administrada usando el factor de coagulación FVIIa no modificado por CTP. Sin embargo, incluso si la dosis contiene la misma cantidad de factor de coagulación que el factor de coagulación no modificado por CTP, aún es ventajoso para los sujetos ya que se administrará con menos frecuencia debido a su mayor semivida en comparación con los factores de coagulación recombinantes.

En otra realización, una cantidad terapéuticamente efectiva de un factor de coagulación FVIIa-CTP_3 conjugado está entre 10 µg/Kg-500 µg/Kg para FVIIa. En otra realización, una cantidad terapéuticamente efectiva de un factor de coagulación FVIIa-CTP_3 conjugado es de 150-250 UI por kg de peso corporal, administrada una vez al día. En otra realización, una composición farmacéutica que comprende un FVIIa-CTP_3 se formula con una fuerza eficaz para la administración por diversos medios a un paciente humano.

En una realización, el factor de coagulación FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto semanalmente. En otra realización, el factor de coagulación FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto dos veces por semana. En otra realización, el factor de coagulación FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto cada quince días (una vez cada dos semanas). En otra realización, el factor de coagulación FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto dos veces al mes. En otra realización, el factor de coagulación FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto una vez al mes. En otra realización, el factor de coagulación FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto diariamente. En otra realización, el factor de coagulación FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto cada dos días.

En otra realización, el FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto una vez cada tres días. En otra realización, el FVIIa modificado por CTP se administra a un sujeto una vez cada cuatro días, o una vez cada cinco días, o una vez cada seis días, o. una vez cada 7-14 días, o una vez cada 10-20 días, o una vez cada 5-15 días, o una vez cada 15-30 días.

El uso del FVIIa modificado por CTP puede aumentar el cumplimiento en el uso de la terapia del factor de coagulación, incluyendo el cumplimiento de pacientes que padecen enfermedades crónicas que necesitan una

terapia con factor de coagulación.

El uso del FVIIa modificado por CTP puede permitir la reducción en la frecuencia de dosificación del factor de coagulación.

En otra realización, el término cumplimiento comprende adherencia. El uso del FVIIa modificado por CTP puede aumentar el cumplimiento de los pacientes que necesitan una terapia de factor de coagulación reduciendo la frecuencia de administración del factor de coagulación. Esto se puede lograr debido a las modificaciones de CTP que hacen que el factor de coagulación modificado por CTP sea más estable, o como resultado del aumento de T½ del factor de coagulación, o como resultado de aumentar el tiempo de aclaramiento o reducir la tasa de aclaramiento del factor de coagulación.

En otra realización, la reducción en la frecuencia de administración del factor de coagulación se logra como resultado del aumento de la medida de AUC del factor de coagulación.

En otra realización, las composiciones proporcionadas aquí se absorben de manera sorprendentemente más eficaz en el torrente sanguíneo después de la administración SC (véase el documento WO 2016/203482). Poder administrar FVIIa por vía subcutánea es una ventaja, ya que se puede usar para aplicaciones profilácticas. Las inyecciones subcutáneas también son mucho más fáciles de autoinyectarse para los pacientes, 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. Formas de dosificación unitaria de este tipo comprenden una cantidad segura y efectiva del factor de coagulación deseado de la divulgación, cada uno de los cuales está en una realización, desde aproximadamente 0.7 o 3.5 mg hasta aproximadamente 280 mg/70 kg, o en otra realización, aproximadamente 0.5 o 10 mg hasta aproximadamente 210 mg/70 kg. Los soportes farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de formas de dosificación unitaria para administración oral son bien conocidos 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, tales como almidón, gelatina y sacarosa; desintegrantes, tales como almidón, ácido algínico y croscarmelosa; lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. En una realización, se pueden utilizar deslizantes tales como dióxido de silicio para mejorar las características de flujo de la mezcla en polvo. En una realización, pueden añadirse agentes colorantes, tales como los colorantes FD&C, para la apariencia. Edulcorantes y agentes aromatizantes, tales como aspartamo, sacarina, mentol, menta y sabores de frutas, son adyuvantes útiles para tabletas masticables. Las cápsulas comprenden típicamente uno o más diluyentes sólidos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, la selección de los componentes del soporte depende de consideraciones secundarias tales como el sabor, el costo y la estabilidad en almacenamiento, que no son críticas para los propósitos de esta invención, y pueden ser realizadas 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 descrita aquí comprende tabletas de liberación prolongada, cápsulas, pastillas o tabletas masticables. En una realización, la forma de dosificación oral descrita aquí comprende tabletas, cápsulas, pastillas o tabletas masticables de liberación lenta. En una realización, la forma de dosificación oral descrita aquí comprende tabletas, cápsulas, pastillas o tabletas masticables de liberación inmediata. En una realización, la forma de dosificación oral se formula de acuerdo con el perfil de liberación deseado del ingrediente activo farmacéutico como es conocido por un experto en la técnica.

Las composiciones perorales, en algunas realizaciones, comprenden soluciones, emulsiones, suspensiones líquidas y similares. En algunas realizaciones, los soportes farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de composiciones de este tipo son bien conocidos 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 10%.

En algunas realizaciones, composiciones del FVIIa modificado por CTP de esta invención comprenden soluciones o emulsiones, que en algunas realizaciones son soluciones o emulsiones acuosas que comprenden una cantidad segura y eficaz de los compuestos descritos aquí y opcionalmente, otros compuestos, destinados a la administracion tópica intranasal. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 10.0% p/v de un compuesto objeto, más preferiblemente de aproximadamente 00.1% a aproximadamente 2.0, que se usa para la administración sistémica de los compuestos por vía intranasal.

En otra realización, el FVIIa modificado por CTP se puede inyectar en el músculo (inyección intramuscular). En otra realización, el FVIIa modificado por CTP se puede inyectar debajo de la piel (inyección subcutánea). En otra realización, el FVIIa modificado por CTP descrito aquí se puede administrar mediante administración sistémica. En otra realización, un factor de coagulación FVIIa como se describe en el presente documento puede administrarse por vía sistémica. En otra realización, se puede administrar mediante inyección intravenosa. En otra realización, la

administración puede ser parenteral, pulmonar, oral, tópica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, transnasal, intraocular, oftálmica, epidural, bucal, rectal, transmucosal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramedulares así como la administración intratecal o intraventricular directa.

En otra realización, la preparación se puede administrar de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través 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, parcanceral, transmucosa, intramuscular, intravascular, intraventricular, intracraneal, intranasal, sublingual, o una combinación de ellas.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas y las formulaciones farmacéuticas se administran mediante 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 y las formulaciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra realización, las composiciones farmacéuticas y las formulaciones 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 y las formulaciones farmacéuticas se administran por vía intramuscular y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración intramuscular.

Además, en otra realización, las composiciones farmacéuticas y formulaciones farmacéuticas se administran por vía tópica a las superficies corporales y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración tópica. Formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, pomadas, cremas, lociones, gotas y similares. Para la administración tópica, los compuestos descritos aquí se combinan con un agente o agentes terapéuticos adicionales apropiados, se preparan y aplican como soluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un soporte farmacéutico.

En una realización, las composiciones farmacéuticas y formulaciones farmacéuticas descritas aquí se fabrican mediante procesos bien conocidos en la técnica, p. ej., por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

En una realización, las composiciones farmacéuticas y formulaciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se formulan de una manera convencional usando uno o más soportes fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden ser utilizados farmacéuticamente. En una realización, la formulación depende de la vía de administración elegida.

En una realización, los inyectables de la divulgación se formulan en soluciones acuosas. En una realización, los inyectables de la divulgación se formulan en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de sal fisiológica. En algunas realizaciones, para la administración transmucosal, se utilizan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera a permear. Penetrantes de este tipo son generalmente conocidos en la técnica.

En una realización, las preparaciones descritas aquí se formulan para administración parenteral, p. ej., mediante inyección en bolo o infusión continua. En algunas realizaciones, las formulaciones para inyección se presentan en forma de dosis unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes multidosis con opcionalmente, un conservante añadido. En algunas realizaciones, las composiciones son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones también comprenden, en algunas realizaciones, conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal y similares; agentes quelantes, tales como edetato sódico y otros; tampones tales como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerol, manitol y otros; antioxidantes tales como ácido ascórbico, acetilcistina, metabisulfote de sodio y otros; agentes aromáticos; ajustadores de la viscosidad, tales como polímeros, incluyendo celulosa y derivados de los mismos; y poli(alcohol vinílico) y ácido y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas según sea necesario. Las composiciones también comprenden, en algunas realizaciones, anestésicos locales u otros agentes activos. Las composiciones se pueden usar como pulverizaciones, nieblas, gotas y similares.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos, en algunas realizaciones, se preparan como suspensiones de inyección apropiadas basadas en aceite o agua. Disolventes o soportes lipófilos adecuados incluyen, en algunas realizaciones, aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato

de etilo, triglicéridos o liposomas. Suspensiones de inyección acuosas contienen, en algunas realizaciones, sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. En otra realización, la suspensión también contiene estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

En otra realización, el compuesto activo puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Dosease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327; J.E. Diederichs et al, Pharm./nd. 56 (1994) 267-275).

En otra realización, la composición farmacéutica administrada en un sistema de liberación controlada se formula para infusión intravenosa, bomba osmótica implantable, parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, se usa una bomba (véase Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos. En aún otra realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca del objetivo terapéutico, es decir, el cerebro, por lo tanto requiriendo solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984). Otros sistemas de liberación controlada se comentan 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, p. ej., una solución a base de agua estéril, a pirógena, antes de su uso. Las composiciones se formulan, en algunas realizaciones, para la administración de atomización e inhalación. En otra realización, las composiciones están contenidas en un recipiente con medios atomizadores unidos.

En una realización, la preparación descrita aquí se formula en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, utilizando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y formulaciones farmacéuticas adecuadas para uso en el contexto descrito aquí incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito deseado. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de ingredientes activos eficaces para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado.

En una realización, la determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Algunos ejemplos de sustancias que pueden servir como soportes o componentes farmacéuticamente aceptables de los mismos 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 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 cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles, tales como propilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido algínico; emulsionantes, tales como los emulsionantes de la marca Tween™; agentes humectantes, tales como laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes aromatizantes; agentes de formación de tabletas, estabilizantes; antioxidantes; conservantes agua apirógena; solución salina isotónica; y soluciones tampón fosfato. La elección de un soporte farmacéuticamente aceptable para uso junto con el compuesto se determina básicamente por la forma en que se administrará el compuesto. Si se ha de inyectar el compuesto, en una realización, el soporte 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.

Además, las composiciones comprenden, además, aglutinantes (p. ej., acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona), agentes desintegrantes (p. ej. almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, silicio). dióxido, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma guar, glicolato sódico de almidón), tampones (p. ej., Tris-HCl, acetato, fosfato) de diversos pH y fuerza iónica, aditivos, tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción en las superficies, detergentes (p. ej., Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), inhibidores de proteasa, surfactantes (p.ej., lauril sulfato de sodio), mejoradores de la permeación, agentes solubilizantes (p. ej., glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), hidroxianisol butilado), estabilizadores (p. ej., hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa), agentes que aumentan la viscosidad (p. ej., carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma guar), edulcorantes (p. ej., aspartamo, ácido cítrico), conservantes (p. ej., timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (p. ej., ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, laurilsulfato de sodio), adyuvantes de flujo (p. ej., dióxido de silicio coloidal), plastificantes (p. ej., ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (p. ej., carbómero, hidroxipropilcelulosa, laurilsulfato de sodio), recubrimientos de polímeros (p. ej., poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formadores de película (p. ej.,

etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

Componentes típicos de soportes para jarabes, elixires, emulsiones y suspensiones incluyen etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, sacarosa líquida, sorbitol y agua. Para una suspensión, los agentes de suspensión típicos incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa (por ejemplo, Avicel™, RC-591), tragacanto y alginato de sodio; agentes humectantes típicos incluyen lecitina y sorbitán óxido de polietileno (p. ej., polisorbato 80). Conservantes típicos incluyen metilparabeno y benzoato de sodio. En otra realización, las composiciones líquidas perorales también contienen uno o más componentes tales como edulcorantes, agentes aromatizantes y colorantes descritos anteriormente.

Las composiciones también incluyen la incorporación del material activo en o sobre preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoplastos). Composiciones de este tipo influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de eliminación *in vivo*.

También se comprenden por la divulgación las composiciones en forma de partículas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado a anticuerpos dirigidos contra receptores, ligandos o antígenos específicos de tejido o acoplados a ligandos de receptores específicos de tejido.

En algunas realizaciones, los compuestos modificados por la unión covalente de polímeros hidrosolubles tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona o polipropolina. En otra realización, los compuestos modificados exhiben semividas sustancialmente más largas en la sangre después de la inyección intravenosa que los compuestos no modificados correspondientes. En una realización, las modificaciones también aumentan la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminan la agregación, mejoran la estabilidad física y química del compuesto y reducen en gran medida la inmunogenicidad y la reactividad del compuesto. En otra realización, la actividad biológica deseada in vivo se logra mediante la administración de abductos de compuestos de polímeros de este tipo con menos frecuencia o en dosis más bajas que con el compuesto no modificado.

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 seres humanos.

En una realización, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos aquí pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. En una realización, los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis para uso en seres humanos. En una realización, las dosis varían dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. En una realización, el médico individual puede elegir la formulación exacta, la vía de administración y la dosis a la vista del estado del paciente. [Véase, p. ej., Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 p. 1].

En una realización, dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una sola administración o de una pluralidad de administraciones, con un curso de tratamiento que puede durar desde varios días hasta varias semanas o hasta que se efectúe la cura o disminuya el estado de enfermedad se logra.

En una realización, la cantidad de una composición que se administrará dependerá, por supuesto, del sujeto que se trate, la gravedad de la aflicción, la forma de administración, el criterio del médico que prescribe, etc.

En una realización, las composiciones que incluyen la preparación descrita aquí formulada en un soporte farmacéutico compatible también se preparan, se colocan en un recipiente apropiado y se marcan para el tratamiento de una afección indicada.

En otra realización, un factor de coagulación como se describe aquí es una preparación liofilizada (es decir, criodesecada) en combinación con excipientes orgánicos complejos y estabilizantes tales como agentes tensioactivos no iónicos (es decir, surfactantes), diversos azúcares, polioles orgánicos y/o albúmina de suero humano. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un factor de coagulación FVIIa liofilizado como se describe en agua estéril para inyección. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un factor de coagulación FVIIa liofilizado como se describe en PBS estéril para inyección. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un factor de coagulación FVIIa liofilizado como se describe en NaCl al 0.9% estéril para inyección. En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación FVIIa modificado con CTP como se describe aquí y soportes complejos tales como albúmina de suero humano, polioles, azúcares y agentes estabilizantes tensioactivos aniónicos. En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación FVIIa como se describe aquí y ácido lactobiónico y un tampón de acetato/glicina. En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación FVIIa

modificado por CTP como se describe aquí y aminoácidos, tales 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 FVIIa modificado por CTP liofilizado como se describe aquí y glicina o albúmina de suero humano (HSA), un tampón (p. ej., acetato) y un agente isotónico (p. ej., NaCl). En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación FVIIa modificado por CTP liofilizado como se describe aquí y un tampón fosfato, glicina y HSA.

En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación FVIIa modificado por CTP como se describe aquí 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 FVIIa modificado por CTP 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, o que tiene un pH de aproximadamente 6.5 o de aproximadamente 6.4. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación FVIIa modificado por CTP como se describe aquí se estabiliza con un aminoácido como agente estabilizante y en algunos casos una sal (si el aminoácido no contiene una cadena lateral cargada).

En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación FVIIa modificado por CTP como se describe aquí es una composición líquida que comprende un agente estabilizante entre aproximadamente el 0.3% y el 5% en peso, que es un aminoácido.

En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación FVIIa modificado por CTP como se describe aquí proporciona precisión de dosificación y seguridad del producto. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación FVIIa modificado por CTP como se describe aquí proporciona una formulación líquida estable y biológicamente activa para uso en aplicaciones inyectables. En otra realización, la composición farmacéutica comprende un factor de coagulación FVIIa modificado por CTP no liofilizado como se describe aquí.

En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación FVIIa modificado por CTP como se describe aquí proporciona una formulación líquida que permite el almacenamiento durante un largo período de tiempo en un estado líquido que facilita el almacenamiento y el envío antes de la administración.

En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación FVIIa modificado por CTP como se describe aquí comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra realización, la composición farmacéutica inyectable que comprende un factor de coagulación FVIIa modificado por CTP como se describe aquí comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra realización, la producción de micropartículas lipídicas mediante congelación por pulverización fue descrita por Speiser (Speiser et al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54) seguida de nanonódulos de lípidos para administración peroral (Speiser documento EP 0167825 (1990)). En otra realización, los lípidos, que se usan, son bien tolerados por el cuerpo (p. ej., glicéridos compuestos de ácidos grasos que están presentes en las emulsiones para nutrición parenteral).

En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un factor de coagulación FVIIa modificado por CTP como se describe aquí comprende micropartículas poliméricas. En otra realización, la composición farmacéutica comprende nanopartículas. En otra realización, la composición farmacéutica comprende liposomas. En otra realización, la composición farmacéutica comprende emulsión lipídica. En otra realización, la composición farmacéutica comprende microesferas. En otra realización, la composición farmacéutica comprende nanopartículas lipídicas. En otra realización, la composición farmacéutica comprende nanopartículas lipídicas que comprenden lípidos anfifílicos. En otra realización, la composición farmacéutica comprende nanopartículas lipídicas que comprenden un fármaco, una matriz lipídica y un tensioactivo. En otra realización, la matriz lipídica tiene un contenido de monoglicéridos que es al menos 50% p/p.

En una realización, las composiciones descritas aquí se presentan en un paquete o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. En una realización, el paquete, por ejemplo, comprende una lámina de metal o plástico, tal como un envase blíster. En una realización, el paquete o dispositivo dispensador está acompañado por instrucciones para la administración. En una realización, el paquete o dispensador se aloja mediante un aviso asociado con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Un aviso de este tipo, en una realización, es un etiquetado aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos para medicamentos recetados o un prospecto de producto aprobado.

En una realización, se apreciará que los factores de coagulación FVIIa modificados por CTP descritos aquí pueden proporcionarse al individuo con agentes activos adicionales para lograr un efecto terapéutico mejorado en comparación con el tratamiento con cada agente por sí mismo. En otra realización, se toman medidas (p. ej., la dosificación y la selección del agente complementario) para evitar los efectos secundarios adversos que están

asociados con las terapias de combinación.

Fabricación

La presente invención proporciona un método para fabricar un polipéptido del Factor VII (FVIIa) activo humano modificado por el péptido cartboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana. en donde dicho polipéptido comprende tres moléculas de CTP unidas en tándem al extremo C-terminal de FVII, comprendiendo el método las etapas de: transfectar de manera estable un número predeterminado de células con un vector de expresión que comprende una porción de codificación que codifica dicho FVII modificado por CTP, en donde dichas células transfectadas expresan y secretan dicho FVII modificado por CTP; obtener clones celulares que sobre-expresan dicho FVII modificado por CTP; expandir dichos clones en solución a una escala predeterminada; recoger dicha solución que contiene dichos clones; filtrar dicha solución que contiene dichos clones para obtener una solución de recolección clarificada que contiene dicho FVII modificado por CTP; y, purificar y activarl FVII modificado por CTP a partir de dicha solución de recolección clarificada para obtener una solución de proteína purificada que tiene una concentración deseada del FVIIa modificado por CTP; en donde dicho FVIIa modificado por CTP fabricado comprende lo siguiente:

a. una forma oxidada baja de dicho FVIIa modificado por CTP que consiste en menos de 5% de forma oxidada;

b. un alto porcentaje de residuos de ácido glutámico carboxilado que consiste en al menos 90% de residuos Gla;

c. al menos 60% de N-glicanos cargados; y

d. una potencia de al menos 10500 U/mg;

fabricando con ello un FVIIa modificado por CTP, y en donde la secuencia de aminoácidos del FVIIa modificado por CTP fabricado se recoge en la SEQ ID NO: 7.

En una realización, los polinucleótidos descritos aquí se insertan en vectores de expresión (es decir, una construcción de ácido nucleico) para permitir la expresión del polipéptido recombinante. En una realización, el vector de expresión descrito aquí incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en procariotas. En una realización, el vector de expresión descrito aquí incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en eucariotas. En una realización, el vector de expresión descrito aquí incluye un vector lanzadera que hace que este vector sea adecuado para la replicación y la integración tanto en procariotas como en eucariotas. En algunas realizaciones, los vectores de clonación comprenden secuencias de iniciación de la transcripción y traducción (p. ej., promotores, potenciador) y terminadores de la transcripción y traducción (p. ej., señales de poliadenilación).

En una realización, un método de fabricación de un polipéptido FVIIa modificado por CTP, comprende una etapa que comprende el uso de un vector de expresión, en donde dicho vector de expresión comprende un promotor, una secuencia codificante para un polipéptido FVII modificado por CTP, y una secuencia de poliadenilación. En otra realización, la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación del virus simio (SV) 40.

En una realización, se puede usar una variedad de células procarióticas o eucarióticas como sistemas de expresión del huésped para expresar los polipéptidos descritos aquí. En algunas realizaciones, estos incluyen, pero no se limitan a microorganismos, tales como bacterias transformadas con un ADN de bacteriófago recombinante, ADN plásmido o vector de expresión de ADN cósmido que contiene la secuencia codificante del polipéptido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen la secuencia codificante del polipéptido; sistemas celulares de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes, como el plásmido Ti, que contienen la secuencia codificante del polipéptido.

En una realización, se usan sistemas de expresión no bacterianos (p. ej., sistemas de expresión de mamíferos tales como células CHO o células derivadas de células CHO) para expresar el polipéptido descrito aquí. En una realización, el vector de expresión usado para expresar los polinucleótidos descritos aquí en células de mamíferos es un vector pCI-DHFR que comprende un promotor de CMV y un gen de resistencia a neomicina.

En una realización, el vector de expresión descrito aquí puede incluir, además, secuencias de polinucleótidos adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de varias proteínas de un ARNm único como un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y secuencias para la integración genómica del polipéptido quimérico del promotor.

En algunas realizaciones, los vectores de expresión de mamíferos incluyen, pero no se limitan a pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMTl, pNMT41, pNMT81, que están disponibles en Invitrogen, pCI que está disponible en

Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV, que están disponibles en Strategene, pTRES que está disponible de Clontech, y sus derivados.

En algunas realizaciones, los vectores descritos que contienen elementos reguladores de virus eucarióticos, tales como retrovirus, se usan por métodos descritos aquí. Los vectores SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. En algunas realizaciones, los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus Epstein Barr incluyen pHEBO y p2O5. Otros vectores ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A^+, pMTO10/A^+, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano SV-40, promotor SV-40 posterior, promotor de metalotioneína, promotor del virus del tumor mamario, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de la polihedrina u otros promotores se muestran eficaces para la expresión en células eucariotas.

En una realización, se pueden usar diversos métodos para introducir el vector de expresión que codifica el Factor VII modificado por CTP descrito en las células. La "transfección" de células huésped eucarióticas con un polinucleótido o vector de expresión, que resulta en células modificadas genéticamente o células transgénicas, se puede realizar mediante cualquier método bien conocido en la técnica y descrito, p. ej., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen transfección estable o transitoria, y electroporación. Además, véanse las patentes de EE.UU. Nºs. 5.464.764 y 5.487.992 para los métodos de selección positivos-negativos. Los métodos de transfección incluyen además, pero no se limitan a transfección mediada por liposomas, co-precipitación con fosfato de calcio, electroporación, policatión (tal como la transfección mediada con DEAE-dextrano), fusión de protoplastos, infecciones virales (incluidas infecciones virales recombinantes) y microinyección. Preferiblemente, la transfección es una transfección estable. Se favorece el método de transfección que proporciona una frecuencia de transfección óptima y la expresión de los genes heterólogos que codifican el péptido de interés descrito aquí en la línea y el tipo de célula huésped particular. Métodos adecuados pueden ser determinados por procedimientos de rutina. Para los transfectantes estables, las construcciones se integran en el genoma de la célula huésped o en un cromosoma/minicromosoma artificial o se ubican en forma episómica para que se mantengan de manera estable dentro de la célula huésped.

La práctica descrita aquí empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, biología molecular, cultivo celular, inmunología y similares que son de la experiencia en la técnica. Estas técnicas están completamente descritas en la bibliografía actual. Véase, p. ej., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987, actualizado); Brown ed., Essential Molecular Biology, IRL Press (1991); Goeddel ed., Gene Expression Technology, Academic Press (1991); Bothwell et al. eds., Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes, Bartlett Publ. (1990); Wu et al., Eds., Recombinant DNA Methodology, Academic Press (1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression, Stockton Press (1990); McPherson et al., PCR: A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press (1991); Gait ed., Oligonucleotide Synthesis (1984); Miller y Calos eds., Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (1987); Butler ed., Mammalian Cell Biotechnology (1991); Pollard et al., Eds., Animal Cell Culture, Human Press (1990); Freshney et al., Eds., Culture of Animal Cells, Alan R. Liss (1987); Studzinski, ed., Cell Growth and Apoptosis, A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press (1995); Melamed et al., Eds., Flow Cytometry and Sorting, Wiley-Liss (1990); Current Protocols in Cytometry, John Wiley & Sons, Inc. (actualizado); Wirth y Hauser, Genetic Engineering of Animals Cells, en: Biotechnology vol. 2, Pühler ed., VCH, Weinheim 663-744; the series Methods ofEnzymology (Academic Press, Inc.), y Harlow et al., eds., Antibodies: A Laboratory Manual (1987).

Un gen heterólogo de interés que codifica el Factor VII modificado por CTP puede introducirse en la célula descrita aquí mediante diversos métodos, por ejemplo, mediante transformación viral, transfección o microinyección. El gen heterólogo de interés puede introducirse en la célula como ADN lineal o como parte de un vector de expresión. Se conocen varios vectores de expresión eucarióticos que permiten múltiples sitios de clonación para la inserción de uno o más genes heterólogos y su expresión. Proveedores comerciales incluyen, entre otros, compañías tales como Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.; Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.; Promega, Madison, Wis., EE.UU. o BD Biosciences Clontech, Palo Alto, California, EE.UU.. La transfección de las células con un ADN o un vector de expresión que codifica uno o más genes de interés se realiza mediante métodos convencionales como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., 1989 o Ausubel et al., 1994. Los métodos de transfección incluyen, por ejemplo, transfección mediada por liposomas, co-precipitación con fosfato de calcio, electroporación, transfección mediada por policatión (p. ej., DEAE dextrano), fusión de protoplastos, microinyección e infecciones virales. Preferiblemente, se lleva a cabo la transfección estable ,en donde las moléculas de ADN están integradas en el genoma de la célula huésped o en un cromosoma/minicromosoma artificial, o están contenidas episomalmente de manera estable en la célula huésped. Se prefiere el método de transfección que proporciona la frecuencia de transfección óptima y la expresión de uno o más genes heterólogos de interés en la célula huésped en cuestión.

En algunas realizaciones, la introducción de ácido nucleico por infección vírica ofrece varias ventajas sobre otros métodos tales como lipofección y electroporación, ya que se puede obtener una mayor eficacia de transfección debido a la naturaleza infecciosa de los virus.

El gen heterólogo de interés generalmente está vinculado funcionalmente a un promotor que permite la transcripción del gen de interés, y a otros elementos reguladores que permiten la transcripción y traducción (expresión) del gen de interés o aumentan su eficiencia.

Un experto en la técnica apreciaría que el término "promotor" puede abarcar una secuencia de polinucleótidos que permite y controla la transcripción de los genes o secuencias funcionalmente vinculadas a ella. Un promotor contiene secuencias de reconocimiento para la unión de la ARN polimerasa y el sitio de inicio para la transcripción (sitio de inicio de la transcripción). Con el fin de expresar una secuencia deseada en un determinado tipo de célula o una célula huésped, debe elegirse un promotor funcional adecuado. El experto estará familiarizado con una variedad de promotores de diversas fuentes, incluyendo promotores constitutivos, inducibles y reprimibles. Se depositan en bancos de datos como GenBank, por ejemplo, y se pueden obtener como elementos separados o elementos clonados dentro de secuencias de polinucleótidos de fuentes comerciales o individuales. En promotores inducibles, la actividad del promotor puede reducirse o aumentarse en respuesta a una señal. Un ejemplo de un promotor inducible es el promotor de tetraciclina (tet). Éste contiene secuencias de operador de tetraciclina (tetO) que pueden ser inducidas por una proteína transactivadora regulada por tetraciclina (tTA). En presencia de tetraciclina, se inhibe la unión de tTA a tetO. Ejemplos de otros promotores inducibles son el promotor de jun, fos, metalotioneína y choque térmico (véase también Sambrook, J., Fritsch, EF y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Gossen, M. et al., Curr Opi Biotech 1994, 5, 516-520). De los promotores que son particularmente adecuados para alta expresión en eucariotas, hay, por ejemplo, la ubiquitina/S27, un promotor del hámster (documento WO 97/15664), el promotor temprano SV 40, el promotor tardío principal de adenovirus, el promotor de metalotioneína-1 del ratón, la región terminal larga y repetida del virus del sarcoma de Rous y el promotor temprano del citomegalovirus humano. Ejemplos de otros promotores heterólogos de mamíferos son la actina, la inmunoglobulina o los promotores de choque térmico.

Por ejemplo, el promotor puede estar enlazado funcionalmente a secuencias potenciadoras para aumentar la actividad transcripcional. Para esto, se pueden usar uno o más potenciadores y/o varias copias de una secuencia de potenciador, p. ej., un potenciador de CMV o SV40. Por ejemplo, el promotor puede estar unido funcionalmente a secuencias potenciadoras para aumentar la actividad transcripcional. Para esto, se pueden usar uno o más potenciadores y/o varias copias de una secuencia de potenciador, p. ej., un potenciador de CMV o SV40.

Un experto en la técnica apreciaría que el término potenciador puede abarcar una secuencia de polinucleótidos que en la ubicación cis actúa sobre la actividad de un promotor y, por lo tanto, estimula la transcripción de un gen conectado funcionalmente a este promotor. A diferencia de los promotores, el efecto de los potenciadores es independiente de la posición y la orientación y, por lo tanto, se pueden colocar delante o detrás de una unidad de transcripción, dentro de un intrón o incluso dentro de la región de codificación. El potenciador puede ubicarse tanto en la vecindad inmediata de la unidad de transcripción como a una distancia considerable del promotor. También es posible tener un solapamiento físico y funcional con el promotor. El experto en la técnica conocerá una serie de potenciadores de diversas fuentes (y se depositarán en bancos de datos como GenBank, p. ej., potenciadores de SV40, potenciadores de CMV, potenciadores de polioma, potenciadores de adenovirus) que están disponibles como elementos independientes o elementos clonados dentro de secuencias polinucleotídicas (p. ej., depositado en la ATCC o de fuentes comerciales e individuales). Una serie de secuencias promotoras también contienen secuencias potenciadoras, tales como el promotor de CMV usado frecuentemente. El potenciador CMV humano es uno de los potenciadores más fuertes identificados hasta ahora. Un ejemplo de un potenciador inducible es el potenciador de metalotioneína, que puede ser estimulado por glucocorticoides o metales pesados.

Básicamente, los elementos reguladores incluyen promotores, potenciadores, señales de terminación y poliadenilación y otros elementos de control de la expresión. Se conocen secuencias tanto inducibles como constitutivamente reguladoras para los diversos tipos de células. "Elementos reguladores de la transcripción" generalmente comprenden un promotor aguas arriba de la secuencia del gen a expresar, los sitios de iniciación y terminación de la transcripción y una señal de poliadenilación.

Un experto en la técnica apreciaría que la expresión "sitio de iniciación de la transcripción" puede abarcar un ácido nucleico en la construcción que corresponde al primer ácido nucleico que se incorpora en la transcripción primaria, es decir, el precursor de ARNm. El sitio de inicio de la transcripción puede solaparse con las secuencias promotoras.

Un experto en la técnica apreciaría que la expresión "sitio de terminación de la transcripción" puede abarcar una secuencia de nucleótidos que normalmente está en el extremo 3' del gen de interés o de la sección de genes que se ha de transcribir, y que produce la terminación de la transcripción por la ARN polimerasa.

Un experto en la técnica apreciaría que la expresión "señal de poliadenilación" puede abarcar una secuencia señal que provoca la escisión en un sitio específico en el extremo 3' del ARNm eucarióticoy la incorporación

postranscripcional de una secuencia de aproximadamente 100-200 nucleótidos adenina (cola poliA) en el extremo 3' escindido. La señal de poliadenilación comprende la secuencia AATAAA de aproximadamente 10-30 nucleótidos aguas arriba del sitio de escisión y una secuencia ubicada aguas abajo. Se conocen diversos elementos de poliadenilación, tales como tk poliA, SV40 tardío y temprano poliA o BGH poliA (descrito por ejemplo en la Patente de EE.UU. Nº 5.122.458).

"Elementos reguladores de la traducción" comprenden un sitio de inicio de la traducción (AUG), un codón de parada y una señal de poliA para cada uno de los polipéptidos a expresar. Para una expresión óptima puede ser aconsejable eliminar, agregar o cambiar las regiones no traducidas en 5' y/o 3' de la secuencia de ácido nucleico que se ha de expresar, para eliminar cualquier codón adicional de iniciación de la traducción potencialmente no adecuado u otras secuencias que podría afectar la expresión a nivel de transcripción o expresión. Con el fin de promover la expresión, los sitios de unión al consenso ribosomal pueden insertarse alternativamente inmediatamente aguas arriba del codón de inicio. Con el fin de producir un polipéptido secretado, el gen de interés contiene generalmente una secuencia de señal que codifica un péptido precursor de señal que transporta el polipéptido sintetizado a través de la membrana del ER (siglas inglesas del retículo endoplasmático). La secuencia de señal a menudo, pero no siempre, se localiza en el extremo amino de la proteína secretada y se escinde mediante peptidasas de señal después de que la proteína se haya filtrado a través de la membrana del ER. La secuencia del gen usualmente, pero no necesariamente, contendrá su propia secuencia de señal. Si la secuencia de señal nativa no está presente, se puede introducir una secuencia de señal heteróloga de manera conocida. El experto en la técnica conoce numerosas secuencias de señales de este tipo y las deposita en bancos de datos de secuencias tales como GenBank y EMBL.

Un experto en la técnica apreciaría que los términos "polipéptidos", "polipéptido" o equivalentes gramaticales de los mismos, se pueden usar indistintamente para abarcar secuencias de aminoácidos o proteínas y pueden abarcar polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Este término también incluye proteínas que han sido modificadas después de la traducción por reacciones tales como glicosilación, fosforilación, acetilación o procesamiento de proteínas. La estructura del polipéptido puede modificarse, por ejemplo, mediante sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y fusión con otras proteínas, al tiempo que conserva su actividad biológica.

Para producir uno o más productos génicos de interés en las células, las células pueden crecer en un medio de cultivo sin suero y en un cultivo en suspensión en condiciones que permitan la expresión del gen de interés. Si, por ejemplo, el gen de interés está bajo el control de un promotor constitutivo, no es necesario agregar inductores especiales. Si la expresión del gen de interés está bajo el control de un promotor inducible, por ejemplo, se debe agregar un inductor correspondiente al medio de cultivo celular en una concentración suficiente pero no tóxica. Las células pueden expandirse como se desee mediante subetapas múltiples y transferirse a recipientes de cultivo celular adecuados. El o los productos genéticos se produce o se producen como productos celulares, unidos a la membrana o secretores.

En una realización, una etapa de fabricación de un Factor VIIa modificado por CTP comprende transfectar de manera estable un número predeterminado de células con un vector de expresión que comprende una parte de codificación que codifica un Factor VII modificado por CTP. En otra realización, una etapa de fabricación del Factor VIIa modificado por CTP comprende transfectar de manera estable células con un vector de expresión que comprende una parte codificante que codifica dicho Factor VII modificado por CTP. En una realización, las células son células CHO. En otra realización, las células son células DG44. En otra realización, las células son cualquier célula conocida en la técnica adecuada para la expresión y secreción del Factor VII modificado por CTP. En una realización, el FVII modificado por CTP expresado es un zimógeno FVII-CTP3 que carece de un péptido señal. En otra realización, la secuencia de aminoácidos del FVII modificado por CTP expresada se establece en la SEQ ID NO: 7.

Un experto en la técnica apreciaría que mientras un FVII modificado por CTP puede expresarse como un zimógeno en un estado inactivo, el zimógeno puede activarse durante o después de un proceso de purificación. La expresión "FVII modificado por CTP" puede usarse indistintamente con "FVII/FVIIa modificado por CTP" y puede abarcar tanto las formas inactivas como las activas del polipéptido FVII modificado por CTP. De manera similar, los polipéptidos del Factor VII modificado por CTP individuales, por ejemplo, FVII/FVIIa-CTP3 también pueden usar la nomenclatura FVII/FVIIa para representar las formas inactivas o activas o ambas. En una realización, el polipéptido modificado por CTP que comprende un FVIIa-CTP_3 activado comprende una cadena ligera y una cadena pesada unidas por un enlace disulfuro.

En otra realización, las células transfectadas expresan el Factor VII modificado por CTP. En otra realización, la expresión del Factor VII modificado por CTP está en un alto nivel de expresión. En otra realización, dicho Factor VII/VIIa modificado por CTP está altamente glicosilado. En otra realización, dicho Factor VII/VIIa modificado por CTP está altamente siailado. En otra realización, dicho Factor VII/VIIa modificado por CTP tiene un alto contenido de O-glicano. En otra realización, dicho Factor VII/VIIa modificado por CTP tiene un alto contenido de N-glicano. En otra realización, dicho Factor VII/VIIa modificado por CTP tiene un alto contenido de N-glicano cargado. En otra realización, dicho Factor VII/VIIa modificado por CTP tiene un alto porcentaje de ácido carboxi-glutámico. Como se describe aquí en detalle, el Factor VIIa modificado por CTP puede tener diferentes contenidos y patrones de

glicosilación. Un Factor VIIa modificado por CTP fabricado por los métodos descritos aquí puede incluir cualquiera de los patrones y contenido de glicosilación como se describe aquí. En general, el método de fabricación presentado aquí proporciona un Factor VIIa modificado por CTP que tiene un alto contenido de glicosilación y un alto porcentaje de sitios de glicosilación glicosilados.

En otra realización, dicho alto contenido de O-glicano en el Factor VII/VIIa modificado por CTP es de al menos 10 mol/mol. En otra realización, dicho alto contenido en O-glicano del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos 12 mol/mol. En otra realización, dicho alto contenido de O-glicano en el Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos 14 mol/mol. En otra realización, dicho alto contenido de O-glicano del Factor VII/VIIa modificado por CTP es de al menos 16 mol/mol.

En una realización, el alto nivel o contenido de O-glicano es impulsado por el proceso aguas arriba en el procedimiento de fabricación descrito aquí. En otra realización, el alto nivel o contenido de O-glicano es impulsado por el clon en el procedimiento de fabricación descrito aquí. En otra realización, el alto contenido o niveles de O-glicano se mantienen hasta que se obtiene la sustancia farmacológica final.

En otra realización, el Factor modificado por CTP VII/VIIa tiene un alto contenido de ácido sicalico. En otra realización, dicho alto contenido en ácido siálico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos 15 mol/mol. En otra realización, dicho alto contenido de ácido siálico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es de al menos 17 mol/mol. En otra realización, dicho alto contenido en ácido siálico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos 18 mol/mol. En otra realización, dicho alto contenido en ácido siálico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos 20 mol/mol. En otra realización, dicho alto contenido de ácido siálico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos 22 mol/mol. En otra realización, dicho alto contenido de ácido siálico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos 25 mol/mol. En otra realización, dicho alto contenido de ácido siálico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos 27 mol/mol. En otra realización, dicho alto contenido de ácido siálico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos 30 mol/mol.

En otra realización, dicho alto porcentaje de ácido carboxi-glutámico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos el 90%. En otra realización, dicho alto porcentaje de ácido carboxi-glutámico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos el 91%. En otra realización, dicho alto porcentaje de ácido carboxi-glutámico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos el 92%. En otra realización, dicho alto porcentaje de ácido carboxi-glutámico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos el 93%. En otra realización, dicho alto porcentaje de ácido carboxi-glutámico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos el 94%. En otra realización, dicho alto porcentaje de ácido carboxi-glutámico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos el 95%. En otra realización, dicho alto porcentaje de ácido carboxi-glutámico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es de al menos el 96%. En otra realización, dicho alto porcentaje de ácido carboxi-glutámico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es de al menos el 97%. En otra realización, dicho alto porcentaje de ácido carboxi-glutámico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos el 98%. En otra realización, dicho alto porcentaje de ácido carboxil glutámico del Factor VII/VIIa modificado por CTP es al menos el 99%. Un experto en la técnica apreciaría que el porcentaje de residuo de ácido carboxi-glutámico puede expresarse inversamente como el% de residuo de ácido carboxi-glutámico sin dominio (sin dominio Gla), en donde, por ejemplo, si un alto porcentaje de Gla es 40%, entonces sin dominio Gla es 60%.

En una realización, una etapa de fabricación de un Factor VIIa modificado por CTP comprende obtener clones celulares que sobre-expresan el Factor VII modificado por CTP. En otra realización, la expresión del Factor VII modificado por CTP es óptima. En otra realización, el nivel de expresión está entre 30-1500 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 30 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 40 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 50 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 60 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 70 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión está entre 50-70 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 200 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 300 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 400 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 500 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 600 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 700 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 800 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 900 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 1000 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 1100 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 1200 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es al menos 1300 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es al menos 1400 mg/L. En otra realización, el nivel de expresión es de al menos 1500 mg/L. En otra realización, los clones se propagan en medio para formar un banco de células maestras (MCB) y un banco de células de trabajo (WCB). En una realización, los clones en la etapa (c) se obtienen de un MCB. En otra realización, los clones se obtienen de un WCB.

El FVII modificado por CTP se obtiene a partir del medio de cultivo celular como un producto génico secretado. Sin embargo, si una proteína o un polipéptido se expresa sin una señal de secreción, el producto génico también puede aislarse de los lisados celulares. Para obtener un producto homogéneo puro que esté sustancialmente libre de otras proteínas recombinantes y proteínas de la célula huésped, se llevan a cabo procedimientos de purificación convencionales. En primer lugar, las células y los residuos celulares se eliminan con frecuencia del medio de cultivo

o lisado. El producto génico deseado puede entonces liberarse de proteínas, polipéptidos y ácidos nucleicos solubles contaminantes, p. ej., por fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad e intercambio iónico, columnas de afinidad, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa o cromatografía en Sephadex, hidroxiapatito, sílice o resinas de intercambio catiónico tales como DEAE. Metodologías generales conocidas en la técnica y que dan como resultado la purificación de una proteína heteróloga expresada por células huésped recombinantes son conocidas por el experto y se describen en la bibliografía, por ejemplo, por Harris et al. (Harris et al., Protein Purification: A Practical Approach, Pickwood and Hames, eds., IRL Press, Oxford, 1995) y Scopes (Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, 1988). Estos métodos pueden emplearse en su totalidad o en parte en los métodos descritos aquí.

En otra realización, aquí se describe un método para preparar FVII modificado por CTP en células de mamífero en condiciones sin suero, caracterizado porque (i) células de mamíferos contienen un gen que codifica para el FVII modificado por CTP; (ii) las células de mamíferos se cultivan en condiciones sin suero que permiten la replicación de las células de mamíferos; (iii) en cada caso, al menos una (1) de estas células de mamífero se depositan en un recipiente de cultivo celular en condiciones sin suero; (iv) las células de mamífero depositadas adecuadamente se replican en condiciones sin suero; (v) las células replicadas se cultivan en condiciones sin suero en las que se expresa el FVII modificado por CTP; y (vi) el producto FVII modificado por CTP se aísla luego de las células o sobrenadante de cultivo y se purifica y activa. En otra realización de este procedimiento, la célula de mamífero es una célula de mamífero transfectada en donde se ha introducido el gen para FVII modificado por CTP. Por consiguiente, los métodos descritos aquí también se refieren a un método para preparar productos génicos recombinantes, caracterizado porque antes de la etapa (i) del procedimiento descrito anteriormente, las células de mamífero se transfectan con un ácido nucleico que al menos codifica un FVII modificado por CTP. Se prefiere la transfección estable de la célula de mamífero correspondiente.

Ejemplos de medios sin suero, sin proteínas o químicamente definidos incluyen, por ejemplo, los medios comercialmente obtenibles Ham's F12 (Sigma, Deisenhofen, DE), RPMI 1640 (Sigma), medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma), medio esencial mínimo (MEM; Sigma), medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM; Sigma), CDCHO (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.), CHO-S-SFMII (Invitrogen), medio CHO sin suero (Sigma), medio CD-PowerCHO2 (Lonza) y medio CHO sin proteínas (Sigma). Cada uno de estos medios puede, si se desea, complementarse con diversos compuestos, tales como hormonas y/u otros factores de crecimiento (p. ej., insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina), sales (p. ej., cloruro de sodio, calcio, magnesio, fosfato), tampones (p. ej., HEPES), nucleósidos (p. ej., adenosina, timidina), glutamina, glucosa u otros nutrientes equivalentes, antibióticos y/u oligoelementos o piensos disponibles comercialmente tales como Power Feed A (Lonza). Si las células replicables son células recombinantes que expresan, también se pueden agregar al medio uno o más marcadores seleccionables, uno o más agentes de selección adecuados tales como antibióticos.

Se apreciará que, aparte de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica el polipéptido), la construcción de expresión descrita aquí también puede incluir secuencias diseñadas para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad del polipéptido expresado. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el FVII modificado por CTP se recoge en la SEQ ID NO: 4.

En algunas realizaciones, las células transformadas se cultivan en condiciones efectivas, que permiten la expresión de altas cantidades de polipéptido recombinante. En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo efectivas incluyen, pero no se limitan a medios efectivos, biorreactor, temperatura, pH y condiciones de oxígeno que permiten la producción de proteínas. Un experto en la técnica apreciaría que la expresión "un medio efectivo" puede abarcar cualquier medio en donde se cultive una célula para producir el polipéptido recombinante descrito aquí. En algunas realizaciones, un medio incluye típicamente una solución acuosa que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables, y sales apropiadas, minerales, metales y otros nutrientes, como vitaminas. En algunas realizaciones, las células descritas aquí pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto ordinario en la técnica.

En una realización, las condiciones de cultivo comprendían un contenido de oxígeno disuelto (DO) de aproximadamente 20-80%. En otra realización, el contenido de DO está en aproximadamente 20-30%. En otra realización, el contenido de DO está en aproximadamente 30-40%. En otra realización, el contenido de DO está en aproximadamente 40-50%. En otra realización, el contenido de DO está en aproximadamente 50-60%. En otra realización, el contenido de DO está en aproximadamente 60-70%. En otra realización, el contenido de DO está en aproximadamente 70-80%.

En una realización, las condiciones de cultivo comprenden un pH que comienza a una temperatura y cambia a otra durante la fabricación. En otra realización, el pH comienza a aproximadamente 7.3 y se desplaza a aproximadamente 6.7 durante la incubación del biorreactor. En otra realización, el pH comienza a aproximadamente 7.3, aproximadamente 7.2 o aproximadamente 7.1 y se desplaza a aproximadamente 6.7,

aproximadamente 6.8, aproximadamente 6.9 o aproximadamente 7.0 durante la incubación con biorreactor.

En algunas realizaciones, dependiendo del vector y del sistema huésped utilizado para la producción, los polipéptidos resultantes descritos aquí permanecen dentro de la célula recombinante, o se secretan en el medio.

En una realización, después de un tiempo de cultivo predeterminado, se efectúa la recuperación del polipéptido recombinante.

Un experto en la técnica apreciaría que la expresión "recuperar el polipéptido recombinante" utilizada aquí puede abarcar la recogida de todo el medio que contiene el polipéptido y puede implicar etapas adicionales de separación o purificación.

En una realización, los polipéptidos descritos aquí se purifican usando una variedad de técnicas de purificación de proteínas estándares, tal como, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de concanavalina A, cromatografía de hidroxiapatito, cromatoenfoque y solubilización diferencial.

En una realización, cada columna se puede ejecutar a temperatura controlada o no controlada.

En una realización, para facilitar la recuperación, la secuencia de codificación expresada puede modificarse por ingeniería genética para codificar el polipéptido descrito aquí y fusionarse a un resto escindible. En una realización, una proteína de fusión puede modificarse por ingeniería genética de modo que el polipéptido pueda aislarse fácilmente mediante cromatografía de afinidad; p. ej., mediante inmovilización en una columna específica para el resto escindible. En una realización, un sitio de escisión se modifica por ingeniería genética entre el polipéptido y el radical escindible y el polipéptido se puede liberar de la columna cromatográfica por tratamiento con una enzima o agente apropiado que escinde específicamente la proteína de fusión en este sitio [p. ej., véase Booth *et al.*, Immunol. Lett. 19: 65-70 (1988); y Gardella *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 15854-15859 (1990)].

En una realización, el polipéptido descrito aquí se recupera en forma "sustancialmente pura". Un experto en la técnica apreciaría que la expresión "sustancialmente pura" puede abarcar una pureza que permita el uso efectivo de la proteína en las aplicaciones descritas aquí. En aún otra realización, un polipéptido de FVII modificado por CTP descrito aquí puede comprender una forma sustancialmente pura y activa del polipéptido.

En otra realización, el porcentaje de oxidación de un FVII/FVIIa modificado por CTP descrito aquí es inferior al 5% oxidado. En otra realización, el porcentaje de oxidación de un FVII/FVIIa modificado por CTP descrito aquí es inferior al 4% oxidado. En otra realización, el porcentaje de oxidación de un FVII/FVIIa modificado por CTP descrito aquí es inferior al 3% oxidado.

En una realización, la reducción en las formas oxidadas y el control sobre el nivel de las formas oxidadas se realiza a lo largo de todo el proceso de fabricación, desde la sustancia aguas arriba hasta la sustancia final.

En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es de al menos el 40%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos 50%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 60%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 70%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 75%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 80%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 85%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 90%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 91%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 92%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 93%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 94%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 95%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 96%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 97%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos 98%. En otra realización, la pureza de dicho polipéptido FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos el 99%. En una realización adicional, el porcentaje de pureza se selecciona del grupo que consiste en 97.3%, 97.6%, 97.4% y 97.0%.

En una realización, el polipéptido FVII modificado por CTP descrito aquí se sintetiza usando sistemas de expresión *in vitro*. En una realización, los métodos de síntesis *in vitro* son bien conocidos en la técnica y los componentes del

sistema están disponibles comercialmente.

En una realización, se realiza la producción de un Factor VIIa modificado por CTP usando tecnología de ADN recombinante.

En algunas realizaciones, los polipéptidos recombinantes se sintetizan y se purifican; su eficacia terapéutica se puede analizar *in vivo* o *in vitro*. En una realización, las actividades de unión del Factor VII/VIIa recombinante modificado por CTPs descritos aquí pueden determinarse utilizando diversos ensayos.

En una realización, un método para fabricar Factor VIIa modificado por CTP comprende una etapa para obtener clones que expresan de manera óptima dicho Factor VII modificado por CTP a partir de dicho WCB, y expandir dichos clones. En otra realización, un método para fabricar Factor VIIa modificado por CTP comprende una etapa para obtener clones que expresan de manera óptima dicho Factor VII modificado por CTP a partir de dicho MCB, y expandir dichos clones. En otra realización, los clones celulares se expanden en solución a través de una serie de etapas de subcultivo hasta el nivel de biorreactor de producción. En otra realización, la solución que contiene dichos clones subcultivados se siembra en un biorreactor. En otra realización, el biorreactor es un biorreactor desechable. En otra realización, el biorreactor comprende un biorreactor de acero inoxidable, un biorreactor de movimiento oscilante tal como el sistema Wave de GE, un biorreactor de perfusión, o cualquier otro sistema de biorreactor conocido en la técnica. En una realización, la eliminación de células de un biorreactor se realiza mediante el uso de un sistema de filtro desechable. Si se realiza una fabricación a gran escala, se puede usar la centrifugación continua antes del uso de un sistema de filtrado.

En una realización, los clones celulares se expanden más o se amplían mediante el cultivo en serie de dichas células en tamaños crecientes del biorreactor hasta que se alcanza la escala deseada. En otra realización, un biorreactor se ejecuta en un modo de alimentación por lotes. En otra realización, un biorreactor se ejecuta en un modo por lotes. En otra realización, un biorreactor se ejecuta en un modo de lote repetido. En otra realización, un biorreactor se ejecuta en un modo de perfusión.

Las densidades celulares viables máximas difieren dependiendo del tipo de biorreactor empleado. En una realización, la densidad celular viable máxima de un biorreactor utilizado en los métodos de fabricación descritos aquí es de aproximadamente $0.2 \times 10^6 – 1.4 \times 10^6$ células/ml. En otra realización, la densidad celular viable máxima de un biorreactor utilizado en los métodos de fabricación descritos aquí es de aproximadamente $0.05 \times 10^6 – 100 \times 10^6$. En otra realización, la densidad celular viable máxima de un biorreactor es de aproximadamente $0.05 \times 10^6 – 0.5 \times 10^6$ En otra realización, la densidad celular viable máxima de un biorreactor es aproximadamente $0.5 \times 10^6 – 5 \times 10^6$. En otra realización, la densidad celular viable máxima de un biorreactor es aproximadamente $5.0 \times 10^6 – 50 \times 10^6$. En otra realización, la densidad celular viable máxima de un biorreactor es de aproximadamente $50 \times 10^6 -100 \times 10^6$.

Los esquemas de alimentación para el uso de biorreactores podrían ser diferentes, p. ej., la alimentación diaria repetida de un día determinado, o fijada en varios días, además, el% de alimento agregado podría ser diferente de un poco de un 50% a incluso 50% o más.

Se puede añadir DMSO a un biorreactor a diferentes concentraciones como se conoce en la técnica. En una realización, se añade 0.1-3% de DMSO a un biorreactor durante su uso. En otra realización, se añade 0.1-0.5% de DMSO. En otra realización, se añade 0.5-1.0% de DMSO. En otra realización, se añade 1.0-1.5% de DMSO. En otra realización, se añade 1.5-2.0% de DMSO. En otra realización, se añade 2.0-2.5% de DMSO. En otra realización, se añade 2.5-3.0% de DMSO.

En una realización, un método para fabricar un Factor VIIa modificado por CTP comprende la etapa de purificar y activar una solución de recolección clarificada para obtener una solución de FVII modificada por CTP activa purificada. En otra realización, una solución proteica purificada, fabricada usando los métodos presentados aquí, comprende al menos 5-95% del Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, una solución proteica purificada, fabricada usando los métodos presentados aquí, comprende al menos 5% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, una solución proteica purificada fabricada utilizando los métodos presentados aquí, comprende al menos un 10% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, una solución proteica purificada fabricada usando los métodos presentados aquí, comprende al menos 20% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, una solución proteica purificada fabricada usando los métodos presentados aquí, comprende al menos 30% de Factor VII/VIIa modificado por CTP, comprende al menos 40% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, una solución de proteína purificada comprende al menos 50% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, una solución de proteína purificada comprende al menos 60% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, una solución de proteína purificada comprende al menos 70% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, una solución de proteína purificada comprende al menos 80% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, una solución de proteína purificada comprende al menos 90% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, una solución proteica purificada fabricada utilizando los métodos presentados aquí, comprende al menos 95% de Factor VII/VIIa modificado por CTP.

En una realización, una recolección clarificada se mantiene hasta 24 horas a 2-25 ºC. En otra realización, la recolección clarificada se almacena al menos a 5 ºC durante hasta un mes.

En una realización, la recolección clarificada obtenida en la etapa se analiza para determinar la carga biológica, la endotoxina bacteriana, el contenido de proteína específica, el ADN residual, los virus, las partículas similares a virus y/o Micoplasma, o cualquier combinación de los mismos.

En una realización, la purificación de la recolección clarificada se realiza realizando secuencialmente las etapas que comprenden: (g) concentrar, diafiltrar y purificar dicha solución de recolección clarificada, en donde dicha concentración, diafiltración y purificación se realiza mediante casete de fibra hueca o el casete de flujo tangencial pasa secuencialmente dicha solución de recolección clarificada a través de una columna de intercambio aniónico y una columna de interacción hidrófoba; (h) obtener dicha recolección clarificada obtenida en el siguiente etapa; (i) e inactivando los virus presentes en dicha recolección clarificada incubando en una solución tóxica para dichos virus; (j) obtener dicha solución de recolección clarificada de (h) y concentrar, diafiltrar y purificar dicha solución de recolección clarificada, en donde dicha concentración, diafiltración, activación y purificación es seguida por hacer pasar dicha solución de recolección clarificada a través de una columna de afinidad, una columna de modo multimodal o mixto, una columna de interacción hidrófoba (HIC) y una columna de intercambio aniónico; (j) obtener dicha solución de recolección clarificada después de la etapa (i) y eliminar físicamente dicha solución de recolección clarificada de virus mediante nanofiltración; (k) obtener dicha solución de recolección clarificada después de la etapa la etapa (j) y concentrar, diafiltrar y purificar dicha solución de recolección clarificada para llegar a una recolección clarificada purificada al máximo que contiene dicha forma altamente glicosilada de FVII/FVIIa modificada por CTP.

En una realización, el FVII modificado por CTP se activa durante la purificación. En una realización alternativa, el FVII modificado por CTP se activa después de la purificación. En otra realización, el FVII modificado por CTP se activa al mismo tiempo que cualquier etapa de purificación.

En una realización, la ultrafiltración y diafiltración para concentrar y filtrar una recolección clarificada se puede realizar utilizando un cartucho de fibra hueca, o una etapa UFDF basada en TFF equivalente. El tamaño de corte del peso molecular nominal del cartucho es de 10000 kDa. En otra realización, un cartucho de membrana podría cumplir las membranas PES/PS/RC con un corte de 3 kDa a 30 kDa. En otra realización, la etapa de UFDF se puede realizar entre las etapas de cromatografía. En otra realización, la etapa de UFDF se puede realizar antes del uso de la columna de intercambio aniónico. En otra realización, la etapa de UFDF se puede realizar antes del uso de la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). En otra realización, la etapa de UFDF se puede realizar después del uso de la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). En otra realización más, la UFDF se puede realizar en múltiples etapas, por ejemplo, la UFDF se puede realizar después de la recolección, entre las etapas cromatográficos, o como una etapa posterior a la eliminación viral mediante nanofiltración, o cualquier combinación de las mismas.

En otra realización, la columna de intercambio aniónico es una columna de flujo rápido de DEAE-Sepharose. En otra realización, la columna DEAE purifica la forma altamente glicosilada de dicho Factor VII/VIIa modificado por CTP. En una realización, cuanto mayor sea la glicosilación, mejor será la farmacodinámica del Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, una columna de intercambio aniónico puede comprender otras columnas de intercambio aniónico conocidas en la técnica, por ejemplo una columna de intercambio aniónico Capto DEAE u otras resinas tales como Eshmuno Q.

En una realización, la columna hidrófoba es una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de fenilo. El número de ciclos de uso de HIC de fenilo puede oscilar entre aproximadamente 1-10. En una realización, se realizan 1-3 ciclos. En otra realización, se realizan 1-5 ciclos. En otra realización, se realizan 1-6 ciclos. En otra realización, se realizan 1-7 ciclos. En otra realización, se realizan 1-8 ciclos. En otra realización, se realizan 1-9 ciclos. En otra realización, se realizan 1-10 ciclos. En otra realización, tampones conocidos en la técnica se usan para el lavado y la elución. En una realización, un tampón de elución comprende sulfato de amonio con propilenglicol. En una realización, un tampón de elución comprende sulfato de amonio con etilenglicol.

En una realización, una columna de modo mixto de hidroxiapatito comprende una columna de modo mixto de hidroxiapatito cerámico (CHT). El número de ciclos de uso de CHT puede oscilar entre aproximadamente 1-10. En una realización, se realizan 1-3 ciclos. En otra realización, se realizan 1-5 ciclos. En otra realización, se realizan 1-6 ciclos. En otra realización, se realizan 1-7 ciclos. En otra realización, se realizan 1-8 ciclos. En otra realización, se realizan 1-9 ciclos. En otra realización, se realizan 1-10 ciclos. La elución de una columna CHT se puede realizar con aproximadamente entre 3-10 volúmenes de columna (CV). En una realización, la elución se realiza con aproximadamente 3 CV. En otra realización, la elución se realiza con aproximadamente 4 CV. En otra realización, la elución se realiza con aproximadamente 5 CV. En otra realización, la elución se realiza con aproximadamente 6 CV. En otra realización, la elución se realiza con aproximadamente 7 CV. En otra realización, la elución se realiza con aproximadamente 8 CV. En otra realización, la elución se realiza con aproximadamente 9 CV. En otra realización, la elución se realiza con aproximadamente 10 CV.

En una realización, los virus que podrían estar presentes en la recolección clarificada debido a la contaminación se inactivan en la recolección clarificada. En otra realización, los virus se inactivan utilizando una solución de Triton-X 100 al 1%. En otra realización, los virus se inactivan utilizando una solución de Triton-X 100 de 0.2 al 2%. En otra realización, los virus se inactivan utilizando una solución de Triton-X 100 al 0.5%. En otra realización, los virus se inactivan utilizando una solución de Triton-X 100 al 1-4%. En otra realización, los virus se inactivan utilizando una solución de Triton-X 100 al 0.2-0.5%. En otra realización, los virus se inactivan utilizando una solución de Triton-X 100 al 0.5-1.0%. En otra realización, los virus se inactivan utilizando una solución de Triton-X 100 al 2%. En otra realización, los virus se inactivan utilizando una solución de Triton-X 100 al 3%. En otra realización, los virus se inactivan utilizando una solución de Triton-X 100 al 4%. En otra realización, los virus se inactivan utilizando una solución de Triton-X 100 al 5-10%. En otra realización, la inactivación viral en una solución de Triton-X 100 es de aproximadamente 0.5 a 24 horas. En otra realización, la inactivación viral en una solución de Triton-X es de aproximadamente 0.5 a 1 hora. En otra realización, la inactivación viral en una solución de Triton-X es de aproximadamente 1 a 2 horas. En otra realización, la inactivación viral en una solución de Triton-X es de aproximadamente 2 a 3 horas. En otra realización, la inactivación viral en una solución de Triton-X es de aproximadamente 3 a 4 horas. En otra realización, la inactivación viral en una solución de Triton-X es de aproximadamente 4 a 6 horas. En otra realización, la inactivación viral en una solución de Triton-X es de aproximadamente 6 a 8 horas. En otra realización, la inactivación viral en una solución de Triton-X es de aproximadamente 8 a 10 horas. En otra realización, la inactivación viral en una solución de Triton-X es de aproximadamente 10 a 12 horas. En otra realización, la inactivación viral en una solución de Triton-X es de aproximadamente 12 a 24 horas.

El experto en la técnica apreciará que otras concentraciones u otras soluciones disponibles en la técnica y que son tóxicas para estos virus, que incluyen pero no se limitan a colato de sodio y Tween 80, se pueden usar en los métodos descritos aquí. En otra realización, se usa una mezcla de fosfato de Tri-n-butilo (TNBP) y polisorbato 80 (Tween 80) para inactivar el virus en la etapa (h).

En una realización, los virus se eliminan físicamente mediante el uso de nanofiltración. El experto en la técnica apreciará que cualquier filtro conocido en la técnica para eliminar virus puede aplicarse en los métodos descritos aquí. En otra realización, la nanofiltración se realiza utilizando un cartucho de filtro tipo Planova o Planova (1-60 mm^2). Dichos métodos son seguidos por la confirmación del aclaramiento viral de la recolección clarificada utilizando métodos conocidos en la técnica.

En una realización, los métodos descritos aquí alcanzan al menos una tasa de recuperación del 20% de Factor VII/VIIa modificado por CTP altamente glicosilado. En otra realización, los métodos alcanzan una tasa de recuperación de al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, al menos 99.9% de tasa de recuperación del Factor VII/VIIa modificado por CTP altamente glicosilado.

En una realización, después de la purificación del Factor VII/VIIa modificado por CTP altamente glicosilado, los métodos descritos aquí comprenden además caracterizar dicho polipéptido modificado por CTP. En otra realización, se determina la pureza del Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, se determina el contenido de glicosilación. En otra realización, se determina la ocupación del sitio de glicosilación. En una realización, la pureza, el contenido de glicosilación y la ocupación del sitio de glicosilación se determinan en el Factor VII/VIIa modificado por CTP fabricado.

En otra realización, los clones celulares utilizados en los métodos descritos aquí se almacenan en un banco de células congeladas. En otra realización, los clones celulares se almacenan en un banco de células liofilizadas.

En otra realización, el banco de células de los métodos y composiciones descritos aquí es un banco de células maestro. En otra realización, el banco de células es un banco de células en funcionamiento. En otra realización, el banco de células es un banco de células de buenas prácticas de fabricación (GMP). En otra realización, el banco de células está destinado a la producción de material de calidad clínica. En otra realización, el banco de células se ajusta a las prácticas de regulación para uso humano. En otra realización, el banco de células es cualquier otro tipo de banco de células conocido en la técnica.

Las "Buenas Prácticas de Fabricación" se definen, en otra realización, por (21 CFR 210-211) del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos. En otra realización, las "Buenas Prácticas de Fabricación" están definidas por otras Normas para la producción de material de calidad clínica o para consumo humano; por ejemplo, normas de un país distinto de los Estados Unidos.

En otra realización, el medio utilizado para propagar células contiene metotrexato (MXT). En otra realización, el medio es un medio libre de metotrexato. En otra realización, la concentración de MXT presente en un medio está entre aproximadamente 0.1-2 uM. En otra realización, la concentración de MXT presente en el medio es de aproximadamente 0.1-0.5 uM. En otra realización, la concentración de MXT presente en el medio es de

aproximadamente 0.5-1.0 uM. En otra realización, la concentración de MXT presente en el medio es de aproximadamente 1.0-1.5 uM. En otra realización, la concentración de MXT presente en el medio es de aproximadamente 1.5-2.0 uM. Se apreciará bien que el extremo "medio" puede abarcar un líquido o gel o polvo que sea adecuado para el crecimiento o cultivo de las células que comprenden el Factor VII modificado por CTP descrito aquí. Dicho medio puede denominarse alternativamente "medio de crecimiento" o "medio de cultivo" y puede incluir, pero no limitarse a medios nutritivos, medios enriquecidos, medios mínimos, medios diferenciales, medios de transporte o medios selectivos. En un aspecto adicional, el medio selectivo puede ser adecuado para seleccionar un grupo particular de células durante el proceso de fabricación.

En una realización, la solución de proteína purificada contiene al menos 5-95% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución de proteína purificada contiene al menos 5% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución de proteína purificada contiene al menos 10% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución de proteína purificada contiene al menos 15% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, una solución de proteína purificada contiene al menos 20% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución de proteína purificada contiene al menos 30% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución de proteína purificada contiene al menos 40% de Factor VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución de proteína purificada contiene al menos 50% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución de proteína purificada contiene al menos 60% de Factor VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución de proteína purificada contiene al menos 70% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución de proteína purificada contiene al menos 80% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución purificada contiene al menos 90-95% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución purificada contiene 95.1-99.9% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución purificada contiene 100% de Factor VII/VIIa modificado por CTP.

En una realización, un factor de coagulación modificado por CTP fabricado comprende un alto% de gamma-carboxilación. Un experto en la técnica apreciaría que el porcentaje (%) de gamma- carboxilación de un factor de coagulación puede tener una relación directa con la potencia del factor de coagulación modificado por CTP. En una realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos 90% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos 92% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos 93% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos el 94% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos el 95% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos el 96% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos 97% de gamma carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos 98% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos 99% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende 100% de gamma-carboxilación.

En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre 90-92% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre 90-95% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa CTP3 comprende entre 95-97% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre 95-100% de gamma-carboxilación.

En una realización, la eliminación del carboxilado bajo en gamma se realiza en la etapa de cromatografía de modo mixto o multimodal del procedimiento de fabricación descrito aquí (consulte la etapa 9, Figura 17).

En una realización, el Factor VII/VIIa modificado por CTP fabricado está altamente glicosilado. El experto en la técnica apreciará que la expresión "altamente glicosilado", cuando se refiere a un Factor VII/VIIa modificado por CTP, puede abarcar un nivel de glicosilación de aproximadamente el 70-80% del polipéptido total del Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, el Factor VII/VIIa modificado por CTP altamente glicosilado tiene un nivel de glicosilación de al menos 70%. En otra realización, el Factor VII/VIIIa modificado por CTP altamente glicosilado tiene un nivel de glicosilación de al menos 80%. En otra realización, el extremo puede abarcar un nivel de glicosilación de aproximadamente 81-90% del polipéptido Factor VII/VIIa total modificado por CTP. En otra realización, el Factor VII/VIIa modificado por CTP altamente glicosilado tiene un nivel de glicosilación de al menosl 90%. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de glicosilación de aproximadamente el 91-95% del polipéptido del Factor VIIa modificado por CTP total. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de glicosilación de aproximadamente el 95.1-99% del polipéptido Factor VII/VIIa modificado por CTP total. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de glicosilación del 100% del polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP total. Polipéptidos del Factor VII/VIIa modificados por CTP altamente glicosilados pueden tener propiedades beneficiosas en los métodos de uso para un Factor VII/VIIa de acción prolongada, que respalda una frecuencia de administración reducida. Los altos niveles de glicosilación contribuyen al aumento significativo del volumen hidrodinámico de un Factor VII/VIIa modificado por CTP, por ejemplo, un Factor VIIa modificado por CTP, en comparación con el Factor VII/VIIa recombinante. Esto puede resultar en un tiempo de circulación prolongado

del Factor VIIa modificado por CTP.

En una realización, el número de O-glicanos por cada CTP es al menos 4-6. En otra realización, el número de O-glicanos por cada CTP está entre 4-6. En otra realización, el número de O-glicanos por cada CTP es al menos 4-8. En otra realización, el número de O-glicanos por cada CTP está entre 4-8. En una realización, el número de O-glicanos por cada CTP es al menos 6-8. En una realización, el número de O-glicanos por cada CTP está entre 6-8. En otra realización, el número de O-glicanos por cada CTP es al menos 4. En otra realización, el número de O-glicanos por cada CTP es al menos 5. En otra realización, el número de O-glicanos por cada CTP es al menos 6. En otra realización, el número de O-glicanos por cada CTP es al menos 7. En otra realización, el número de O-glicanos por cada CTP es 8.

En una realización, el número de O-glicanos por cada polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene tres unidades de CTP unidas es de al menos 12-18. En otra realización, el número de O-glicanos por cada polipéptido de Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene tres unidades de CTP unidas es al menos 18-24. En otra realización, el número de O-glicanos por cada polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene tres unidades de CTP unidas es al menos 12-24.

En una realización, la ocupación de O-glicano por cada CTP es al menos del 70%. En otra realización, la ocupación de O-glicano por cada CTP es de al menos el 80%. En otra realización, la ocupación de O-glicano por cada CTP es de al menos el 90%. En otra realización, la ocupación de O-glicano por cada CTP es del 100%.

En una realización, se carga un alto porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 60%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 70%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 80%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 85%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 90%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 95%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende el 100%.

En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 60%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 70%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 80%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 85%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 90%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 95%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 100%.

En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP comprende entre aproximadamente el 60% y el 70%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificados por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente el 50% y el 80%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente el 70% y el 80%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente el 55% y el 85%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente el 80% y el 85%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente el 60% y el 90%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente el 85% y el 90%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente el 65% y el 95%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente el 90% y el 95%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por cada FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente el 95% y el 100%.

En una realización, el alto nivel de N-glicanos que se cargan es impulsado por el proceso aguas arriba en el procedimiento de fabricación descrito aquí. En otra realización, más del 60% de los N-glicanos cargados se alcanza en la etapa DSP temprana y este nivel se mantiene hasta que se obtiene la sustancia farmacológica final.

En una realización, el alto nivel de N-glicanos que se cargan es impulsado por el proceso aguas arriba en el procedimiento de fabricación descrito aquí. En otra realización, más del 60% de los N-glicanos cargados se alcanza en la etapa DSP temprana y este nivel se mantiene hasta que se obtiene la sustancia farmacológica final.

En una realización, el Factor VII/VIIa modificado por CTP está altamente sialilado. El experto en la técnica apreciará

que la expresión "altamente sialilado", cuando se refiere a un Factor VII/VIIa modificado por CTP, puede abarcar un nivel de sialilación de aproximadamente el 70-80% del polipéptido del Factor VIIa modificado por CTP total. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de sialilación de aproximadamente 80-90% del polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP total. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de sialilación de aproximadamente el 90-95% del polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP total. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de sialilación de aproximadamente el 95.1-99% del polipéptido Factor VII/VIIa modificado por CTP total. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de sialilación del 100% del polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP total. En otra realización, una estructura de O-glicano en un Factor VIIa modificado por CTP comprende un núcleo mono-sialilado.

En una realización, el alto porcentaje de sialilación y el contenido de glicano O-enlazado de un FVII/FVIIa modificado por CTP descrito aquí, aumenta la potencia del FVII/FVIIa modificado por CTP. En otra realización, el alto porcentaje de sialilación y el contenido de glicano O-enlazado de un FVII/FVIIa modificado por CTP aumenta el volumen hidrodinámico del FVII/FVIIa modificado por CTP.

En otra realización, el FVII/FVIIa modificado por CTP es polipéptido del FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo. En otra realización, el FVII/FVIIa modificado por CTP se fabrica usando un método descrito aquí. En otra realización, la potencia es de al menos 10500 U/mg. En otra realización, la potencia es de al menos 15000 U/mg. En otra realización, la potencia es de al menos 20000 U/mg. En otra realización, la potencia es de al menos 25000 U/mg. En otra realización, la potencia es de al menos 27500 U/mg. En otra realización, la potencia es de al menos 30000 U/mg. En otra realización, la potencia es de al menos 35000 U/mg. En otra realización, la potencia es de al menos 40000 U/mg. En otra realización, la potencia se selecciona del grupo que consiste en 15563 U/mg, 16720 U/mg, 22478 U/mg y 23608 U/mg.

En una realización, el vector de expresión que comprende una parte de codificación que codifica dicho Factor VII/VIIa modificado por CTP también comprende un promotor, una secuencia de codificación para dicho polipéptido modificado por CTP y una secuencia de poliadenilación. En una realización, la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación del virus de simio (SV) 40.

En una realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de entre 30-1500 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 30 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 40 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 50 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 60 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 70 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 50-70 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 80 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 90 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 70-100 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 100 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 200 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 100-200 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 300 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 200-300 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 400 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 300-400 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 500 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 500-600 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 600 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 600-700 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 700 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 701-800 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 800 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 801-900 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 900 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 901-1000 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1000 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1001-1100 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1100 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1101-1200 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1200 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1201-1300 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1300 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1301-1400 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1400 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1401-1500 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1500 mg/L.

El experto en la técnica apreciará que el término "expresión" puede abarcar la transcripción y/o la traducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga dentro de una célula huésped. El nivel de expresión de un producto/una

proteína de interés deseado en una célula huésped puede determinarse sobre la base de la cantidad de ARNm o ADNc correspondiente que está presente en la célula, o la cantidad de polipéptido/proteína deseado de interés codificada por la secuencia seleccionada como en los presentes ejemplos . Por ejemplo, el ARNm transcrito de una secuencia seleccionada se puede cuantificar mediante hibridación con transferencia Northern, protección con ARN de ribonucleasa, hibridación in situ con ARN celular o mediante PCR (véase Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1987 actualizado). Las proteínas codificadas por una secuencia seleccionada se pueden cuantificar por diversos métodos, p. ej., por ELISA, por transferencia Western, por radioinmunoensayos, por inmunoprecipitación, analizando la actividad biológica de la proteína, por inmunotinción de la proteína seguida de análisis FACS (véase Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1987 actualizado) o por ensayos homogéneos de fluorescencia de resolución temporal (HTRF). En una realización, la cuantificación del Factor VIIa modificado por CTP comprende el uso de una cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC). En otra realización, la RP-HPLC comprende una columna C-18. En otra realización, la RP-HPLC comprende una columna C-8. En otra realización, los métodos descritos aquí usan una RP-HPLC para cuantificar un Factor VII modificado por CTP en la recolección (véase el Ejemplo 3 etapas 2 a 5). En otra realización, los métodos descritos aquí usan una RP-HPLC para cuantificar un Factor VII modificado por CTP durante la purificación. En otra realización, un banco de células, o material congelado descrito aquí muestra una viabilidad tras la descongelación de más del 90%. En otra realización, el almacenamiento es por un período de tiempo indefinido.

En otra realización, el almacenamiento es de 2 semanas. En otra realización, el almacenamiento es de 3 semanas. En otra realización, el almacenamiento es de 1 mes. En otra realización, el almacenamiento es de 2 meses. En otra realización, el almacenamiento es de 3 meses. En otra realización, el almacenamiento es de 5 meses. En otra realización, el almacenamiento es de 6 meses. En otra realización, el almacenamiento es de 9 meses. En otra realización, el almacenamiento es de 1 año.

En otra realización, un banco de células o material congelado descrito aquí se crioconserva mediante un método que comprende hacer crecer un cultivo de las células en un medio definido descrito aquí, congelar el cultivo en una solución que comprende glicerol y almacenar los clones celulares por debajo de -20 grados centígrados. En otra realización, la temperatura es aproximadamente -70 grados centígrados. En otra realización, la temperatura es de alrededor de -70 a -80 grados Celsius. En otra realización, cualquier medio definido descrito aquí puede usarse en este método.

En otra realización de métodos y composiciones descritos aquí, el cultivo se inocula de un banco de células. En otra realización, el cultivo se inocula a partir de un material congelado. En otra realización, el cultivo se inocula a partir de un cultivo iniciador. En otra realización, el cultivo se inocula de una colonia. En otra realización, el cultivo se inocula en la fase de crecimiento logarítmica media. En otra realización, el cultivo se inocula en aproximadamente la fase de crecimiento logarítmica media. En otra realización, el cultivo se inocula en otra fase de crecimiento.

En otra realización de los métodos y composiciones descritos aquí, la solución usada para la congelación comprende DMSO en una cantidad de 2-20%. En otra realización, la cantidad es de 2%. En otra realización, la cantidad es de 20%. En otra realización, la cantidad es de 1%. En otra realización, la cantidad es del 1.5%. En otra realización, la cantidad es de 3%. En otra realización, la cantidad es de 4%. En otra realización, la cantidad es de 5%. En otra realización, la cantidad es de 2%. En otra realización, la cantidad es 2%. En otra realización, la cantidad es de 7%. En otra realización, la cantidad es de 7.5%. En otra realización, la cantidad es de 9%. En otra realización, la cantidad es de 10%. En otra realización, la cantidad es de 12%. En otra realización, la cantidad es de 14%. En otra realización, la cantidad es de 16%. En otra realización, la cantidad es de 18%. En otra realización, la cantidad es de 22%. En otra realización, la cantidad es de 25%. En otra realización, la cantidad es de 30%. En otra realización, la cantidad es de 35%. En otra realización, la cantidad es de 40%.

En otra realización, el aditivo es sacarosa. En otra realización, el aditivo es cualquier otro aditivo o aditivo coligativo con propiedades anticongelantes que se conoce en la técnica.

En una realización, una solución de congelación usada en los métodos y para las composiciones descritas aquí comprende medios acondicionados y DMSO. En una realización, una solución de congelación usada en los métodos y para las composiciones descrios aquí comprende aproximadamente un 46.255% de medios acondicionados y un 7.5% de DMSO.

En una realización, el cultivo celular se cultiva mediante técnicas rutinarias en la técnica. En otra realización, se mantiene un pH constante durante el crecimiento del cultivo celular. En otra realización, el pH se mantiene a aproximadamente 7.0. En otra realización, el pH es aproximadamente 6. En otra realización, el pH es aproximadamente 6.5. En otra realización, el pH es de aproximadamente 7.5. En otra realización, el pH es aproximadamente 8. En otra realización, el pH es 6.5-7.5. En otra realización, el pH es 6-8. En otra realización, el pH es 6-7. En otra realización, el pH es 7-8.

En otra realización, se mantiene una temperatura constante durante el crecimiento del cultivo. En otra realización, la temperatura se mantiene a aproximadamente 37 ºC. En otra realización, la temperatura es de 37 ºC. En otra

realización, la temperatura es de 25 ºC. En otra realización, la temperatura es de 27 ºC. En otra realización, la temperatura es de 28 ºC. En otra realización, la temperatura es de 30 ºC. En otra realización, la temperatura es de 32 ºC. En otra realización, la temperatura es de 34 ºC. En otra realización, la temperatura es de 35 ºC. En otra realización, la temperatura es de 36 ºC. En otra realización, la temperatura es de 38 ºC. En otra realización, la temperatura es de 39 ºC.

En otra realización, se mantiene una concentración constante de oxígeno disuelto durante el crecimiento del cultivo. En otra realización, la concentración de oxígeno disuelto se mantiene al 20% de saturación. En otra realización, la concentración es del 15% de saturación. En otra realización, la concentración es del 16% de saturación. En otra realización, la concentración es del 18% de saturación. En otra realización, la concentración es del 22% de saturación. En otra realización, la concentración es del 25% de saturación. En otra realización, la concentración es del 30% de saturación. En otra realización, la concentración es del 35% de saturación. En otra realización, la concentración es del 40% de saturación. En otra realización, la concentración es del 45% de saturación. En otra realización, la concentración es del 50% de saturación. En otra realización, la concentración es del 55% de saturación. En otra realización, la concentración es del 60% de saturación. En otra realización, la concentración es del 65% de saturación. En otra realización, la concentración es del 70% de saturación. En otra realización, la concentración es del 75% de saturación. En otra realización, la concentración es del 80% de saturación. En otra realización, la concentración es del 85% de saturación. En otra realización, la concentración es del 90% de saturación. En otra realización, la concentración es del 95% de saturación. En otra realización, la concentración es del 100% de saturación. En otra realización, la concentración está cerca del 100% de saturación.

En otra realización de los métodos y composiciones descritos aquí, el cultivo se cultiva en medios que tienen un volumen máximo de 2 litros (L) por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 200 ml por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 300 ml por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 500 ml por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 750 ml por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 1 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 1.5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 2.5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen de 3 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen de 5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen de al menos 5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen de al menos 10 L por recipiente.

En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 2 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 500 ml por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 750 ml por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 1 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 1.5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 2.5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 3 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 4 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 6 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 8 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 10 L por recipiente.

En otra realización, la etapa de congelación se realiza cuando el cultivo tiene una densidad de 1×10^6 células viables (VC)/ml. En otra realización, la biomasa es 1.5×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 1.5×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 2×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 3×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 4×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 5×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 7×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 9×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 10×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 12×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es de 15×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es de 20×10^7 VC/ml. En otra realización, la biomasa es de 25×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 30×10^7 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 33×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 40×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 50×10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es más de 50×10^6 VC/ml.

En otra realización de métodos y composiciones descritos aquí, el cultivo celular se congela instantáneamente en nitrógeno líquido, seguido de almacenamiento a la temperatura de congelación final. En otra realización, el cultivo se congela de una manera más gradual; p. ej., colocando en un vial del cultivo en la temperatura de almacenamiento final. En otra realización, el cultivo se congela por cualquier otro método conocido en la técnica para congelar cultivos celulares.

El experto en la técnica entenderá que las expresiones "cultivo celular" y "cultivo tisular" se pueden usar indistintamente y designan el mantenimiento de células *in vitro*, en cultivo en suspensión en un medio líquido o en una superficie como el vidrio, plástico o agar provisto de medio líquido. En general, el "cultivo celular" necesita un medio que esté amortiguado para mantener un pH adecuado constante. Los medios utilizados en el cultivo celular generalmente se formulan para incluir un suministro adecuado de nutrientes necesarios y pueden adaptarse osmóticamente a las células particulares que se mantienen, con la temperatura y la fase gaseosa también controladas dentro de los límites adecuados. Las técnicas de cultivo celular son bien conocidas en la técnica. Véase, p. ej., Morgan et al. 1993 Animal Cell Culture, BIOS Scientific Publishers, Oxford, Reino Unido; y Adams,

R. L. P. 1990 Cell Culture for Biochemists, Segunda edición, Elsevier.

El experto en la técnica apreciará que el término "pasaje" puede abarcar el acto de subcultivar una población celular. Un experto en la técnica apreciaría que el término "subcultivo" puede abarcar un cultivo celular establecido mediante la inoculación de un medio estéril, que en una realización es un medio estéril fresco, con una muestra de un cultivo anterior.

El experto en la técnica también apreciará que la expresión "cepa celular" puede abarcar una población de células derivadas de un cultivo primario utilizando técnicas de subcultivo. Por lo tanto, un cultivo primario puede subcultivarse en dos o más cultivos nuevos y el subcultivo repetirse a intervalos periódicos durante varios meses para mantener la tensión celular. El subcultivo puede llevarse a cabo utilizando técnicas de cultivo celular establecidas.

En una realización, las cepas celulares hechas pasar y las líneas celulares inmortalizadas se pueden caracterizar por su expresión de marcadores funcionales específicos tales como queratinas, receptores hormonales y del factor de crecimiento y similares.

En algunos aspectos, los cultivos pueden llevarse a cabo en medios definidos sin suero con factores de crecimiento añadidos. En otros aspectos, el medio contiene suero con o sin factores de crecimiento agregados. El experto en la técnica puede determinar empíricamente dichas modificaciones para optimizar la proliferación celular.

Un experto en la técnica apreciará que la expresión "línea celular" puede abarcar una población de células derivadas de un solo explante que se caracterizan por tener el potencial de proliferación ilimitada *in vitro*. Una línea celular se puede aislar de un cultivo primario en función de su capacidad para sobrevivir y continuar creciendo en cultivo. Líneas celulares que se derivaron originalmente del tejido tumoral pueden haberse transformado *in vivo*, aunque no todas las poblaciones de células neoplásicas tienen la capacidad de crecer indefinidamente *in vitro*. Además, las líneas celulares generalmente conservan su carácter diferenciado a través de muchas rondas de división.

Sustratos de cultivo celular adecuados son generalmente un recipiente que puede esterilizarse, no filtra factores tóxicos y no distorsiona las imágenes de microscopía. Así, las placas formadas de vidrio y plástico son sustratos adecuados aquí. Los recipientes de plástico también pueden tratarse para estimular la unión celular utilizando técnicas conocidas en la técnica (Ramsey et al. 1984 In vitro 20: 802). Medios de cultivo tisular adecuados consisten generalmente en un medio nutriente basal, isotónico, que proporciona una fuente de energía, junto con sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y diversos complementos. Los complementos pueden incluir suero (p. ej., suero de ternera fetal o similares) diversos antibióticos para prevenir la contaminación o para proporcionar condiciones selectivas, factores de unión y crecimiento, o similares. Se conocen varias formulaciones de medios en la técnica, tales como, pero sin limitación, medio esencial mínimo (MEM), Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 o medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Condiciones adecuadas de cultivo de tejidos también son conocidas en la técnica. Véase, p. ej., Morgan et al., 1993 Animal Cell Culture, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, Reino Unido, y Adams, R. L. P. 1990 Cell Culture for Biochemists, Segunda edición, Elsevier. En otra realización descrita aquí, los métodos de fabricación de Factor VIIa modificado por CTP son procedimientos sin suero. En otra realización descrita aquí, los métodos de fabricación de Factor VIIa modificado por CTP son procedimientos sin animales.

En otra realización de métodos y composiciones descritos aquí, la temperatura de almacenamiento del cultivo está entre -20 y -80 grados Celsius (ºC). En otra realización, la temperatura es significativamente inferior a -20 ºC. En otra realización, la temperatura no es más alta que -70 ºC. En otra realización, la temperatura es de -70 ºC. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente -70 ºC. En otra realización, la temperatura es de -20 ºC. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente -20 ºC. En otra realización, la temperatura es de -30 ºC. En otra realización, la temperatura es de -40 ºC. En otra realización, la temperatura es -50 ºC. En otra realización, la temperatura es de -60 ºC. En otra realización, la temperatura es de -80 ºC. En otra realización, la temperatura es de -30 a -70 ºC. En otra realización, la temperatura es de -40 a -70 ºC. En otra realización, la temperatura es de -50 a -70 ºC. En otra realización, la temperatura es de -60 a -70 ºC. En otra realización, la temperatura es de -30 a -80ºC. En otra realización, la temperatura es de -40 a -80 ºC. En otra realización, la temperatura es de -50 a -80 ºC. En otra realización, la temperatura es de -60 a -80 ºC. En otra realización, la temperatura es de -70 a -80 ºC. En otra realización, la temperatura es más fría que -70 ºC. En otra realización, la temperatura es más fría que -80 ºC.

En otra realización, para la crioconservación, las células se congelan lentamente hasta que alcanzan una temperatura inferior a -70 ºC en un medio que incluye un crioprotector y los viales se transfieren a un congelador de nitrógeno líquido para mantenerlos a temperaturas inferiores a -130 ºC.

En otra realización de métodos y composiciones descritos aquí, la crioconservación, o almacenamiento congelado, es por un máximo de 24 horas. En otra realización, la crioconservación, o almacenamiento congelado es por un máximo de 2 días, es por un máximo de 3 días, es por un máximo de 4 días, es por un máximo de 1 semana, es

por un máximo de 2 semanas, es por un máximo de 3 semanas, es por un máximo de 1 mes, es por un máximo de 2 meses, es por un máximo de 3 meses, es por un máximo de 5 meses, es por un máximo de 6 meses, es por un máximo de 9 meses, o es por un máximo de 1 año.

En otra realización, la crioconservación, o el almacenamiento congelado es por un mínimo de 1 semana, por un mínimo de 2 semanas, por un mínimo de 3 semanas, es por un mínimo de 1 mes, es por un mínimo de 2 meses, es por un mínimo de 3 meses, es por un mínimo de 5 meses, es por un mínimo de 6 meses, es por un mínimo de 9 meses, es por un mínimo de 1 año, es por un mínimo de 1.5 años, es por un mínimo de 2 años, por un mínimo de 3 años, es por un mínimo de 5 años, es por un mínimo de 7 años, es por un mínimo de 10 años o más de 10 años.

En otra realización de métodos y composiciones descritos aquí, las células exhiben un crecimiento después de la descongelación después de un período prolongado de crioconservación o almacenamiento congelado. En otra realización, las células muestran un crecimiento dentro de aproximadamente 15-22 horas después de la inoculación de medios frescos con células del banco de células o del cultivo iniciador. En otra realización, las células exhiben un crecimiento dentro de aproximadamente 12-20 horas después de la inoculación de medios frescos con células del banco de células o del cultivo iniciador. En una realización, para garantizar la viabilidad, la estabilidad genética y la estabilidad fenotípica, las líneas celulares deben mantenerse en la fase de crecimiento exponencial (a través del subcultivo de forma regular).

Un "período extendido" de crioconservación, o almacenamiento congelado, es, en otra realización, de 1 mes. En otra realización, el período es de 2 meses. En otra realización, el período es de 3 meses. En otra realización, el período es de 5 meses. En otra realización, el período es de 6 meses. En otra realización, el período es de 9 meses. En otra realización, el período es de 1 año. En otra realización, el período es de 1.5 años. En otra realización, el período es de 2 años. En otra realización, el período es de 2-7 años. En otra realización, el período es de al menos 7 años. En otra realización, el período es de al menos 10 años.

En otra realización, las células de los métodos y composiciones descritos aquí conservan una viabilidad de más del 90% después de la descongelación tras la crioconservación. En otra realización, la viabilidad tras la descongelación es cercana al 100% tras el período de crioconservación. En otra realización, la viabilidad tras la descongelación es cercana al 90%. En otra realización, la viabilidad tras la descongelación es al menos el 90%. En otra realización, la viabilidad tras la descongelación es superior al 80%.

En otra realización, un banco de células, un material congelado o un lote de dosis de vacunas descritos aquí se cultiva en un medio de cultivo celular definido. Medios de este tipo son conocidos en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a, Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (ATCC® Nº 30-2002), Medio de Dulbecco Modificado de Iscove (IMDM) (ATCC® Nº. 30-2005), medio Hybri-Care (ATCC® Nº. 46-X), McCoy's 5A y RPMI-1640 (ATCC® Nº 30-2007), mezclas nutrientes de Ham (ATCC® CCL-61 ™), PowerCHO™ químicamente definido, medio sin suero (Lonza Cat. Nº 12-771Q); o cualquier otro medio conocido en la técnica. En otra realización, estos medios pueden complementarse con antibióticos o sueros de animales, según lo determine empíricamente el experto en la técnica.

En una realización, aquí se describen biorreactores y métodos que permiten el cultivo de células de mamíferos en volúmenes a gran escala. Además, y en otra realización, dichos biorreactores y métodos permiten el cultivo de células de mamíferos en condiciones óptimas, incluso si se cultivan en grandes volúmenes y, por lo tanto, permiten un rendimiento del procedimiento y la calidad del producto independientemente del tamaño del biorreactor. La duración del tiempo de incubación dentro del biorreactor puede variar, simplemente cambiando la escala y el sistema del biorreactor, por ejemplo, la duración puede estar entre 8-9, o puede estar entre 15-16 días. En otra realización, la duración de la incubación en un biorreactor es de aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, aproximadamente 20 días o más. En otra realización, cuando se usa un biorreactor de perfusión, la duración de la incubación puede ser de hasta 7-120 días.

En otra realización, aquí se describen biorreactores a gran escala que permiten el cultivo de células de mamíferos en un entorno homogéneo con respecto a parámetros de proceso tales como pH, tensión de oxígeno disuelto (DOT) y temperatura, manteniendo una suspensión celular bien mezclada, y mezclando los nutrientes en el biorreactor. En otra realización, el biorreactor es un biorreactor desechable.

Los métodos descritos aquí resuelven los problemas técnicos subyacentes en los métodos descritos aquí mediante la provisión de biorreactores, sistemas de biorreactores y métodos para el cultivo de células eucarióticas, especialmente de células de mamíferos, de acuerdo con las reivindicaciones.

En una realización, el biorreactor tiene un volumen de al menos 250 litros (L). En otra realización, el biorreactor tiene un volumen de al menos 500 L. En otra realización, el volumen es de al menos 1000 L, al menos 2000 L, al

menos 5000 L, al menos 10000 L al menos 12000 L o al menos 15000 L.

En otra realización, las células están subcultivadas en volúmenes crecientes de biorreactores (véanse los Ejemplos).

Como se conoce generalmente en la técnica, los péptidos y proteínas modificados de la divulgación se pueden acoplar a marcadores, fármacos, agentes fijadores de objetivo, soportes, soportes sólidos y similares, dependiendo de la aplicación deseada. Las formas marcadas de los productos biológicos modificados pueden usarse para rastrear su destino metabólico; etiquetas adecuadas para este propósito incluyen, especialmente, marcadores de radioisótopos tales como yodo 131, tecnecio 99, indio 111 y similares. Los marcadores también pueden usarse para mediar en la detección de las proteínas o péptidos modificados en sistemas de ensayo; en este caso, también se pueden usar radioisótopos, así como marcadores de enzimas, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos y similares. El uso de marcadores de este tipo es particularmente útil si el péptido o la proteína es en sí mismo un agente fijador de objetivo tal como un anticuerpo o un ligando receptor.

Se pueden emplear técnicas de enlace similares, junto con otras, para acoplar los péptidos y proteínas modificados de la divulgación a soportes sólidos. Cuando se acoplan, estos péptidos y proteínas modificados se pueden usar como reactivos de afinidad para la separación de los componentes deseados con los que se exhibe la reacción específica.

Finalmente, los péptidos y proteínas modificados de la divulgación se pueden usar para generar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con estos nuevos compuestos. Estos anticuerpos son útiles en una variedad de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, dependiendo de la naturaleza de la actividad biológica del péptido o proteína no modificados. Debe entenderse que la descripción proporciona anticuerpos que son inmunorreactivos con FVII o FVIIa como se describe aquí. En una realización, anticuerpos de este tipo pueden usarse para distinguir o identificar factores de coagulación modificados por CTP que se administraron a partir de factores de coagulación endógenos. En otra realización, los anticuerpos pueden usarse para localizar los factores de coagulación modificados por CTP administrados.

Ejemplos

En general, la nomenclatura utilizada aquí y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímicas, microbiológicas y recombinantes. Técnicas de este tipo se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "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 et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las Patentes de EE.UU. Nºs 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 et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles se describen extensamente en las patentes y en la bibliografía científica, véase, por ejemplo, las Pat. de E.E.U.U. Nºs 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., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical 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 et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento.

Ejemplo 1

Estudios de viabilidad de FVII-CTP3 en ratones hemofílicos deficientes en FVIII

Se realizaron estudios que prueban el perfil PK y la actividad de coagulación de FVII-CTP, FVII-CTP_2 y FVII-CTP_3 frente a un producto comercial. FVII-CTP_3 exhibió un perfil farmacocinético mejorado al tiempo que mantuvo su actividad de coagulación en comparación con FVII-CTP y FVII-CTP_2 y la solución de proteína purificada contiene al menos un 30% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución de proteína purificada contiene al menos un 40% de Factor Vila modificado por CTP. En otra realización, la proteína purificada contiene al menos un 50% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución de proteína purificada contiene al menos un 60% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra

realización, la solución de proteína purificada contiene al menos un 70% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución de proteína purificada contiene al menos un 80% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución purificada contiene al menos un 90-95% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución purificada contiene un 95.1-99.9% de Factor VII/VIIa modificado por CTP. En otra realización, la solución purificada contiene un 100% de Factor VII/VIIa modificado por CTP.

En una realización, un factor de coagulación modificado por CTP fabricado comprende un alto% de gamma-carboxilación. Un experto apreciaría que el porcentaje (%) de gamma-carboxilación de un factor de coagulación puede tener una relación directa con la potencia del factor de coagulación modificado por CTP. En una realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 50% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 60% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 70% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 80% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 90% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 92% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 93% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 94% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 95% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 96% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 97% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 98% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende al menos un 99% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende un 100% de gamma-carboxilación.

En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre 40-50% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre 50-60% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre 60-70% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre 70-80% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre 80-85% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre 85-90% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre 90-92% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre 90-95% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre 95-97% de gamma-carboxilación. En otra realización, el% de gamma-carboxilación de FVII-CTP3 o FVIIa-CTP3 comprende entre un 95-100% de gamma-carboxilación.

En una realización, la eliminación de los carboxilados bajos en gamma se realiza en la etapa de cromatografía multimodal o mixto del procedimiento de fabricación aquí descrito (véase la etapa 9, Figura 17).

En una realización, el Factor VII/VIIa modificado por CTP fabricado está altamente glicosilado. Se apreciará por el experto en la técnica que la expresión "altamente glicosilado" cuando se refiere a un Factor VII/VIIa modificado con CTP, puede abarcar un nivel de glicosilación de aproximadamente 70-80% del polipéptido Factor VII/VIIa modificado por CTP total. En otra realización, el factor VII/VIIa modificado por CTP altamente glicosilado tiene un nivel de glicosilación de al menos el 70%. En otra realización, el Factor VII/VIIa modificado por CTP altamente glicosilado tiene un nivel de glicosilación de al menos el 80%. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de glicosilación de aproximadamente 81-90% del polipéptido Factor VII/VIIa modificado por CTP total. En otra realización, el Factor VII/VIIa modificado por CTP altamente glicosilado tiene un nivel de glicosilación de al menos el 90%. En otra realización, el término puede abarcar un nivel de glicosilación de aproximadamente 91-95% del polipéptido Factor VIIa modificado por CTP total. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de glicosilación de aproximadamente 95.1-99% del polipéptido Factor VII/VIIa modificado por CTP total. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de glicosilación del 100% del polipéptido Factor VII/VIIa modificado por CTP total. Polipéptidos Factor VII/VIIa modificados por CTP altamente glicosilados pueden tener propiedades beneficiosas en métodos de uso para un Factor VII/VIIa de acción prolongada, apoyando una frecuencia de administración reducida. Los altos niveles de glicosilación contribuyen al aumento significativo del volumen hidrodinámico de un Factor VII/VIIa modificado por CTP, por ejemplo un Factor VIIa modificado por CTP, en comparación con el factor VIVVIIa recombinante. Esto puede resultar en un tiempo de circulación prolongado del Factor Vila modificado por CTP.

En una realización, el número de O-glicanos por CTP es al menos 4-6. En otra realización, el número de O-glicanos por CTP está entre 4-6. En otra realización, el número de O-glicanos por CTP es al menos 4-8. En

otra realización, el número de O-glicanos por CTP está entre 4-8. En una realización, el número de O-glicanos por CTP es al menos 6-8. En una realización, el número de O-glicanos por CTP está entre 6-8. En otra realización, el número de O-glicanos por CTP es al menos 4. En otra realización, el número de O-glicanos por CTP es al menos 5. En otra realización, el número de O-glicanos por CTP es al menos 6. En otra realización, el número de O-glicanos por CTP es al menos 7. En otra realización, el número de O-glicanos por CTP es 8.

En una realización, el número de O-glicanos por polipéptido Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene un CTP fijado es al menos 4-6. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene un CTP fijado es al menos 6-8. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene un CTP fijado es al menos 4-8. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene dos unidades CTP fijadas es al menos 8-12. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene dos unidades de CTP fijadas es al menos 12-16. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene dos unidades de CTP fijadas es al menos 8-16. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene tres unidades de CTP fijadas es al menos 12-18. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido de Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene tres unidades CTP fijadas es al menos 18-24. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene tres unidades CTP fijadas es al menos 12-24. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene cuatro unidades de CTP fijadas es al menos 16-24. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene cuatro unidades de CTP fijadas es al menos 24-32. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene cuatro unidades CTP fijadas es al menos 16-32. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene cinco unidades CTP fijadas es al menos 20-30. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene cinco unidades de CTP fijadas es al menos 30-40. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene cinco unidades de CTP fijadas es al menos 20-40. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene seis unidades CTP fijadas es al menos 24-36. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene seis unidades CTP unidas es al menos 36-48. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene seis unidades CTP unidas es al menos 24-48. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene siete unidades de CTP fijadas es al menos 28-35. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene siete unidades de CTP fijadas es al menos 42-56. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene siete unidades CTP adjuntas es al menos 28-56. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene ocho unidades CTP unidas es al menos 32-48. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene ocho unidades de CTP fijadas es al menos 48-64. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene ocho unidades de CTP fijadas es al menos 32-64. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene nueve unidades de CTP fijadas es al menos 36-54. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene nueve unidades de CTP fijadas es al menos 54-72. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene nueve unidades CTP fijadas es al menos 36-72. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene diez unidades de CTP fijadas es al menos 40-60. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene diez unidades de CTP fijadas es al menos 60-80. En otra realización, el número de O-glicanos por polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP que tiene cinco unidades de CTP fijadas es al menos 40-80.

En una realización, la ocupación de O-glicano por CTP es al menos el 70%. En otra realización, la ocupación de O-glicano por CTP es al menos el 80%. En otra realización, la ocupación de O-glicano por CTP es al menos el 90%. En otra realización, la ocupación de O-glicano por CTP es el 100%.

En una realización, se carga un alto porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 40%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 50%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 60%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 70%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 80%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado con CTP que se cargan comprende al menos el 85%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 90%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende al menos el 95%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado

por CTP que se cargan comprende el 100%.

En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 40%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 50%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 60%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 70%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 80%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 85%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 90%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende aproximadamente el 95%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado con CTP que se cargan comprende aproximadamente el 100%.

En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 10% y 30%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 20% y 40%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 30% y 40%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVIIIFVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 20% y 50%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 40% y 50%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 30% y 60%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 50% y 60%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 40% y 70%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 60% y 70%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 50% y 80%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 70% y 80%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 55% y 85%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 80% y 85%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 60% y 90%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 85% y 90%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 65% y 95%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 90% y 95%. En otra realización, el porcentaje de N-glicanos por FVII/FVIIa modificado por CTP que se cargan comprende entre aproximadamente 95% y 100%.

En una realización, el alto nivel de N-glicanos que se cargan es impulsado por el proceso aguas arriba en el procedimiento de fabricación descrito aquí. En otra realización, se alcanza más del 60% de N-glicanos cargados en fase de DSP temprana y este nivel se mantiene hasta que se obtiene la sustancia farmacológica final.

En una realización, el alto nivel de N-glicanos que se cargan es impulsado por el proceso aguas arriba en el procedimiento de fabricación descrito aquí. En otra realización, se alcanza más del 60% de N-glicanos cargados en fase de DSP temprana y este nivel se mantiene hasta que se obtiene la sustancia farmacológica final.

En una realización, el Factor VII/VIIa modificado por CTP está altamente sialilado. Se apreciará por los expertos que la expresión "altamente sialilado" cuando se refiere a un Factor VII/VIIa modificado por CTP, puede abarcar un nivel de sialilación de aproximadamente 70-80% del polipéptido del Factor VIIa modificado por CTP total. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de sialilación de aproximadamente 80-90% del polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP total. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de sialilación de aproximadamente 90-95% del polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP total. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de sialilación de aproximadamente 95.1-99% del polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP total. En otra realización, la expresión puede abarcar un nivel de sialilación del 100% del polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP total. En otra realización, una estructura de O-glicano en un Factor VIIa modificado por CTP comprende un núcleo monosialilado 1.

En una realización, el alto porcentaje de sialilación y el contenido de glicano enlazado a O de un FVII/FVIIa modificado por CTP descrito aquí, aumenta la potencia del FVII/FVIIa modificado por CTP. En otra realización, el alto porcentaje de sialilación y el contenido de glicano enlazado a O de un FVII/FVIIa modificado por CTP descrito aquí aumentan el volumen hidrodinámica del FVII/FVIIa modificado por CTP.

En una realización, un FVII/FVIIa modificado por CTP descrito aquí tiene potencia. En otra realización, el FVII/FVIIa modificado por CTP es un polipéptido de FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo. En otra realización, el FVII/FVIIa modificado por CTP se fabrica utilizando un método descrito aquí. En otra realización, la potencia está en al menos 5.000 U/mg. En otra realización, la potencia es al menos 7500 U/mg. En otra realización, la potencia es al menos 10000 U/mg. En otra realización, la potencia es al menos 10500 U/mg. En otra realización, la potencia es al menos 15000 U/mg. En otra realización, la potencia es al menos 20000 U/mg. En otra realización, la potencia es al menos 25000 U/mg. En otra realización, la potencia es al menos 27500 U/mg. En otra realización, la potencia es al menos 30000 U/mg. En otra realización, la potencia es al menos 35000 U/mg. En otra realización, la potencia es al menos 40000 U/mg. En una realización adicional, la potencia se selecciona del grupo que consiste en 15563 U/mg, 16720 U/mg, 22478 U/mg y 23608 U/mg.

En una realización, el polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP consiste en dos CTP unidos al extremo carboxi de dicho Factor VII/VIIa, y un péptido carboxi terminal de gonadotropina coriónica fijado al extremo amino de dicho Factor VII/VIIa. En otra realización, el polipéptido del Factor VII/VIIa modificado por CTP consiste en un péptido carboxi terminal de gonadotropina coriónica fijado al extremo carboxi de dicho Factor VII/VIIa.

En una realización, el vector de expresión que comprende una porción codificante que codifica dicho Factor VII/VIIa modificado por CTP también comprende un promotor, una secuencia codificante para dicho polipéptido modificado por CTP y una secuencia de poliadenilación. En una realización, la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación del virus de simio (SV) 40.

En una realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de entre 30 - 1500 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 30 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa en un nivel de al menos 40 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 50 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 60 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado con CTP se expresa a un nivel de al menos 70 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 50-70 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 80 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 90 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 70-100 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 100 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 200 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 100-200 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 300 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 200-300 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 400 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 300-400 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 500 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 500-600 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 600 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa en un nivel de al menos 600-700 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 700 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 701-800 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 800 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 801-900 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 900 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 901-1000 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1000 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1001-1100 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos al menos 1100 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1101-1200 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1200 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1201-1300 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1300 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1301-1400 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1400 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1401-1500 mg/L. En otra realización, el Factor VII modificado por CTP se expresa a un nivel de al menos 1500 mg/L.

Un experto en la técnica apreciará que el término "expresión" puede abarcar transcripción y/o traducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga dentro de una célula huésped. El nivel de expresión de un producto/proteína deseado de interés en una célula huésped se puede determinar sobre la base de la cantidad de ARNm o ADNc correspondiente que se presente en la célula, o la cantidad del polipéptido/proteína de interés deseado codificada por la secuencia seleccionada como en los presentes ejemplos. Por ejemplo, el ARNm transcrito a partir de una secuencia seleccionada se puede cuantificar mediante hibridación por

transferencia Northern, protección de ARN con ribonucleasa, hibridación in situ con ARN celular o mediante PCR (véase Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1987 actualizado). Las proteínas codificadas por una secuencia seleccionada se pueden cuantificar mediante diversos métodos, p. ej., mediante ELISA, mediante transferencia Western, mediante radioinmunoensayo, mediante inmunoprecipitación, mediante ensayo de actividad biológica de la proteína, mediante inmunotinción de la proteína seguida de análisis FACS (véase Sambrook et al., 1989; Ausubel et al..1987 actualizado) o mediante ensayos de fluorescencia homogénea de resolución temporal (HTRF). En una realización, la cuantificación del Factor VIIa modificado por CTP comprende el uso de una cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC). En otra realización, la RP-HPLC comprende una columna C-18. En otra realización, la RP-HPLC comprende una columna C-8. En otra realización, los métodos descritos aquí utilizan una RP-HPLC para cuantificar un Factor VII modificado por CTP en la recolección (Véase el Ejemplo 3 etapas 2 a 5). En otra realización, los métodos descritos aquí utilizan una RP-HPLC para cuantificar un Factor VII modificado por CTP durante la purificación.

En otra realización, un banco de células o material congelado descrito aquí exhibe viabilidad tras la descongelación de más del 90%. En otra realización, el almacenamiento es por un período de tiempo indefinido.

En otra realización, el almacenamiento es durante 2 semanas. En otra realización, el almacenamiento es durante 3 semanas. En otra realización, el almacenamiento es durante 1 mes. En otra realización, el almacenamiento es durante 2 meses. En otra realización, el almacenamiento es durante 3 meses. En otra realización, el almacenamiento es durante 5 meses. En otra realización, el almacenamiento es durante 6 meses. En otra realización, el almacenamiento es durante 9 meses. En otra realización, el almacenamiento es durante 1 año.

En otra realización, un banco de células o material congelado descrito aquí se crioconserva mediante un método que comprende hacer crecer un cultivo de las células en un medio definido descrito aquí, congelar el cultivo en una solución que comprende glicerol y almacenar los clones celulares a menos de -20 grados Celsius. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente -70 grados Celsius. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente -70 a -80 grados Celsius. En otra realización, en este método se puede utilizar cualquier medio definido aquí descrito. Cada medio definido representa una realización separada aquí descrita.

En otra realización de métodos y composiciones descritos aquí, el cultivo se inocula a partir de un banco de células. En otra realización, el cultivo se inocula a partir de un material congelado. En otra realización, el cultivo es inoculado a partir de un cultivo iniciador. En otra realización, el cultivo es inoculado a partir de una colonia. En otra realización, el cultivo es inoculado en la fase de crecimiento logarítmica media. En otra realización, el cultivo es inoculado a aproximadamente la fase de crecimiento logarítmica media. En otra realización, el cultivo es inoculado en otra fase de crecimiento.

En otra realización de métodos y composiciones descritos aquí, la solución utilizada para congelar comprende DMSO en una cantidad del 2-20%. En otra realización, la cantidad es del 2%. En otra realización, la cantidad es del 20%. En otra realización, la cantidad es del 1%. En otra realización, la cantidad es del 1.5%. En otra realización, la cantidad es del 3%. En otra realización, la cantidad es del 4%. En otra realización, la cantidad es del 5%. En otra realización, la cantidad es del 2%. En otra realización, la cantidad es del 2%. En otra realización, la cantidad es del 7%. En otra realización, la cantidad es del 7.5%. En otra realización, la cantidad es del 9%. En otra realización, la cantidad es del 10%. En otra realización, la cantidad es del 12%. En otra realización, la cantidad es del 14%. En otra realización, la cantidad es del 16%. En otra realización, la cantidad es del 18%. En otra realización, la cantidad es del 22%. En otra realización, la cantidad es del 25%. En otra realización, la cantidad es del 30%. En otra realización, la cantidad es del

35%. En otra realización, la cantidad es del 40%.

En otra realización, el aditivo es sacarosa. En otra realización, el aditivo es cualquier otro aditivo coligativo o aditivo con propiedades anticongelantes que se conoce en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada aquí descrita.

En una realización, una solución de congelación utilizada en métodos y para las composiciones descritas aquí comprende medios acondicionados y DMSO. En una realización, una solución de congelación utilizada en los métodos y para las composiciones descritos aquí comprende aproximadamente 46.255% de medio acondicionado y 7.5% de DMSO.

En una realización, el cultivo celular se cultiva mediante técnicas rutinarias en la técnica. En otra realización, se mantiene un pH constante durante el crecimiento del cultivo celular. En otra realización, el pH se mantiene en aproximadamente 7,0. En otra realización, el pH es aproximadamente 6. En otra realización, el pH es aproximadamente 6.5. En otra realización, el pH es aproximadamente 7.5. En otra realización, el pH es aproximadamente 8. En otra realización, el pH es 6.5-7.5. En otra realización, el pH es 6-8. En otra realización, el pH es 6-7. En otra realización, el pH es 7-8.

En otra realización, se mantiene una temperatura constante durante el crecimiento del cultivo. En otra realización, la temperatura se mantiene a aproximadamente 37 °C. En otra realización, la temperatura es 37 °C. En otra realización, la temperatura es 25 °C. En otra realización, la temperatura es 27 °C. En otra realización, la temperatura es 28 °C. En otra realización, la temperatura es 30 °C. En otra realización, la temperatura es 32 °C. En otra realización, la temperatura es 34 °C. En otra realización, la temperatura es 35 °C. En otra realización, la temperatura es 36 °C. En otra realización, la temperatura es 38 °C. En otra realización, la temperatura es 39 °C.

En otra realización, se mantiene una concentración constante de oxígeno disuelto durante el crecimiento del cultivo.

En otra realización, la concentración de oxígeno disuelto se mantiene al 20% de saturación. En otra realización, la concentración es del 15% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 16% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 18% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 22% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 25% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 30% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 35% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 40% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 45% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 50% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 55% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 60% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 65% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 70% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 75% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 80% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 85% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 90% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 95% de la saturación. En otra realización, la concentración es del 100% de saturación. En otra realización, la concentración es cercana al 100% de la saturación.

En otra realización de métodos y composiciones descritos aquí, el cultivo se cultiva en medios que tienen un volumen máximo de 2 litros (L) por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 200 ml por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 300 ml por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 500 ml por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 750 ml por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 1 litro por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 1.5 litros por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen máximo de 2.5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen de 3 litros por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen de 5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen de al menos 5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen de al menos 10 L por recipiente.

En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 2 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 500 ml por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 750 ml por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 1 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 1.5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 2.5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 3 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 4 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 5 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 6 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 8 L por recipiente. En otra realización, el medio tiene un volumen mínimo de 10 L por recipiente.

En otra realización, la etapa de congelación se realiza cuando el cultivo tiene una densidad de 1 X 10^6 células viables (VC)/ml. En otra realización, la biomasa es 1.5 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 1.5 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 2 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 3 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 4 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 5 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 7 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 9 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 10 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 12 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 15 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 20 X 10^7 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 25 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 30 X 10^7 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 33 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 40 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es 50 X 10^6 VC/ml. En otra realización, la biomasa es superior a 50 X 10^6 VC/ml.

En otra realización de métodos y composiciones descritos aquí, el cultivo celular se congela instantáneamente en nitrógeno líquido, seguido de almacenamiento a la temperatura de congelación final. En otra realización, el cultivo se congela deuna manera más gradual; p. ej., colocándolo en un vial del cultivo a la temperatura de almacenamiento final. En otra realización, el cultivo se congela mediante cualquier otro método conocido en la técnica para congelar cultivos celulares.

El experto en la técnica entenderá que las expresiones "cultivo celular" y "cultivo tisular " pueden usarse

indistintamente y designan el mantenimiento de células in vitro, en cultivo en suspensión en un medio líquido o en superficie tal como vidrio, plástico o agar provistos de medio líquido. En general, el "cultivo celular" necesita un medio tamponado para mantener un pH adecuado y constante. Los medios utilizados en el cultivo celular generalmente están formulados para incluir un suministro adecuado de nutrientes necesarios y puede adaptarse osmóticamente a las células particulares que se mantienen, controlándose la temperatura y la fase gaseosa también dentro de límites adecuados. Las técnicas de cultivo celular son bien conocidas en la técnica. Véase, p. ej., Morgan et al. 1993 Animal Cell Culture, BIOS Scientific Publishers, Oxford, Reino Unido; y Adams, R. L. P. 1990 Cell Culture for Biochemists, Segunda Edición, Elsevier.

El experto en la técnica apreciará que el término "etapa" puede abarcar el acto de subcultivar una población celular. Un experto en la técnica apreciaría que el término "subcultivo" puede abarcar un cultivo celular establecido mediante la inoculación de medio estéril, que en una realización es un medio estéril fresco, con una muestra de un medio estéril de un cultivo anterior.

El experto también apreciará que la expresión "cepa celular" puede abarcar una población de células derivada de un cultivo primario utilizando técnicas de subcultivo. Así, un cultivo primario puede subcultivarse en dos o más cultivos nuevos y los subcultivos se pueden repetir a intervalos periódicos durante varios meses para mantener la cepa celular. El subcultivo se puede llevar a cabo utilizando técnicas de cultivo celular establecidas.

En una realización, las cepas celulares pasadas y las líneas celulares inmortalizadas se pueden caracterizar por su expresión de marcadores funcionales específicos tales como queratinas, receptores hormonales y de factores de crecimiento y similares.

En algunos aspectos, los cultivos se pueden llevar a cabo en medios definidos sin suero con factores de crecimiento añadidos. En otros aspectos, el medio contiene suero con o sin factores de crecimiento añadidos. Modificaciones de este tipo pueden determinarse empíricamente por el experto en la técnica para optimizar la proliferación celular.

Un experto en la técnica apreciará que la expresión "línea celular" puede abarcar una población de células derivadas de un solo explante que se caracterizan por tener el potencial de proliferación ilimitada *in vitro.* Una línea celular puede aislarse de un cultivo primario en base a su capacidad de sobrevivir y continuar creciendo en cultivo. Líneas celulares que han sido derivadas originalmente de tejido tumoral pueden haber sido transformadas *in vivo,* aunque no todas las poblaciones de células neoplásicas tienen la capacidad de crecer indefinidamente *in vitro.* Además, las líneas celulares generalmente conservan su carácter diferenciado a través de muchas rondas de división.

Sustratos de cultivo celular adecuados son generalmente un recipiente que puede esterilizarse, no lixivia factores tóxicos y no distorsiona las imágenes de microscopía. Por lo tanto, las placas formadas a partir de vidrio y plástico son sustratos adecuados en este caso. Los recipientes de plástico pueden tratarse además para estimular la unión celular usando técnicas conocidas en la técnica (Ramsey et al. 1984 In vitro 20:802). Medios de cultivo de tejidos adecuados consisten generalmente en un medio nutritivo basal isotónico, tamponado, que proporciona una fuente de energía, junto con sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y diversos complementos. Complementos puede incluir suero (p. ej., suero fetal de ternera o similar) diversos antibióticos para prevenir la contaminación o para proporcionar condiciones selectivas, factores de fijación y crecimiento, o similares. Se conocen varias formulaciones de medios en la técnica, tales como, pero no limitado a medio mínimo esencial (MEM), Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 o Medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM). También se conocen en la técnica condiciones adecuadas para el cultivo de tejidos. Véase, por ejemplo, Morgan et al. 1993 Animal Cell Culture, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, Reino Unido, y Adams, R. L. P. 1990 Cell Culture for Biochemists, Segunda Edición, Elsevier. En otra realización descrita aquí, métodos de fabricación de Factor VIIa modificado por CTP es un proceso sin suero. En otra realización descrita aquí, los métodos de fabricación de Factor VIIa modificado por CTP es un proceso libre de derivados animales.

En otra realización de métodos y composiciones descritos aquí, la temperatura de almacenamiento del cultivo está entre - 20 y - 80 grados Celsius (°C). En otra realización, la temperatura es significativamente inferior a - 20 ºC. En otra realización, la temperatura no es superior a - 70 ºC. En otra realización, la temperatura es - 70 ºC. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente - 70 ºC. En otra realización, la temperatura es - 20 ºC. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente - 20 ºC. En otra realización, la temperatura es - 30 ºC. En otra realización, la temperatura es de - 40 °C. En otra realización, la temperatura es - 50 ºC. En otra realización, la temperatura es - 60 ºC. En otra realización, la temperatura es - 80 ºC. En otra realización, la temperatura es - 30 a -70 ºC. En otra realización, la temperatura es de -40 a - 70 ºC. En otra realización, la temperatura es - 50 a -70 ºC. En otra realización, la temperatura es - 60 a – 70 ºC. En otra realización, la temperatura es-30 a -80 ºC. En otra realización, la temperatura es de – 40 a -80 °C. En otra realización, la temperatura es de -50 a -80 ºC. En otra realización, la temperatura es de -60 a -80 °C. En otra realización, la temperatura es de -70 a -80 ºC. En otra realización, la temperatura es inferior a - 70 ºC. En otra realización, la temperatura es inferior a - 80 ºC.

En otra realización, para la crioconservación, las células se congelan lentamente hasta que alcanzan una temperatura inferior a -70 °C en un medio que incluye un crioprotector y luego los viales se transfieren a un congelador de nitrógeno líquido para mantener a temperaturas inferiores a -130 °C.

En otra realización de métodos y composiciones descritos aquí, la crioconservación o el almacenamiento congelado es por un máximo de 24 horas. En otra realización, la crioconservación o el almacenamiento congelado es por un máximo de 2 días, es por un máximo de 3 días, es por un máximo de 4 días, es por un máximo de 1 semana, es por un máximo de 2 semanas, es por un máximo de 3 semanas, es por un máximo de 1 mes, es por un máximo 2 meses, es por un máximo 3 meses, es por máximo un de 5 meses, es por un máximo de 6 meses, es por un máximo de 9 meses, o es por un máximo de 1 año. Cada posibilidad enumerada anteriormente es una realización descrita aquí.

En otra realización, la crioconservación, o el almacenamiento congelado es por un mínimo de 1 semana, es por un mínimo de 2 semanas, es por un mínimo de 3 semanas, es por un mínimo de 1 mes, es por un mínimo de 2 meses, es por un mínimo de 3 meses, es por un mínimo de 5 meses, es por un mínimo de 6 meses, es por un mínimo de 9 meses, es por un mínimo de 1 año, es por un mínimo de 1.5 años, es por un mínimo de 2 años, es por un mínimo de 3 años, es por un mínimo de 5 años, es por un mínimo de 7 años, es por un mínimo de 10 años, o es por más de 10 años. Cada posibilidad enumerada anteriormente es una realización descrita aquí.

En otra realización de métodos y composiciones descritos aquí, las células exhiben crecimiento después de la descongelación tras de un período prolongado de crioconservación o almacenamiento congelado. En otra realización, las células exhiben crecimiento dentro de aproximadamente 15-22 horas después de inocular medios nuevos con células del banco de células o del cultivo iniciador. En otra realización, las células exhiben crecimiento dentro de aproximadamente 12-20 horas después de inocular medios nuevos con células del banco de células o del cultivo iniciador. En una realización, para garantizar la viabilidad, la estabilidad genética y la estabilidad fenotípica, las líneas celulares deben mantenerse en la fase de crecimiento exponencial (mediante subcultivos sobre una base regular).

Un "período extendido" de crioconservación, o almacenamiento congelado, es, en otra realización, 1 mes. En otra realización, el periodo es de 2 meses. En otra realización, el período es de 3 meses. En otra realización, el período es de 5 meses. En otra realización, el período es de 6 meses. En otra realización, el período es de 9 meses. En otra realización, el periodo es de 1 año. En otra realización, el período es de 1.5 años. En otra realización, el período es de 2 años. En otra realización, el período es de 2 a 7 años. En otra realización, el período es de al menos 7 años. En otra realización, el período es de al menos 10 años.

En otra realización, las células de los métodos y las composiciones descritos aquí conservan una viabilidad de más de 90% después de la descongelación tras la crioconservación. En otra realización, la viabilidad tras la descongelación es cercana al 100% tras el periodo de crioconservación. En otra realización, la viabilidad tras la descongelación es cercana al 90%. En otra realización, la viabilidad tras la descongelación es al menos del 90%. En otra realización, la viabilidad tras la descongelación es superior al 80%.

En otra realización, un banco de células, material congelado o lote de dosis de vacuna descrtios aquí se cultiva en medios de cultivo celular definidos. Medios de este tipo son conocidos en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (ATCC® Nº 30-2002), Medio de Dulbecco Modificado de Iscove (IMDM) (ATCC® Nº. 30-2005), medio Hybri-Care (ATCC® Nº. 46-X), McCoy's 5A y RPMI-1640 (ATCC® Nº 30-2007), mezclas nutrientes de Ham (ATCC® CCL-61 ™), PowerCHO™ químicamente definido, medio sin suero (Lonza Cat. Nº 12-771Q); o cualquier otro medio conocido en la técnica.. En otra realización, estos medios pueden complementarse con antibióticos o sueros animales, como lo determinará empíricamente el experto en la técnica.

En una realización, se describen aquí biorreactores y métodos que permiten el cultivo de células de mamíferos en volúmenes a gran escala. Además, y en otra realización, dichos biorreactores y métodos, permiten el cultivo de células de mamíferos en condiciones óptimas, incluso si se cultivan en volúmenes a gran escala y, por lo tanto, permiten un rendimiento del proceso y una calidad del producto independientemente del tamaño del biorreactor. La duración del tiempo de incubación dentro del biorreactor puede variar, simplemente cambiando la escala y el sistema del biorreactor, por ejemplo, la duración puede estar entre 8-9, o puede ser entre 15-16 días. En otra realización, la duración de la incubación en un biorreactor es de aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, aproximadamente 20 días o más. En otra realización, cuando se utiliza un biorreactor de perfusión, la duración de la incubación puede ser de hasta 7-120 días.

En otra realización, se describen aquí biorreactores a gran escala que permiten el cultivo de células de

mamíferos en un entorno homogéneo con respecto a parámetros de proceso tales como pH, tensión de oxígeno disuelto (DOT) y temperatura, manteniendo una suspensión celular bien mezclada y mezclando nutrientes dentro del biorreactor. En otra realización, el biorreactor es un biorreactor desechable.

Métodos descritos aquí resuelven los problemas técnicos subyacentes a los métodos descritos aquí mediante la disposición de biorreactores, sistemas de biorreactores y métodos para el cultivo de células eucarióticas, especialmente de células de mamíferos, de acuerdo con las reivindicaciones.

En una realización, el biorreactor tiene un volumen de al menos 250 litros (L). En otra realización, el biorreactor tiene un volumen de al menos 500 L. En otra realización el volumen es de al menos 1000 L, al menos 2000 L, al menos 5000 L, al menos 10000 L, al menos 12000 L o al menos 15000 L.

En otra realización, las células se subcultivan en volúmenes crecientes de biorreactores (véanse los Ejemplos).

Como se sabe generalmente en la técnica, los péptidos y proteínas modificados de la divulgación pueden acoplarse a marcadores, fármacos, agentes fijadores de objetivo, soportes, soportes sólidos y similares, dependiendo de la aplicación deseada. Las formas marcadas de los productos biológicos modificados se pueden utilizar para rastrear su destino metabólico; marcadores adecuados para este propósito incluyen, especialmente, marcadores de radioisótopos tales como yodo 131, tecnecio 99, indio 111 y similares. Los narcadores también pueden usarse para mediar en la detección de proteínas o péptidos modificados en sistemas de ensayo; en este caso también se pueden utilizar radioisótopos como marcadores enzimáticos, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos y similares. El uso de marcadores de este tipo es particularmente útil si el péptido o la proteína es en sí mismo un agente fijador de objetivo tal como un anticuerpo o un ligando de receptor.

Se pueden emplear técnicas de enlace similares, junto con otras, para acoplar los péptidos y proteínas modificados de la divulgación a soportes sólidos. Cuando se combinan, estos péptidos y proteínas modificados se pueden utilizar como reactivos de afinidad para la separación de componentes deseados con los que se exhibe una reacción específica.

Finalmente, los péptidos y las proteínas modificados de la divulgación se pueden usar para generar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con estos nuevos compuestos. Estos anticuerpos son útiles en una variedad de diagnósticos y aplicaciones terapéuticas, dependiendo de la naturaleza de la actividad biológica del péptido o proteína no modificado. Se debe entender que la divulgación proporciona anticuerpos que son inmunorreactivos con FVII o FVIIa como se describe aquí. En una realización, dichos anticuerpos pueden usarse para distinguir o identificar factores de coagulación modificados por CTP que se administraron de factores de coagulación endógenos. En otra realización, los anticuerpos se pueden utilizar para localizar factores de coagulación modificados por CTP administrados.

Objetos, ventajas y características novedosas adicionales descritas aquí resultarán evidentes para experto ordinario en la técnica tras examinar los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos descritos aquí como se delineó anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Generalmente, la nomenclatura utilizada aquí y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Estas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "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 et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se recogen en las Patentes de EE,UU, Nºs 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" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles están extensamente descritos en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nºs 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., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical 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 et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia. A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales.

Ejemplo 1

Estudios de viabilidad de FVII-CTP$_3$ en ratones hemofílicos deficientes en FVIII

Se realizaron estudios que testaron el perfil PK de la recolección de FVII-CTP, FVII-CTP$_2$ y FVII-CTP$_3$ y la actividad de coagulación frente a un FVII comercial. FVII-CTP$_3$ exhibió un perfil PK mejorado al tiempo que mantuvo su actividad de coagulación en comparación con las recolecciónes de FVII-CTP y FVII-CTP$_2$ o rhFVII. Con el fin de caracterizar mejor el FVII-CTP3 en propiedades *in vitro* e *in vivo*, se generó un mini grupo estable que expresa y secreta la proteína, y se desarrollaron procesos de purificación y activación.

En el presente estudio, se testaron las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de FVIIa-CTP$_3$ en ratones deficientes en FVIII. Se evaluó el perfil PK de la proteína. Se estableció un perfil PK basado en la actividad específica de FVIIa y se comparó con el producto comercial NovoSeven®. Además, se testaron las capacidades hemostáticas *in vivo* de FVIIa-CTP$_3$ de larga duración para inducir la coagulación en ratones deficientes en FVIII después de una transección en la vena de la cola (estudio de supervivencia).

Objetivos del estudio:

Para evaluar los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de FVIIa-CTP$_3$ frente a rhFVIIa comercial (NovoSeven®) en ratones deficientes en FVIII después de una administración intravenosa única a una dosis de actividad similar.

Para determinar la capacidad *in vivo* de FVIIa-CTP3 para mantener la homeostasis en ratones deficientes en FVIII mediante una administración intravenosa única de FVIIa-CTP3 y NovoSeven® a una dosis de actividad similar seguida de un desafío de la transección de la vena de la cola (estudio de supervivencia).

Producción de recolección de FVII-CTP$_3$:

El FVII-CTP$_3$ se expresó internamente en células Dg44 usando un vector pCI-DHFR (Figura 1). La agrupación transfectada estable nº 71 se hizo crecer en matraces de agitación, en presencia de 25 ng/L de Vitamina K3 (Sigma). La suspensión celular se cultivó y se cosechó siguiendo el declive de la viabilidad a 60-80%. La recolección se filtró y se congeló a -70ºC.

Determinación del nivel de antígeno de FVII de recolección:

El nivel de antígeno de FVII se determinó usando el kit ELISA para FVII humano (Zymotest HyPhen) (Tabla 1). El nivel de antígeno se calculó para cada lote de recolección agrupado.

Tabla 1: Nivel de antígeno FVII-CTP$_3$

Nivel de antígeno FVII			
	Estudio PK-PD		Estudio supervivencia
	recolección 31A	recolección 31B	recolección 38
Av (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 FVII-CTP$_3$ (Figuras 2A-2B)

Esquema del proceso

Tras un breve estudio de purificación, se realizó el siguiente proceso de purificación utilizando 2 columnas. La columna de afinidad VII-Select (GE) y la de tipo 1 de hidroxiapatito de cerámica (HA), 40 µm (Bio Rad), FVII-CTP$_3$ y proteína enriquecida con carboxilato se purificaron. La auto-activación se indujo mediante la incubación de FVII-CTP$_3$ purificado en presencia de $CaCl_2$ durante la noche a 2-8 ºC. El proceso de purificación se encuentra en su

etapa final de desarrollo y se está optimizando, por lo tanto, aunque la mayoría de las etapas de purificación son similares, parte de las etapas de purificación no son idénticos en los dos lotes.

Ultra-filtración/diafiltración (UFDF) usando fibra hueca de 10 kDa o casete Pellicon

La recolección clarificada fue descongelada a 4 ºC durante el fin de semana (2-3 días).

En el *Lote 31*, la recolección clarificada (12 litros) se concentró 4 veces (en dos series sucesivas) utilizando un cartucho de fibra hueca (GE Healthcare Catálogo nº UFP-10-C-4X2MA) con un corte de peso molecular de 10 KDa. La recolección concentrada se diafiltró contra 1-2 volúmenes de TBS (Tris 50 mM NaCl 150 mM pH 7.4).

En el *Lote 38*, la recolección clarificada (8.5 litros) se concentró 4 veces utilizando un casete Pellicon 2 (Millipore) con un corte de peso molecular de 10 KDa. La recolección concentrada se cargó directamente en la columna VII-Select.

Ambas ultrafiltraciones se realizaron en hielo con tampones helados. Las muestras de UFDF se filtraron 0.22 µm antes de cargar.

Captura en la columna FVII-Select

La UFDF o la recolección concentrada se cargaron en la columna VII-Select (XK16/20, CV 18 ml), previamente equilibrada con TBS pH 7.4. La columna se lavó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.5, y el FVII-CTP$_3$ se eluyó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 1M al 50% (v/v), propilenglicol a pH 7.5. El proceso se realizó en dos ciclos sucesivos utilizando la misma columna.

Separación basada en gamma-carboxilación en una columna de hidroxiapatito cerámico

El producto eluido se diluyó 1:10 con fosfato de sodio 10 mM a pH 6.8 y se cargó en columnas de hidroxiapatito cerámico (XK16/20, CV 24 ml). La columna se lavó con fosfato sódico 59 mM, pH 6.8, y la fracción rica en carboxilato de Factor VII se eluyó con fosfato sódico 500 mM, pH 6.8. Este proceso se realizó en dos ciclos sucesivos en la misma columna. En cada lote, los materiales eluidos de los dos ciclos se agruparon y se 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

FVII-CTP$_3$ purificado se diluyó a razón de 1 mg/ml y se incubó en Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM y $CaCl_2$ 1 mM pH 8.2 a 2-8 ºC durante 24 horas. La activación se terminó por intercambio de tampón (UFDF) a un tampón de formulación preliminar (tampón cítrico 20 mM, NaCl 240 mM, glicina 13.3 mM, pH 6.9).

Propiedades analíticas de FVII-CTP$_3$ y FVIIa-CTP$_3$:

SDS-PAGE y transferencias Western

FVII-CTP$_3$ purificado y FVIIa-CTP$_3$ se cargaron en un gel de Tris-Glicina al 12% usando el Marcador de Proteína de Doble Color Precision Plus (Bio-Rad). El análisis de SDS-PAGE Coomassie se realizó tiñendo el gel con reactivo azul brillante de Coomassie (5 o 10 µg de proteína/pista). Se realizó un análisis de transferencia Western (1 µg de proteína/pista) utilizando un anticuerpo policlonal FVII antihumano (R&D systems; AF2338), un Ab (anticuerpo) monoclonal de gamma-carboxilación anti-humano (Catálogo de American Diagnostics nº 499, 3570) y un Ab policlonal anti-CTP. Bajo condiciones reducidas, FVII-CTP$_3$ migró a 75KDa, y FVIIa-CTP3 migró como dos bandas principales: una cadena pesada a 50 kDa y una cadena ligera a 25 kDa, representadas en las Figuras 3A-3H como Bandas 2 y 3, respectivamente.

El procedimiento de purificación enriqueció significativamente la porción de FVII-CTP$_3$ al tiempo que redujo las impurezas. El rendimiento del proceso de purificación fue de 25-30% de FVII (de acuerdo con ELISA). La mayor parte de la proteína perdida durante la purificación tenía una baja actividad cromogénica del FVII o ninguna actividad. Basado en SDS-PAGE teñido con Coomassie, el FVIIa-CTP3 reducido contiene más que las bandas predichas. Una banda que migra a alrededor de 75 kDa representa un FVII no activado (Figuras 3A-3H, Banda 1). Esta banda consiste en dos bandas con pequeñas diferencias de MW (peso molecular), que pueden reflejar un contenido diferente de γ-carboxilación. Se observaron bandas adicionales con un MW inferior a 20 kDa. Esto fue reseñado previamente como productos de degradación de la cadena pesada.

Actividad cromogénica de FVII-CTP$_3$:

Se realizó una evaluación comparativa de la potencia in vitro de la recolección de FVII-CTP$_3$, las fracciones en proceso y el FVII-CTP$_3$ purificado frente al plasma normal humano de la agrupación utilizando un kit de prueba de

actividad cromogénica disponible comercialmente, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). La recolección de FVII-CTP_3 y la proteína se diluyeron en serie y la potencia se evaluó comparando una curva de pérdida de respuesta con una preparación de referencia de plasma humano normal. Después de la purificación con FVII-CTP_3, la actividad cromogénica mejoró significativamente y las fracciones no activas se separaron principalmente mediante una columna de HA (Figura 4). Se observó una fuerte correlación entre la actividad cromogénica del FVII y la detección de FVII con anticuerpos anti-Gla monoclonales en transferencia Western. La potencia de la actividad cromogénica del FVII reflejada por el valor de CE50 en la recolección se ve afectada tanto por las fracciones de FVII carboxiladas como no carboxiladas. Después de la purificación y el enriquecimiento de FV1I-CTP_3 y la fracción carboxilada, la actividad mejoró, demostrando la importante contribución de la γ-carboxilación a la actividad del FVII (Figura 4). Este parámetro es crucial para la actividad in vivo adecuada de FVII y se tratará más adelante en un programa de desarrollo de clones.

Determinación de proteínas por A280

El coeficiente de extinción teórica de FVIIa-CTP3 y NovoSeven® se calculó utilizando el 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 del coeficiente de extinción entre las dos proteínas se deriva únicamente del aumento en el peso molecular de FVIIa-CTP_3 en comparación con NovoSeven®, ya que el CTP carece de residuos aromáticos y de cisteína, por lo tanto no contribuye a la absorbancia.

La determinación de la proteína por A280 se usa para el FVII final y para las muestras purificadas en proceso, a partir de la elución de la columna VII-Select.

Determinación del nivel de antígeno FVIIa

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

Ensayo de coagulación de FVII-Staclot® VIIa-rTF

El FVIIa se deriva de una escisión intracadena del FVII de cadena sencilla. El factor tisular nativo (TF) es un cofactor de FVIIa. Al unirse a TF, FVII media en la activación de Factor X a Xa, mientras que él mismo se transforma en FVIIa. El factor tisular soluble es la parte extracelular del factor tisular nativo. Ya no puede activar FVII por autoactivación, pero el FVIIa unido al factor tisular puede activar FX a FXa.

El factor tisular soluble recombinante (rsTF) utilizado en este ensayo utiliza la especificidad de FVIIa para construir una prueba de coagulación de FVIIa. 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 fue realizado por Omri Laboratories (Nes-Ziona, Israel). La actividad de FVIIa se evaluó para NovoSeven® después de la reconstitución y FVIIa-CTP_3 antes de cada estudio. La actividad de NovoSeven® no se correlacionó con la actividad anticipada como se informó en el vial, pero la discrepancia podría deberse a un enfoque diferente para la evaluación de la actividad. La Tabla 39 resume la actividad de coagulación del FVIIa por volumen sin considerar la concentración de proteína.

Tabla 2: Actividad de coagulación del FVIIa de los productos del lote

	Estudio PK		Estudio supervivencia	
	FVIIa-3*CTP (FVIIa 31)	NovoSeven®	FVIIa-3*CTP (FVIIa 38)	NovoSeven®
Actividad (U/ml)	1.3E+06	2.5E+05	1.3E+06	7.4E+05

Actividad específica de FVIIa-CTP_3

La actividad específica de FVIIa (que se calcula como la actividad/ml dividida por la concentración de proteína) se

calculó basándose en A280 y se presenta en la Tabla 3. Al comparar la actividad específica de las dos moléculas, que difieren en el MW, la compensación debe ser realizada para normalizar la actividad (es decir, debido a la diferencia de peso molecular, el número de sitios activos en 1 mg de NovoSeven® es 1.185 veces más alto que en FVIIa-CTP_3). El cálculo del factor de conversión se presenta en la siguiente ecuación:

$$Normalizado\_SA = \frac{SA(FVIa - CTP_3)}{MW.(FVII \quad CTP_3)} \times MW(Nativo\_FVII) =$$

$$= \frac{SA(FVIIa \quad CTP_3)}{53419.5Da} \times 45079.1Da = SA(FVIIa - CTP_3) * 1.185$$

Tabla 3: Actividad específica FVIIa-CTP3 comparada con NovoSeven®

Muestra	Promedio A280	STDV (n=9)	%CV	Coeficiente de extinción	Prot conc. (mg/ml)	U/ml	Actividad específica		Veces disminuida de NovoSev en®
							U/mg proteína	U/mg FVIIa	
NovoSev en®	1.274	0.031	2.398	1.406	0.906	8.36E+05	9.23E +05	9.23E +05	1.0
FVIIa-CTP3	4.396	0.092	2.094	1.186	3.706	7.23E+05	1.95E +05	2.31E +05	4.0

Estudio PK-PD de FVIIa-CTP$_3$:

Esquema de estudio

Se administraron FVIIa-CTP3 y rhFVIIa (NovoSeven®, NS) en una sola inyección intravenosa a ratones deficientes en FVIII C57B a una dosis de 6.4E6 U/kg de peso corporal (160000 U/animal). Las muestras de sangre se extrajeron retroorbitalmente de 4 ratones alternativamente a 0.166, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58 y 72 horas después de la dosificación (Tabla 4). El plasma citratado (0.32%) se preparó inmediatamente después del muestreo y se almacenó a -20 ºC hasta el análisis. Se evaluó el nivel de actividad de coagulación de FVIIa y se realizó un análisis detallado de PK. El estudio fue realizado por Omri Laboratories (Nes-Ziona, Israel).

Tabla 4: Resultados del estudio

Grupo Tratado	Artículo Ensayo	Nº de animales / grupo/ momento	Dosis Vía	Cantidad de Unidades/ animal	Vol. inyectado (ul)	Momentos (horas post-dosis)
A	rhFVIIa	4	IV	1.6e5	200	0 (Pre-dosis) 0.166, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72
B	FVIIa-CTP$_3$	4	IV	1.6e5	200	0 (Pre-dosis) 0.166, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72

Perfil de FVIIa-CTP$_3$ PK en ratones deficientes en FVIII

La actividad de FVIIa en muestras de sangre se cuantificó usando un kit Staclot® VIIa-rTF (Stago, Parsippany, NJ). El perfil farmacocinético se calculó para cada proteína y representa la media de 4 animales en cada momento. La Figura 5 presenta el perfil PK de FVIIa a lo largo del experimento. La recuperación de FVIIa se presenta en la Tabla 6. Un resumen de los parámetros de PK se presenta en la Tabla 7.

La Tabla 5 resume los valores de la actividad de coagulación después de la administración de NovoSeven® o FVIIa-CTP$_3$. FVIIa-CTP$_3$ y NovoSeven® alcanzaron la actividad máxima media hora después de la dosificación. El mayor valor de actividad de NovoSeven® alcanzó solo el 43% del valor máximo de actividad de FVIIa-CTP$_3$. La actividad de coagulación de FVIIa-CTP$_3$ se mantuvo durante un período de tiempo más largo, demostrando una actividad alargada. La actividad de coagulación para los ratones tratados con NovoSeven® fue indetectable en momentos posteriores a las 12 horas, mientras que los ratones tratados con FVII-CTP$_3$ continuaron reteniendo la actividad medible 48 horas después de la dosificación (Tabla 5 y Figura 5).

La adición de tres copias de CTP en tándem al FVIIa elevó la recuperación en un 100% (Tabla 6), medida por la mayor actividad posterior a la dosificación y comparada con la actividad anticipada basada en el análisis in vitro, y aumentó 5 veces la semivida y el tiempo medio de permanencia (MRT).

El tiempo de exposición (AUC) se incrementó 3 veces (Tabla 7).

Tabla 5: Actividad de coagulación de FVIIa después de una inyección intravenosa única

Tiempo después de la administración (horas)	Actividad de coagulación de FVII promedio (U/ml) (U/ml)	
	FVIIa-CTP3	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

34	4.6E+03	BLQ
48	1.5E+03	BLQ

Tabla 6: Recuperación de FVIIa-CTP$_3$

Grupos tratados	Artículo de ensayo	Cantidad de unidades/ animal	Dosis administrada práctica (U/ml)	*Cmax anticipada (U/ml sangre)	Cmax (U/ml)	% de recupera-ción
A	rFVIIa	1.6E+05	1.20E+06	1.40E+05	4.25E+04	30
B	FVIIa-CTP3	1.6E+05	1.29E+06	1.50E+05	9.74E+04	64.
* Cmax anticipada se deriva de la dosis administrada dividida en el volumen de sangre						

Tabla 7:Parámetros de PK de FVIIa-CTP$_3$ vs NovoSeven®

Parámetros PK	NovoSeven®	FVIIa-CTP3
Semivida$_\alpha$ (0.5-12 h)	0.94	1.57
Semivida$_\beta$ (12-48 h)	NA	4.2
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

Ensayo de generación de trombina (TGA)

La generación de trombina es una parte fundamental de la cascada de coagulación y, como tal, una estimación de qué tan bien un individuo en particular puede generar trombina puede correlacionarse con un riesgo de sangrado o trombosis. Las variables que se miden comúnmente cuando se analiza la generación de trombina incluyen: el tiempo de demora, el tiempo hasta la generación máxima de trombina, el pico, el potencial endógeno de trombina [ETP] (es decir, el área bajo la curva y la cola), el curso del tiempo del trombograma ("TG"). Después de un tiempo de demora, se observa una explosión de trombina. Sin embargo, la coagulación ocurre al final del tiempo de demora, cuando más del 95% de toda la trombina aún no se ha formado. El ensayo de generación de trombina se realizó en Omri Laboratories, utilizando reactivos de Thrombinoscope complementados con plasma hemofílico humano. TGA refleja la capacidad de coagulación en el plasma de ratones, derivado de la inyección de NovoSeven® y FVIIa-CTP$_3$. Las Figuras 6A-6C presentan valores de parámetros TGA para plasma de ratones después de la administración de FVIIa-CTP$_3$ o NovoSeven®. Después de la administración de FVIIa-CTP$_3$, los tres parámetros (tasa de generación de trombina, cantidad máxima de trombina generada y KIIa) demuestran una ventaja de FVII-CTP$_3$ sobre el tratamiento con NovoSeven®. Esto refuerza aún más la noción de la superioridad potencial de FVII-CTP3 en comparación con NovoSeven®.

Estudio de la Transección de la Vena de la Cola con FVIIa-CTP$_3$ (TVT):

Esquema de estudio

Los datos obtenidos del ensayo PK/PD para FVIIa-CTP$_3$ proporcionaron información sobre la funcionalidad de FVIIa-CTP$_3$, y demostraron que FVIIa-CTP$_3$ tenía una ventaja farmacocinética en comparación con NovoSeven®. Sin embargo, aún no se ha demostrado la capacidad de la proteína para inducir un coágulo *in vivo*, después de un episodio traumático. Con el fin de evaluar la capacidad de FVIIa-CTP$_3$ para detener el sangrado, se empleó el mismo modelo de ratones deficientes en FVIII para un desafío de sangrado.

A los ratones deficientes en FVIII se les administró una única inyección intravenosa de FVIIa-CTP$_3$ o NovoSeven®. A los ratones se les administró el fármaco en cantidades que proporcionaron una actividad de FVIIa equivalente (1.E05 unidades, 200 µl), calculada de acuerdo con la potencia de cada fármaco evaluado en el ensayo de actividad de coágulo FVIIa (Tabla 8). Las dosis administradas fueron 9 mg/kg de NovoSeven® y 40 mg/kg de FVII-CTP$_3$ debido a la actividad reducida de FVIIa-CTP$_3$. A un grupo de control se le inyectaron 200 µl de vehículo.

La vena de la cola se seccionó a 2.7 cm desde la punta de la cola 15 min (inyección 1), 24 horas (inyección 2) o 48

horas (inyección 3) después de la administración, y se registró la supervivencia de los ratones durante 24 horas.

Tabla 8: Evaluación de muestras inyectadas

	NovoSeven®			*FVIIa-CTP3*			
Injección No.	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad Específica (U/mg)	Conc. proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad Específica (U/mg)	Actividad Específica (normalizada)
1	0.91	8.0E+05	8.8E+05	3.3	6.E+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

La concentración de proteína se determinó mediante A280.

Resultados

Los datos de los grupos de control a los que se inyectó el vehículo para las tres inyecciones (5 animales x 3 inyecciones), se resumieron y se presentan en las Figuras 7A-7D. Se observó una supervivencia del 30% 24 horas después de la transección de la vena de la cola.

Los ratones tratados con NovoSeven® y FVIIa-CTP$_3$ demostraron una actividad hemostática adecuada después de la transección de la vena de la cola realizada 15 minutos después de la administración de FVIIa. Se observó una tasa de supervivencia del 100% en animales tratados con FVIIa-CTP$_3$ y NovoSeven® (Figuras 7A-7D).

La tasa de aclaramiento reducida de FVII-CTP$_3$ que se demostró en el estudio PK/PD se aprecia más claramente después de una transección de la vena de la cola realizada 24 horas después de la administración. Se observa una disminución en la tasa de supervivencia de NovoSeven®. Al igual que en el grupo de control, se observa un 50% de muertes dentro de las 10 horas. Mientras tanto, el 90% de los ratones tratados con FVIIa-CTP$_3$ sobrevivieron (Figura 7A-7D). Este resultado enfatiza la eficacia duradera del tratamiento con FVIIa-CTP$_3$.

48 horas después de la administración, se demuestra una disminución en la tasa de supervivencia en grupos tratados con FVIIa-CTP$_3$ o NovoSeven® (Figura 7C). Se observó una leve mejoría en los ratones FVIIa CTP, pero la diferencia no alcanzó una significancia estadística.

Discusión:

La fusión de CTP con proteínas recombinantes extiende la semivida circulatoria de las proteínas mientras mantiene una actividad comparable. Si bien el mecanismo detrás de la reducción del aclaramiento de la proteína por encima de un tamaño de umbral de 70 KDa se conoce bien con respecto al aclaramiento renal, se logra una protección adicional después de la fusión con CTP. Se cree que la fusión de CTP barre alrededor del escudo de proteínas y lo protege de la escisión proteolítica, aumenta su peso molecular radial debido a la carga altamente negativa y reduce su afinidad a los receptores de depuración hepática.

El presente estudio tuvo como objetivo proporcionar una perspectiva específica sobre el impacto de la fusión de CTP a FVII en la semivida de la proteína y el aclaramiento y también abordar el paradigma de su actividad específica después de esta modificación. A los ratones deficientes en FVIII se les administró una inyección intravenosa única de FVIIa-CTP3 o FVIIa comercial recombinante (NovoSeven®) a una dosis similar (basada en la unidad) y se realizó un análisis basado en la actividad PK. FVIIa-CTP3 demostró una longevidad supenor como se refleja en un aumento de 5 y 3.5 veces en su semivida y el AUC, respectivamente. La actividad específica (U/mg) de FVIIa-CTP calculada por el kit de actividad Staclot® dividida por la concentración de proteína medida por A280 demostró ser 4-5 veces menor que la actividad específica de NovoSeven®.

Para desarrollar la comprensión de cómo el CTP afecta a los efectos hemostáticos de FVIIa *in vivo*, se investigó la capacidad de FVIIa-CTP$_3$ de reducir el sangrado. En el modelo de sangrado de transección 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 desafiados y evitar su sangrado hasta la muerte. En el estudio aquí descrito, a los animales se les administró FVIIa-CTP$_3$ o NovoSeven®. Ambas moléculas eran capaces de mantener la homeostasis cuando se realizó la transección 0.25 horas después de la dosificación. Se demostró una duración de la actividad significativamente prolongada para el grupo tratado con FVIIa-CTP$_3$ cuando se realizó la transección de la cola 24 h después de la dosificación. La tasa de supervivencia del grupo tratado con vehículo fue más alta de lo anticipado y más alta que la obtenida en estudios previos (50% frente a 20% en estudios previos, datos no mostrados). El

porcentaje de supervivencia de los animales tratados se evalúa adicionalmente en momentos anteriores, incluso a las 36 h posteriores a la administración.

En conclusión, se demostró que FVIIa-CTP_3 tiene una mayor duración de la actividad en ratones hemofílicos, lo que se traduce en una mayor duración del efecto hemostático en comparación con NovoSeven®. Los datos recopilados sugieren que la fusión de CTP con FVII es una tecnología con el potencial de mejorar significativamente el tratamiento profiláctico en pacientes con hemofilia.

Ejemplo 2

Propiedades bioquímicas de MOD-5014 en relación con el efecto de hFVIIa recombinante comercial de un péptido carboxi-terminal (CTP) sobre la actividad del factor VIIa

Justificación y resumen del proyecto

Estos estudios se diseñaron para evaluar las propiedades bioquímicas de MOD-5014 en relación con el hFVIIa comercial recombinante, denominado aquí MOD-5000.

Los estudios examinaron:

- Escisión de sustrato sintético de MOD-5014
- Unión del factor tisular (TF) de MOD-5014, medida por la escisión del sustrato sintético
- Unión de TF del MOD-5014 medida por activación del factor X (FX)
- Cinética de activación de FX por MOD-5014 unido a TF
- Unión lipídica de MOD-5014 medida por activación de FX
- Cinética de la activación del factor por MOD-5014 unido a lípidos
- Inactivación de MOD-5014 por la antitrombina (AT)
- Inactivación del MOD-5014 por TFPI

En general, los datos sugieren que, en relación con MOD-5000, MOD-5014 tiene un mecanismo de acción similar con una actividad catalítica ligeramente reducida. Estos resultados demostraron una actividad ligeramente reducida del MOD-5014 unido a TF y una actividad algo más reducida, independiente del TF.

Estos efectos se reflejaron principalmente por las velocidades de reacción en lugar de la extensión de las reacciones, y las reacciones para las que se puede medir todo el curso del tiempo hasta la compleción.

La velocidad ligeramente reducida de inhibición de AT sugiere una extensión de la semivida de MOD-5014 *in vivo* con una respuesta de inhibición adecuada.

Materiales experimentales

- MOD-5014 GMP-1: 2.5 mg/ml (basado en A280)
- NovoSeven Lote nº CU60430: 0.943 mg/ml (basado en A280), denominado MOD-5000.

Escisión de sustrato sintético de mod-5014

Justificación: La escisión del sustrato sintético debe depender exclusivamente de la disponibilidad de un sitio activo funcional.

Métodos: MOD-5000 y MOD-5014 se diluyeron a concentraciones iguales en una base molar. Luego se agregó la misma concentración a una concentración fija del sustrato Pefachrome FVIIa (metilsulfonil-D-ciclohexilalanil-2-aminobutiril-arginina-p-nitroanilida) y se verificó la escisión del sustrato mediante la aparición de un color amarillo.

Resultados

Concentración: FVIIa 360 nM; Sustrato 500 µM

Análisis: La absorbancia a 405 nm se convirtió en concentración de p-nitroanilina utilizando el coeficiente de

extinción conocido. La concentración de p-nitroanilina se representó en función del tiempo para determinar la tasa de sustrato. Los datos se ajustaron a:

$$tasa = k_1[VIIa]$$

k1 = 27.5 mol pNA/min/mol VIIa

Conclusión: Sobre una base molar, MOD-5000 y MOD-5014 tienen la misma velocidad de escisión del sustrato (Figura 8). Para estudios posteriores, la medición de la escisión del sustrato se utiliza como control para diluciones y pipeteado.

Unión de Tf de mod-5014 medida por escisión de sustrato sintético

Justificación: cuando el factor VIIa se une a TF, se produce un cambio conformacional en el factor VIIa que da como resultado un aumento en la tasa de escisión del sustrato. Esto significa que se puede utilizar una mayor división del sustrato para vigilar la unión del factor VIIa a TF.

Métodos: Se agregaron concentraciones variables de MOD-5000 y MOD-5014 a una concentración fija de TF y se incubaron durante 5 minutos. Se añadió sustrato (Pefachrome FVIIa). La escisión del sustrato se vigiló a 405 nm por la apariencia de color amarillo.

Resultados:

Concentración: FVIIa 0-25 nM; TF 8.7 nM; Sustrato 500 µM

Análisis: como la concentración de TF está muy por encima de la Kd esperada, a bajas concentraciones, todo el FVIIa debe estar unido a TF. La tasa de escisión del sustrato será la del complejo VIIa/TF. Una vez que la concentración de FVIIa supera a la de TF, la tasa de escisión del sustrato debería disminuir a la de FVIIa libre. Dado que FVIIa y TF forman un complejo molar 1:1, la concentración de FVIIa a la que se produce el cambio en la velocidad de escisión del sustrato es una verificación de la concentración estimada de FVIIa.

Los datos se ajustaron a:

$$tasa = k_1[VIIa] + k_2[VIIa/TF]$$

	MOD-5000	MOD-5014	
k_1	27.5	27.5	Mol pNA/min/mol VIIa
k_2	365	357	Mol pNA/min/mol VIIa/TF

Conclusión: MOD-5000 (Novoseven) y MOD-5014 muestran el mismo punto de inflexión en la concentración esperada de TF (8.7 nM) (Figura 9). Esto confirma que las concentraciones molares de MOD-5000 y MOD-5014 según lo predicho por la escisión del sustrato son correctas. MOD-5014 tuvo una tasa de escisión del sustrato muy ligeramente menor cuando se unió a TF (98%) en relación con MOD-5000 (Figura 9).

Unión a Tf de mod-5014 medida por la activación del factor x

Justificación: la escisión de FX por FVIIa es lenta en relación con la escisión por el complejo FVIIa/TF. Por lo tanto, la unión de FVIIa a TF se puede evaluar midiendo la tasa de activación de FX.

Métodos: Se agregaron concentraciones variables de MOD-5000 y MOD-5014 a una concentración fija de TF y se midió la velocidad de activación de FX. La activación del factor X se evaluó por escisión del sustrato sintético Pefachrome FXa (metoxicarbonil-D-ciclohexilalanil-glicil-arginina paranitroanilida). La escisión del sustrato sintético se convierte en concentración de FXa mediante una curva estándar. Ni FVIIa ni FVIIa/TF escinden el sustrato FX a una tasa apreciable.

Resultados

Concentración: FVIIa 0-2 nM; TF 10 pM; FX 135 nM; Sustrato 500 µM

La concentración del factor X en plasma es de 8 µg/mL (- 135 nM).

Análisis: La tasa de activación de FX debería aumentar a medida que FVIIa se une a TF. Una vez que todo el TF esté saturado con FVIIa, la tasa de activación de FX habrá alcanzado un valor máximo (Figura 10).

Los datos se ajustaron a:

$$v = V_{max} \frac{[VIIa]^n + [TF] + K_d^n - \sqrt{([VIIa]^n + [TF] + K_d^n)^2 - 4[VIIa]^n[TF]}}{2[TF]}$$

	MOD-5000	MOD-5014	
V_{max}	1.40	1.30	nM FXa/min
K_d	3.3	3.0	pM
Valor límite	0.93	0.91	

Justificación: Existe una cooperatividad negativa muy leve (valor límite <1) en la unión de FVIIa a TF. Esto es lo mismo para MOD-5000 y MOD-5014. Cuando está vinculado a TF, MOD-5014 tiene una tasa de activación de FX ligeramente reducida (93%) en relación con MOD-5000. La afinidad deMOD-5014 por TF es equivalente a la afinidad deMOD-5000 (Figura 10).

Tasa de activación de efectos en función de la concentración de FX

Justificación: La tasa ligeramente reducida de activación de MOD-5014 cuando se une a TF podría ser una consecuencia de la afinidad reducida por FXa o la reducción de la rotación de FX una vez que se vincula al complejo. La medición de la velocidad de activación de FX en función de la concentración de FX estableció los parámetros cinéticos del complejo.

Métodos: Se incubaron concentraciones variables de FX con una concentración fija de complejo FVIIa/TF.

La activación del factor X se evaluó mediante escisión de un sustrato sintético (Pefachrome FXa). La escisión del sustrato sintético se convierte en concentración de FXa mediante una curva estándar.

Resultados

Concentración: FVIIa 1 nM; TF 5 pM; FX 0-1500 nM; Sustrato 500 µM

Análisis: a medida que se agrega más FX, más del complejo FVIIa/TF debe tener efectos FX vinculados hasta el punto en que todos los complejos FVIIa/TF tienen efectos FX vinculados. En ese momento, la reacción estaba limitada por la velocidad a la que se activaba el FX. Por lo tanto, la tasa de activación de FX debería haber aumentado con una concentración creciente de FX, con la forma de la curva aproximándose asintóticamente a una tasa máxima (Figura 123).

Los datos se ajustaron a:

$$v = V_{max}\left(\frac{[S]}{K_m + [S]}\right)$$

	MOD-5000	MOD-5014	
V_{max}	1.78	1.64	nM Fxa/min
K_m	140	120	nM

Conclusión: cuando estaba vinculado a TF, MOD-5014 tenía unrecambio ligeramente reducido de FX (92%) en relación con MOD-5000. La unión de FX al complejo MOD-5014/TF fue la misma que su unión al complejo MOD-5000/TF (Figura 11).

Unión a lípidos de MOD-5014 medida por activación de FX

Justificación: se cree que la activación del factor X en las plaquetas contribuye al efecto hemostático de FVIIa. Se cree que esta actividad plaquetaria se produce en un entorno de bajo TF, o en ausencia de TF. La activación del factor X sin TF se puede estudiar en vesículas lipídicas.

Métodos: La activación del factor X por FVIIa en los lípidos es una función de la unión de la enzima (FVIIa) y el sustrato de proteína (FX). La proporción de lípidos fue PC:PE:PS 41:44:14, diseñada para imitar la composición de plaquetas altamente activadas. Los lípidos se prepararon como grandes vesículas unilamelares (200 nm). Se agregaron concentraciones crecientes de vesículas a FVIIa y FX. La activación del factor X se evaluó mediante la escisión de un sustrato sintético (Pefachrome FXa). La escisión del sustrato sintético se convirtió en concentración de FXa mediante una curva estándar.

Resultados

Concentración: FVIIa 20 nM; FX 500 nM; Lípidos 0-1000 µM; Sustrato 500 µM.

Análisis: La velocidad de generación de FXa se representó frente a la concentración de vesículas lipídicas (Figura 12A). Como se esperaba, la generación de FXa aumentó con las concentraciones crecientes de lípidos ya que había más área de superficie disponible para la reacción. A una concentración suficientemente alta de lípidos, la velocidad de la reacción disminuyó a medida que FVIIa y FX se segregaron en diferentes vesículas lipídicas. Se espera esta respuesta de plantilla para este sistema. Los datos no se ajustaron a una ecuación y las líneas mostradas son solo para referencia visual. La diferencia en la tasa de generación de FXa entre MOD-5000 y MOD-5014 no se debió a diferencias en la afinidad por los lípidos. Esto se muestra en la Figura 12B, donde se representa la tasa de generación de FXa en relación con el máximo para cada uno frente a la concentración de lípidos.

Conclusión: La tasa de activación de FX en ausencia de TF es más baja para MOD-5014 (-60%) en relación con MOD-5000. La afinidad de MOD-5014 para lípidos es la misma que para MOD-5000.

Cinética de la activación de FX por MOD-5014 unido a lípidos

Justificación: La tasa reducida de activación de FX en ausencia de TF para MOD-5014 en relación con MOD-5000 podría ser una consecuencia de la afinidad reducida para FXa o la reducción de la rotación de FX una vez que se une a la enzima en la superficie lipídica.

Métodos: Se variaron concentraciones variables de FX con una concentración fija de FVIIa y vesículas lipídicas. La activación del factor X se evaluó por escisión de un sustrato sintético (Pefachrome FXa). La escisión del sustrato sintético se convirtió en concentración de FXa mediante una curva estándar.

Resultados

Concentración: FVIIa 20 nM; FX 0-2500 nM; Lípidos 100 µM; Sustrato 500 µM.

Análisis: A medida que se agregan más FX, más FVIIa en la superficie del lípido debe tener FX unido hasta el punto en donde todo el FVIIa está unido a FX. En ese punto, la reacción está limitada por la velocidad a la que se activa el FX. Por lo tanto, la tasa de activación de FX debería aumentar con una concentración creciente de FX, aproximándose la forma de la curva asintóticamente a una tasa máxima. Como se esperaba, la afinidad por FX de FVIIa se reduce (Km más alto) en ausencia de TF y la tasa de generación de FXa se reduce en ausencia de TF (Figura 13).

Los datos se ajustaron a:

$$v = V_{max}\left(\frac{[S]}{K_m + [S]}\right)$$

	MOD-5000	MOD-5014	
V_m	0.253	0.115	nM FXa/min
K_m	878	848	nM FXa/min

Conclusión: La tasa de activación de FX en una superficie lipídica en ausencia de TF es menor para MOD-5014 (45%) en relación con MOD-5000. La unión de FX a MOD-5014 en la superficie lipídica fue la misma que su unión a MOD-5000 (Figura 13).

Inactivación de MOD-5014 por AT

Justificación: Se cree que una parte significativa del aclaramiento de FVIIa *in vivo* es a través de la formación de un complejo de FVIIa con AT. La velocidad de esta reacción se puede medir *in vitro* solo cuando FVIIa está unido a TF. Para proceder a una velocidad mensurable, la reacción in vitro también requiere altas concentraciones de heparina, que se cree que imita los efectos de un glicosaminoglicano natural.

Métodos: El factor VIIa se incubó con TF para permitir la formación del complejo. El complejo se incubó con AT y heparina. La reacción se detuvo a intervalos de tiempo mediante la adición de polibreno (bromuro de hexadimetrina) para neutralizar la heparina. La actividad residual de FVIIa/TF se midió mediante la escisión de un sustrato sintético (Pefachrome FVIIa).

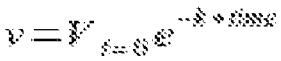
A las concentraciones utilizadas en el ensayo, el polibreno no alteró la escisión del sustrato.

Resultados

Concentración: FVIIa 10 nM; TF 11 nM; A 1 µM; Heparina 5 U/mL; FVIIa/TF 8.2 nM; Polybrene 100 µg/mL; Sustrato 500 µM.

Análisis: La concentración de FVIIa/TF, medida como una tasa de escisión del sustrato, se representó en función del tiempo en minutos (Figura 14). Como se esperaba, la AT/heparina inhibió el FVIIa, lo que lleva a una pérdida de la actividad del FVIIa/TF.

Los datos se ajustaron a:



	MOD-5000	MOD-5014	
V_s	11.89	11.93	
K	0.354	0.217	min^{-1}

Conclusión: Valores similares para la actividad en T = 0 indican que en la reacción estaban presentes cantidades iguales de MOD-5000 y MOD-5014. MOD-5014 se inhibió ligeramente más lentamente (62%) que MOD-5000 (Figura 14). Ambas reacciones procedieron a completar la inhibición.

Inactivación de MOD-5014 por TFPI

Justificación: TFPI es el inhibidor fisiológico del complejo FVIIa/TF. El dominio K2 de TFPI forma un complejo inicial con FXa. Este complejo se une a FVIIa/TPI, donde el dominio KI de TFPI interactúa con FVIIa. Por lo tanto, la activación de FX por FVIIa/TF debería conducir a complejos inhibidos y al cierre de FVIIa-TFPI.

Métodos: Factor VIIa y TF se incubaron juntos para formar un complejo. El complejo se añadió a sustrato TFPI/FX/FXa. La activación del factor X se evaluó por escisión de un sustrato sintético (Pefachrome FXa). La escisión del sustrato sintético se convirtió en concentración de FXa mediante una curva estándar.

Resultados

Concentración - inhibición: FVIIa 1 nM; TF 20 pM; FX 135 nM; TFPI 0-5 nM; Sustrato 500 µM.

Análisis: Como se esperaba, la generación inicial de FXa ocurrió a la misma velocidad en todas las reacciones (Figura 15A-C). En presencia de TFPI, la tasa de generación de FXa disminuyó, ya que el complejo FVIIa/TFPI fue inhibido por TFPI/FXa (dos paneles más bajos). El cierre de los complejos TFPI se produjo más rápidamente a concentraciones más altas de TFPI (dos paneles inferiores). La cantidad de FXa que se formó antes de que se cerrara FVIIa/TFPI es una medida de la interacción de TFPI con FVIIa/TF. Dado que MOD-5014 tiene una tasa de generación de FXa ligeramente reducida que, por lo tanto, ralentizaría la formación de complejos FXa/TFPI, la reacción tardó más tiempo en alcanzar una meseta con MOD-5014 que con MOD-5000.

Conclusión: Como se muestra en el panel superior, la dependencia de la concentración para la inhibición de TFPI de MOD-5014/TF generación de FXa es muy similar a la de MOD-5000. MOD-5014 podría ser ligeramente más sensible a la inhibición de TFPI (124%); alternativamente, esto podría ser un artefacto de la tasa ligeramente más lenta de generación de FXa.

Ejemplo 3

Producción de factor vii activado modificado por ctp

Objetivo

El objetivo del método de producción era desarrollar un proceso aguas arriba de alimentación por lotes mediante tecnología de ADN recombinante utilizando células CHO en un medio químicamente definido, seguido de un proceso aguas abajo robusto y escalable que purifica un MOD-5014 altamente glicosilado y altamente gamma-carboxilado. En otras palabras, para producir y purificar MOD-5014 con el contenido más alto de gamma-carboxilación y eliminar efectivamente las impurezas relacionadas con el proceso y la producción. Fue importante analizar los O-glicanos, los N-glicanos, el porcentaje de ácido siálico, las formas relacionadas con la oxidación, la potencia (testada mediante análisis STA-CLOT), el porcentaje de dominios Gla (o alternativamente el porcentaje de residuos de ácido glutámico no carboxilado y el porcentaje de FVII no activado.

Procedimiento de Producción

Transfección y Selección de Clones Estables

El ADNc que codifica MOD-5014 se transfectó en células CHO (células CD DG44 dhfr-negativas, que están adaptadas para el crecimiento en un medio sin proteínas y en crecimiento en suspensión) y se generaron clones estables limitando las etapas de dilución. Los clones de mayor producción se amplificaron y se seleccionó un clon final para su posterior desarrollo.

Se utilizaron medios libres de componentes animales a lo largo de la derivación de los bancos de células maestras y de trabajo (MCB; WCB). Los clones estables se aislaron limitando las etapas de dilución en el cultivo celular. Los clones de mayor producción se amplificaron con concentraciones crecientes del agente seleccionable. Sobre la base del nivel de duplicación de la población de clones (PDL), la productividad del Factor VII modificado por CTP (picograma por célula por día, PCD) y la densidad celular máxima alcanzada en el medio seleccionado, se aislaron los clones de mayor producción y se utilizaron para preparar los bancos R&D seguidos de la fabricación de un banco de células maestras cuantificadas (MCB) y banco de células de trabajo (WCB).

Proceso Aguas Arriba

Un clon estable de células CHO que expresan MOD-5014 se inoculó de un solo vial del banco de células maestras (MCB) (Etapa 1 de la Figura 16 y se expandió etapa a etapa hasta biorreactores de 1000 L o 2000 L, en suero sin medios químicos definidos complementados con vitamina K y que utilizan un enfoque de alimentación discontinua (Etapas 2-4 de la Figura 16).

El sobrenadante del cultivo celular de producción se analizó para determinar la carga biológica, la endotoxina bacteriana, la productividad y el virus adventicio. El proceso se realizó utilizando biorreactores de 50 L y 200 L para sembrar biorreactores (Etapa 3 de la Figura 16) y un biorreactor de 1000 o 2000 litros para la ampliación (Etapa 4 de la Figura 16). Todas las superficies de contacto con el producto eran desechables, mientras que los equipos de contacto con el producto no desechables eran productos dedicados. Estos equipos fueron limpiados y desinfectados entre lotes. El cultivo se expandió a biorreactores de 50 L y 200 L antes de la inoculación en un biorreactor de 1000 L o 2000 L. La ampliación final y la producción de biorreactores alimentados por lotes se realizaron en biorreactores desechables de 2000 L. La eliminación de las células se realizó utilizando un sistema de filtro desechable (filtro de profundidad Millipore).

La propagación celular se llevó a cabo en un biorreactor de producción, 1000 o 2000 litros (Etapa 4, Figura 16).

El cultivo se incubó en el biorreactor durante aproximadamente 11 días (dependiendo de la viabilidad de las células) a 37 °C, 50% de oxígeno disuelto (DO) y pH 7.1. Durante la ejecución, el pH se cambió a 6.9 hasta que se cosechó, se agregó Alimentación (Refuerzo celular 6) y se agregó vitamina K3. Además, se añadió DMSO al biorreactor. Se añadió solución de alimentación de glucosa al cultivo para mantener una concentración deseada y se añadió un bolo de 1 M de bicarbonato de sodio para mantener una concentración de cultivo deseada. La recolección se realizó utilizando criterios predefinidos. Durante los primeros cuatro días, se tomaron muestras diarias del cultivo celular para el recuento celular, la viabilidad y el análisis metabólico. Desde el día 5, se tomaron muestras del cultivo dos veces al día para el recuento de células, la viabilidad y el análisis metabólico y desde el día 9 también para la productividad específica mediante el método de afinidad por Elisa o HPLC.

El ejemplo presentado aquí utiliza un modo de lote de alimentación pero un experto en la técnica podría desarrollar un modo de perfusión utilizando en general, esquemas similares de crecimiento y purificación. Alternativamente, un experto en la técnica podría desarrollar un método de perfusión en donde la duración de la incubación podría ser incluso de hasta 7-120 días.

Recolección y almacenamiento de células (Etapa 5 de la Figura 16)

La recolección se realizó utilizando un tren de proceso de filtración desechable. Para aclarar la recolección, se realizó una filtración profunda y una filtración de 0.2 µm. La clarificación fue seguida por una filtración de 0.45/0.2 µm. Los filtros de profundidad se lavaron y el líquido residual se expulsó del sistema con aire. El proceso de filtración se realizó con una velocidad de bombeo de $\leq$ 15 L/min y una presión máxima definida. Posteriormente, los filtros se lavaron con tampón Tris-HCl y se soplaron con aire presurizado para aumentar la recuperación del producto.

La recolección clarificada se analizó para determinar la carga biológica, la endotoxina bacteriana, el contenido de proteína específica por ELISA o el método de afinidad por HPLC, SDS-PAGE, transferencia Western, el ensayo ELISA HCP, el ADN residual, el ensayo in vitro de virus, las partículas similares a virus, S+L- y Micoplasma.

Proceso de Purificación y Activación

El esquema de purificación se describe en la Figura 17. El proceso de purificación se basó en cuatro columnas

cromatográficas. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad, cromatografía de modo mixto, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico. La proteína se activó en la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. El proceso de purificación también incluyó etapas de inactivación de virus y nano-filtración.

Ultrafiltración y diafiltración 1 - UFDFI (Etapa 6)

La recolección clarificada se concentró y se diafiltró utilizando etapas de ultrafiltración y diafiltración (UF/DF) basados en filtración de flujo tangencial (TFF). El tamaño de corte del peso molecular nominal del cartucho fue de 30 kDa. La recolección concentrada y diafiltrada se analizó para determinar el contenido de proteína específica mediante ELISA, métodos de afinidad por HPLC, y las endotoxinas y la carga biológica se evaluaron mediante SDS-PAGE, transferencia Western y/o HCP de ELISA.

Inactivación viral por incubación (Etapa 7)

El material se filtró a través de un filtro de 0.22 µm en una bolsa de mezcla estéril. A continuación, se añadió una solución para inactivar el contenido viral, por ejemplo, se añadió solución de Tris/Triton al 10% al volumen de filtrado final, lo que llevó la concentración de Tritón al 1% (p/p). Después de la incubación, antes de cargar en la columna de afinidad, la solución del producto se filtró nuevamente utilizando una unidad de filtro de 0.2 µm. El producto de inactivación viral filtrado se analizó en busca de endotoxinas y la carga biológica utilizando SDS-PAGE y análisis de transferencia Western.

Cromatografía de afinidad (Etapa 8)

Se usó una columna de afinidad para este etapa. La columna se empaquetó a una altura de lecho predefinida. Este etapa se realizó en 2-4 ciclos dependiendo de la cantidad de producto. La proteína específica en la carga se determinó antes de la adición de Triton debido a la interferencia causada por el Triton en el ensayo. La columna de afinidad se equilibró y se cargó con el conjunto inactivado viral y luego se lavó. Se realizó un segundo lavado y el material se eluyó y luego se almacenó a 2-8 ºC para procesarlo al día siguiente. Todas las etapas de cromatografía se realizaron en modo de flujo descendente.

El material eluido se analizó para determinar el producto proteico específico, las endotoxinas, el ADN residual, el contenido de ácido siálico, el porcentaje de gamma-carboxilación, los N-glicanos cargados, el ligando de afinidad de lixiviación residual y la carga biológica utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, que incluye la absorbancia a 280 nm, RP HPLC, AIEX HPLC, SEC-HPLC, HCP ELISA, SDS-PAGE y transferencia Western.

Cromatografía multimodal o en modo mixto (Etapa 9)

Se usó una columna empaquetada con resina de cromatografía de modo mixto o multimodal para este etapa. La columna se empaquetó a una altura de lecho predefinida. La etapa se realizó en 1-4 ciclos dependiendo de la cantidad de producto. La columna se equilibró y se cargó con el material eluido de afinidad diluido, se lavó y el material eluido se recogió y almacenó a 2-8 ºC hasta su posterior procesamiento. El material eluido se analizó para determinar el producto proteico específico, las endotoxinas, el ADN residual, el contenido de ácido siálico, el porcentaje de gamma-carboxilacion, los N-glicanos cargados, el ligando de afinidad de lixiviación residual y la carga biológica utilizando técnicas que incluyeron la absorbancia a 280 nm, RP-HPLC, AIEX HPLC, SEC-HPLC, HCP ELISA, SDS-PAGE y transferencia Western.

Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (Etapa 10)

Se usó una resina HIC para este etapa. La columna se empaquetó a una altura de lecho predefinida. La cromatografía HIC se realizó en 1-4 ciclos dependiendo de la cantidad de producto. La carga de HIC se preparó ajustando el material eluido de la columna de proteína de modo mixto o multimodal con sulfato de amonio. La columna se equilibró y se cargó con el material eluido de la columna de modo mixto o multimodal filtrado ajustado de 0.2 µm, y luego se lavó. El producto se eluyó y luego se almacenó a 2-8 ºC hasta su posterior procesamiento. El material eluido se analizó para determinar la concentración de proteína específica por absorción a 280 nm y SEC-HPLC. Además, el material eluido fue testado en cuanto a endotoxinas y carga biológica.

Ultrafiltración y diafiltración de material eluido por HIC (Etapa 11)

El material eluido por HIC se concentró y diafiltró para reducir el volumen y preparar el material para la etapa de la columna de intercambio aniónico. Una vez que se determinó que el pH y la conductividad estaban en el intervalo, el sistema se drenó y se filtró en una bolsa estéril usando etapas de filtración de 0.5/0.2 µm. El volumen final de concentrado y el material eluido por HIC diafiltrado se almacenó a 2-8 ºC hasta su posterior procesamiento. El material eluido se analizó para determinar el producto proteico específico, las endotoxinas, el ADN residual, el contenido de ácido siálico, el porcentaje de gamma-carboilación, los N-glicanos cargados, el ligando de afinidad de lixiviación residual y la carga biológica utilizando técnicas que incluyeron la absorbancia a 280 nm, RP-HPLC, AIEX

HPLC, SEC-HPLC, HCP ELISA, SDS-PAGE y transferencia Western.

Cromatografía de intercambio aniónico (Etapa 12)

Se usó una columna empaquetada con resina de intercambio aniónico para este etapa. La columna se empaquetó a una altura de lecho predefinida. La carga fue la fracción de material eluido por HIC concentrada, diafiltrada. La activación de FVII a FVIIa ocurrió en la columna de intercambio aniónico. Tras la activación y una etapa de lavado, el producto se eluyó y se recogió para su posterior procesamiento. El material eluido se ajustó a pH, si es necesario. El material eluido se filtró luego a través de un filtro de 0.45/0.2 µm. El material fue almacenado a 2-8 ºC hasta su posterior procesamiento. Todos las etapas de cromatografía se realizan en modo de flujo descendente. El material eluido se analizó para determinar la concentración de proteína específica, el ADN residual y la carga biológica por absorción a 280 nm, RP-HPLC, AIEX HPLC, SEC-HPLC, HCP ELISA, SDS-PAGE y transferencia Western.

Eliminación viral por nanofiltración (Etapa 13)

La eliminación viral se realizó utilizando un filtro de virus Asahi Planova 20N. Se usó un filtro de membrana de 0.45/0.2 µm o 0.1 µm como prefiltro del nanofiltro (filtro Planova 20N). El filtro Asashi Planova 20N se equilibró previamente y se imprimió con un tampón de elución de intercambio aniónico o la formulación final se hizo con el tampón de formulación. El material eluido de intercambio aniónico se hizo pasar a través del tren de filtración a una presión continua y se recogió en una bolsa de bioprocesos estéril. El tren de filtración (filtro planova) se lavó con un tampón de elución de intercambio aniónico o un tampón de formulación para maximizar la recuperación del producto. El filtro se testó en cuanto a integridad antes y después del uso según los procedimientos recomendados por el fabricante. La prueba de uso posterior incluye una prueba de partículas de oro, también según el procedimiento del fabricante. El filtrado viral se analizó para determinar la proteína específica por absorción a 280 nm, RP-HPLC, AIEX HPLC, SEC-HPLC, SDS-PAGE. Además, el filtrado viral se testó en cuanto a endotoxinas y carga biológica.

UFDF-3 y filtración y almacenamiento de la sustancia farmacológica (DS) (Etapa 14)

El filtrado viral se concentró hasta una concentración objetivo de DS (que podría variar de 2 a 100 mg/ml) en la preparación para la filtración y el relleno a granel. El último etapa incluyó la filtración a través de una filtración estéril a través de un filtro de 0.2 µm. Se usó un casete de un solo uso o reutilizable para este etapa con un corte de 3-30 KDa. El producto se concentró en un primer etapa a 5-25 mg/ml de proteína y se diafiltró (DF) en citrato 20 mM, NaCl 150 mM, glicina 13.3 mM, pH 6.4 o citrato 20 mM, arginina 100 mM, trehalosa al 2%, pH 6.2 ($\geq$ 7 volúmenes de DF). El grupo de UFDF-3 se analizó para determinar la proteína específica por absorción a 280 nm. Además, el grupo de UFDF-3 se test en cuanto a las endotoxinas y la carga biológica.

La concentración de producto final se ajustó y se añadió polisorbato-80 (PS-80) a una concentración final de 0.04%. Alternativamente, no se hicieron adiciones. El producto de UFDF-3 ajustado se filtró con un filtro Millipak 100 o Millipak 200. Las soluciones del producto filtrado se dividieron en partes alícuotas y se congelaron a una temperatura de 70 ± 5 ºC. El grupo formulado se testó para determinar la concentración del producto mediante A280. El tampón de formulación era citrato 20 mM, arginina 10 mM, trehelosa al 2%, PS80 al 0.04% a pH 6.2.

Resultados

El proceso de purificación utilizado capturó y purificó el MOD-5014 altamente gamma-carboxilado durante la etapa multimodal (Figura 21), el producto MOD-5014 altamente glicosilado. Además, el porcentaje inicial del MOD-5014 altamente glicosilado se efectúa a partir del proceso de cultivo celular aguas arriba y permanece constante durante todo el proceso de purificación (Figura 19). El proceso mostró una alta capacidad para eliminar las impurezas relacionadas con el proceso, como las formas oxidadas y otras formas relacionadas durante las etapas de purificación multimodal y HIC (Figura 20) y dio como resultado un producto de alta calidad.

El análisis de SDS-PAGE reducido del producto MOD-5014 purificado se muestra en la Figura 18. Se identificaron los siguientes productos aislados (véase la numeración a la derecha): 75 kDa - forma no activada de MOD-5014 (1); 55 kDa - MOD-5014 cadena pesada-CTP-CTP-CTP (2); 25 kDa - MOD-5014 cadena ligera (4); formas de bajo peso molecular (LMW) (3, 5 y 6).

La Tabla 9 muestra los resultados de los procesos de producción para una ejecución de ingeniería (ER) y diferentes ejecuciones de GMP (Good Manufacturing Process) en dos organizaciones de fabricación de contratos (CMO) diferentes. Los detalles incluyen la potencia, porcentaje (%) de MOD-5014 no activado, porcentaje (%) de forma oxidada; porcentaje (%) de residuos de ácido glutámico que no fueron carboxilados (sin dominio de Gla), contenido de ácido siálico (mol/mol) y contenido de O-glicano (mol/mol).

Tabla 9: Atributos de calidad de MOD-5014 purificados

Método	CMO-1		CMO-2	
	ER	GMP1	GMP1	GMP2
Potencia (U/mg)	15564	16720	22478	23608
FVII no activado	2.7	2.4	2.	3.0
Formas oxidadas (%)	4.0	4.9	2.8	3.9
Dominio Gle (%)	9.4	5.5	0.	0.8
Ácido siálico [mol/mol]	17.1	17.1	38.4	17.2
O-glicanos [mol/mol]	12.3	13.2	13.2	12.5

Además, los resultados de CMO-1 mostraron que el porcentaje de N-glicanos cargados era 85.3 (ER) y 84.2 (GMP1).

Conclusión

En conclusión, se desarrolló el proceso de fabricación de lotes a gran escala adecuado para apoyar el desarrollo clínico y la fabricación comercial de MOD-5014. Los resultados respaldan este proceso como un proceso reproducible de fabricación de lotes alimentados para la producción de FVIIa-CTP de acción prolongada altamente glicosilada (MOD-5014). El producto MOD-5014 purificado tenía altos niveles de contenido de O-glicanos y ácido siálico. El producto purificado tenía niveles mínimos de FVII no activado y Gla sin dominio (residuos de Glu que no estaban carboxilados).

Ejemplo 4

Fabricación de Productos Farmacológicos (DP)

La formulación del proceso del producto farmacológico (DP) comienza con la descongelación de la sustancia farmacológica (DS). El producto farmacológico se logra mediante la dilución de la sustancia farmacológica (DS) hasta la concentración requerida utilizando el tampón de formulación o el llenado sin dilución, la filtración aséptica y el llenado de viales estándares 2R u otros envases primarios, tales como cartuchos o jeringas precargadas. Un experto en la técnica apreciaría que la expresión "sustancia farmacológica" (DS) puede abarcar o ser equivalente al ingrediente farmacéutico activo (API). En una realización, un Factor VII modificado por CTP, como se expone aquí, es una sustancia farmacológica (DS) que comprende el fármaco purificado en masa. El experto en la técnica también apreciaría que la expresión "producto farmacológico" (DP) puede abarcar el fármaco finalmente formulado una vez dispensado en un recipiente final, por ejemplo un vial, en condiciones asépticas. En una realización, un Factor VII modificado por CTP, como se expone aquí, es un producto farmacológico (DP) que comprende el Factor VII modificado por CTP finalmente formulado.

Caracterización del Factor VII modificado por CTP

El contenido de polipéptidos modificados por CTP en la recolección y el porcentaje de las formas glicosiladas altas se determinan mediante un método específico de RP-HPLC. La proteína total en la recolección está determinada por el análisis de Bradford. El porcentaje de proteína específica en la recolección producida por un clon seleccionado es superior al 70% en relación con la proteína total en la recolección. Además, el proceso de fabricación en sentido ascendente se desarrolla para permitir un alto porcentaje de la proteína modificada con CTP altamente glicosilada en comparación con la forma baja en glicosilación. La forma altamente glicosilada es la forma objetivo, ya que resulta una extensión más larga de la semivida del polipéptido modificado por CTP.

Contenido de O-Glicano

El glicoperfilado se realiza mediante la liberación de glicanos seguido de un marcaje con glicano con 2-aminobenzamida (2AB), se limpia y se analiza mediante NP-HPLC. Brevemente, se realiza un ensayo de contenido de O-glicano para calcular el número de O-glicanos mol por mol de un Factor VII modificado por CTP. Las unidades de galactosa terminales de los O-glicanos se escinden enzimáticamente de la proteína por la galactosidasa. Estas unidades de galactosa libres se separan en una columna CarboPac PA20 y se detectan con amperometría pulsada. La galactosa (Gal) se cuantifica mediante calibración externa con un patrón de referencia de galactosa. El contenido de galactosa puede relacionarse directamente con el contenido de la estructura de O-glicano, Gal-GalNAc. El análisis de los lotes de sustancias y productos farmacéuticos demuestra una consistencia sólida de lote a lote. Este contenido inesperado de glicosilación robusta es significativo, lo que demuestra que el número de O-glicanos por CTP se mejora sobre el conocido en la técnica.

Muestras de análisis de peso molecular intacto

El análisis del peso molecular de diferentes lotes de DS se realiza con el objetivo de obtener información sobre el número de sitios de glicosilación enlazados en O. Las muestras intactas, así como las muestras desialiladas que

usan neuramnidasa, y las muestras desglicosiladas que usan O-glicosidasa, se analizan mediante LC/ES-MS en línea. El resultado que muestra un alto porcentaje de ocupación de serina es inesperado en comparación con los niveles conocidos en la técnica (solo 4 serinas glicosiladas en comparación con hasta 6 en el Factor VII modificado por CTP fabricado aquí).

Ocupación en el sitio de glicosilación enlazado en O de muestras de proteína modificadas con CTP

La ocupación del sitio de O-glicosilación de 4 lotes de DS diferentes se realiza en una exploración M con el objetivo de obtener información sobre el número de sitios de glicosilación enlazados en O por molécula. Las muestras se desializan usando neuramnidasa seguida de digestión tríptica de muestras reducidas/carboximetiladas. Finalmente, se lleva a cabo un LC/ES-MS en línea para las muestras tratadas y la interpretación de los datos de MS se realiza utilizando un software designado. La evaluación de los datos obtenidos del análisis de las mezclas de digestión trípticas conduce a señales que permiten mapear el 100% de la secuencia proteica. La O-glicosilación puede tener lugar tanto en la región CTP N-terminal como en la C-terminal. Los sitios de ocupación se identifican como residuos de serina después de la prolina, así como dos de las cuatro serinas en las regiones de repetición de la serina. Un total de hasta 18 residuos de serina pueden servir como sitios de unión para O-glicanos. No se detectan diferencias significativas entre los lotes.

Pureza

RP-HPLC separa moléculas de acuerdo con su polaridad. Se utiliza un gradiente de fase móvil desde un disolvente más polar a uno menos polar para eluir las moléculas con una polaridad fuerte antes que las moléculas menos polares. Las formas relacionadas se separan de la proteína nativa utilizando la detección UV a 220 nm. Las áreas de pico relativas (% de área) de las formas relacionadas y el pico principal se pueden calcular integrando las áreas de pico correspondientes. El pico principal de Sustancia Farmacológica y Producto Farmacológico consiste en un área máxima de más del 97%, lo que indica un producto altamente purificado y un proceso de purificación efectivo.

La HPLC de exclusión por tamaño es una técnica cromatográfica que separa las moléculas según el tamaño. Dentro del intervalo de fraccionamiento elegido, las moléculas más grandes se eluyen antes que las moléculas más pequeñas. El mecanismo de separación no es adsorbente y las moléculas se eluyen en condiciones isocráticas. La SEC permite que los monómeros se separen de las formas de mayor peso molecular (como los dímeros y polímeros) de la molécula diana. El método SEC está desarrollado para analizar el contenido de dímeros y polímeros en Sustancia Farmacológica y Producto Farmacológico.

Método de contenido RP-HPLC

Este método se está utilizando para la determinación del contenido de muestras intermedias y la determinación del% de polipéptido modificado por CTP glicosilado en muestras intermedias mediante cromatografía de fase inversa. La fase invertida de HPLC separa las moléculas debido a su polaridad. Las moléculas relativamente no polares se ligan al material de la columna mientras están cargadas y las moléculas polares se eluyen sin lograr una interacción con la columna.

Las moléculas ligadas se eluyen con la ayuda de un gradiente de una solución polar a una menos polar. Las moléculas de polaridad más fuerte se eluyeron primero, seguidas de las moléculas menos polares. La detección se realiza mediante absorción a 214 nm.

Aclaramiento Viral

La capacidad del proceso de fabricación para abordar y mitigar la contaminación del producto farmacológico final con virus endógeno y adventicio ha sido objeto de una evaluación preliminar. Se ha realizado un estudio compatible con GLP de acuerdo con la guía aplicable para productos en investigación que utilizan tres virus modelo que se han incrementado segmentos del proceso de fabricación para cuantificar la capacidad de estos etapas para desactivar o eliminar la población de virus enriquecidos. Con las cantidades de virus expresadas como Títulos Ajustados de log10, el factor de eliminación de log10 se determina simplemente restando el valor para la salida del valor para la entrada. Como números de log10, los factores de aclaramiento son aditivos para derivar un factor de aclaramiento general para todos las etapas evaluados. Se considera que A-MuLV es un virus modelo que representa la posible presencia de retrovirus de CHO; las medidas tomadas para inactivar y eliminar el virus A-MuLV contaminante lograron un factor de eliminación de al menos antilog10, por ejemplo, factor de reducción de log (LRF) de aproximadamente 22, lo que demuestra que el proceso general tiene una capacidad excepcional para la eliminación viral. Para el PPV que es un virus pequeño no envuelto resistente, se obtiene una eliminación robusta mediante la etapa de nanofiltración.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido del Factor VII activo (FVIIa) humano modificado por el péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana que comprende tres moléculas de CTP unidas en tándem al extremo C-terminal de FVIIa, en donde dicho polipéptido del FVIIa modificado por CTP está en una forma de sustancia sustancialmente pura y activa, comprendiendo dicho polipéptido del FVIIa modificado por CTP:

a. un alto contenido de ácido siálico que consiste en al menos 15 mol/mol;

b. una forma de alta glicosilación que comprende un contenido de O-glicano de la menos 10 mol/mol;

c. una forma oxidada baja de dicho FVIIa modificado por CTP que consiste en menos de 5% de forma oxidada;

d. un alto porcentaje de residuos de ácido glutámico carboxilado que consiste en al menos 90% de residuos Gla;

e. al menos 60% de N-glicanos cargados; y

f. una potencia de al menos 10500 U/mg;

y en donde dicho FVIIa modificado por CTP comprende la secuencia de aminoácidos recogida en la SEQ ID NO: 7.

2. El FVIIa modificado por CTP de la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho FVIIa modificado por CTP está estructuralmente presente como un heterodímero de dos cadenas enlazado por disulfuro que comprende un puente disulfuro (S-S) entre el residuo de cisteína 135 y el residuo de cisteína 262 de la SEQ ID NO: 7, y en donde dichas dos cadenas comprenden una cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-152 y una cadena pesada que comprende los aminoácidos 153-490 de la SEQ ID NO: 7.

3. El FVIIa modificado por CTP de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde

a. dicho porcentaje de N-glicanos cargados se selecciona del grupo que consiste en 85.3% y 84.2%; o

b. dicha potencia se selecciona del grupo que consiste en 15563 U/mg, 16720 U/mg, 22478 U/mg y 23608 U/mg.

4. El FVIIa modificado por CTP de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde

a. dicha forma sustancialmente pura y activa comprende al menos el 60% de una forma de alta glicosilación de residuos de ácido glutámicco carboxilado (Gla) de dicho FVIIa modificado por CTP activo;

b. la pureza de dicho polipéptido del FVII modificado por CTP sustancialmente puro y activo es al menos 90%, o se selecciona de 97.3%, 97.6%, 97.4% y 97.0%; o cualquier combinación de los mismos.

5. Un método para fabricar un polipéptido del factor VII activo (FVIIa) humano modificado por el péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana, en donde dicho polipéptido comprende tres moléculas de CTP unidas en tándem al extremo C-terminal de FVII, comprendiendo el método las etapas de:

I. transfectar de manera estable un número predeterminado de células con un vector de expresión que comprende una porción codificante que codificar dicho FVII modificado por CTP,

II. en donde dichas células transfectadas expresan y secretan dicho FVII modificado por CTP;

III. obtener clones celulares que sobreexpresen dicho FVII modificado por CTP;

IV. expandir dichos clones en solución a una escala predeterminada;

V. recolectar dicha solución que contiene dichos clones;

VI. filtrar dicha solución que contiene dichos clones para obtener una solución de recolección clarificada que contiene dicho FVII modificado por CTP; y,

VII. purificar y activar FVII modificado por CTP de dicha solución de recolección clarificada para obtener una solución de proteína purificada que tiene una concentración deseada de FVIIa modificado por CTP; en donde dicho FVIIa modificado por CTP fabricado comprende lo siguiente:

a. una forma poco oxidada de dicho FVIIa modificado por CTP que consiste en menos del 5% de forma oxidada;

b. un alto porcentaje de residuos de ácido glutámico carboxilado que consiste en al menos un 90% de residuos de Gla;

c. al menos un 60% de N-glicanos cargados; y

d. una potencia de al menos 10500 U/mg;

fabricando con ello un FVIIa modificado por CTP, y en donde la secuencia de aminoácidos del FVIIa modificado por CTP fabricado se recoge en la SEQ ID NO: 7.

6. El método de la reivindicación 5, en donde la pureza del polipéptido del FVIIa modificado por CTP es al menos 90% o se selecciona de 97.3%, 97.6%, 97.4% y 97.0%.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en donde

a. dicha etapa de expansión comprende expandir clones obtenidos de un banco de células de trabajo (WCB) que de manera óptima expresa y secreta dicho FVII modificado por CTP o en donde dicha etapa de expansión comprende clones en expansión obtenidos de un banco de células maestras (MCB) que expresan y secretan de manera óptima dicho FVII modificado por CTP;

b. dicho método de fabricación es un proceso sin animales;

c. dichos clones expresan y secretan FVII modificado por CTP a un nivel de al menos 40 mg/l;

d. dichos clones se expanden en solución a través de una serie de etapas de subcultivo hasta el nivel del biorreactor de producción;

e. el aclaramiento viral muestra un factor de reducción logarítmico viral (LRF) de aproximadamente 22;

o cualquier combinación de los mismos.

8. El método de la reivindicación 7, en donde dicho biorreactor comprende un biorreactor desechable o un biorreactor de acero inoxidable o en donde dicho biorreactor funciona como un biorreactor en modo discontinuo alimentado.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en donde dicha purificación de dicha recolección clarificada comprende realizar los siguientes etapas que comprenden:

hacer pasar secuencialmente dicha solución de recolección clarificada a través de una columna de afinidad, una columna de modo multimodal o mixta, una columna de interacción hidrófoba y una columna de intercambio aniónico, en las que el material eluido de intercambio aniónico se somete a una etapa de ultrafiltración/diafiltración;

inactivar los virus presentes en la recolección clarificada o en el material eluido recolectado después de cualquiera de dichas columnas de cromatografía, o cualquier combinación de las mismas, en donde inactivar virus comprende incubar en una solución tóxica para dichos virus o nanofiltración, o cualquier combinación de los mismos;

llegando así a un FVII modificado por CTP purificado.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en donde el patrón de glicosilación del FVIIa modificado por CTP fabricado comprende la glicosilación de al menos 4 sitios de glicosilación enlazados a O por CTP.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-10, en donde

a. dicho FVIIa modificado por CTP comprende un alto contenido de ácido siálico que consiste en al menos 15 mol/mol;

b. dicho alto contenido de O-glicano comprende un contenido de O-glicano que consiste en al menos 10 mol/mol;

c. dicho bajo porcentaje de forma oxidada de dicho FVIIa modificado por CTP consiste en menos del 5% de forma oxidada;

d. dicho alto porcentaje de residuos de ácido glutámico carboxilado (Gla) de dicho FVIIa modificado por CTP consiste en al menos 90% de Gla;

e. dicho porcentaje de N-glicanos cargados se selecciona del grupo que consiste en 85.3% y 84.2%;

f. dicha potencia se selecciona del grupo que consiste en 15563 U/mg, 16720 U/mg, 22478 U/mg y 23608 U/mg;

g. dicho método logra al menos una tasa de recuperación del 20% de un FVIIa modificado por CTP altamente glicosilado; y

h. la tasa de recuperación de dicho polipéptido del FVIIa modificado por CTP es al menos 90% o se selecciona entre 97.3%, 97.6%, 97.4% y 97.0%.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-11, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho FVIIa modificado por CTP fabricado está estructuralmente presente como un heterodímero de dos cadenas enlazadas por disulfuro que comprende un puente disulfuro (S-S) entre el residuo de cisteína 135 y el residuo de cisteína 262 de la SEQ ID NO: 7, y en donde dichas dos cadenas comprenden una cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-152 y una cadena pesada que comprende los aminoácidos 153-490 de la SEQ ID NO: 7.

13. Una composición que comprende el FVIIa modificado por CTP de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

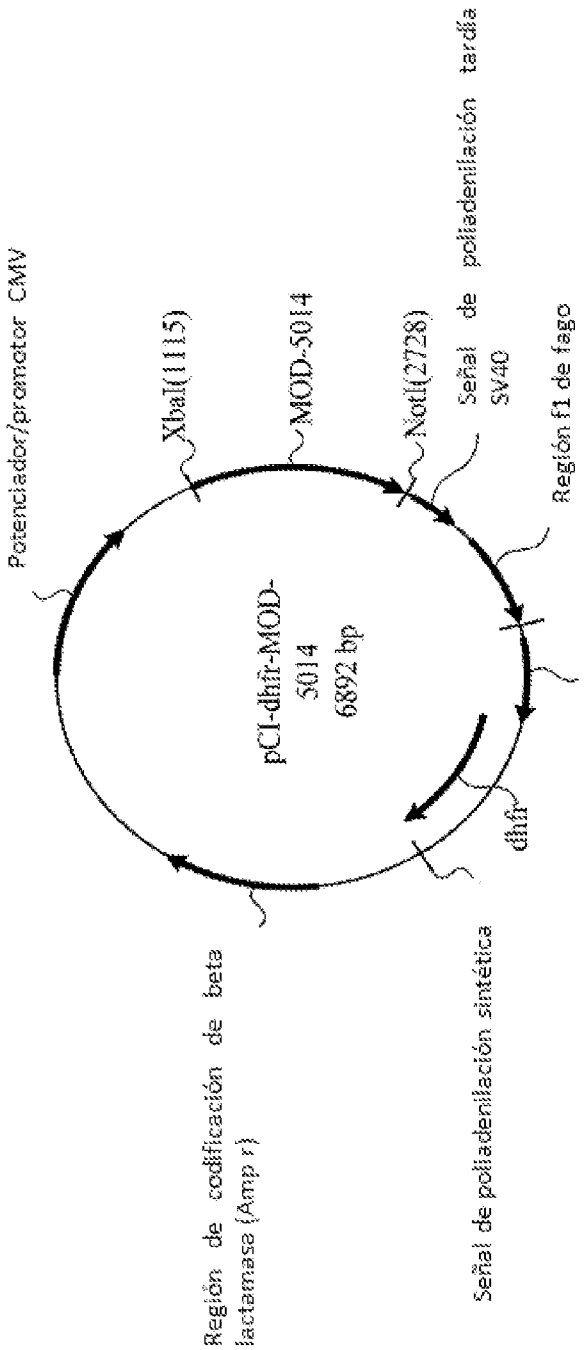

Potenciador/promotor CMV
XbaI(1115)
MOD-5014
NotI(2728)
Señal de poliadenilación tardía SV40
Región f1 de fago
pCI-dhfr-MOD-5014
6892 bp
Región de codificación de beta lactamasa (Amp r)
Señal de poliadenilación sintética
dhfr
Potenciador de SV40 y promotor temprano

FIGURA 1

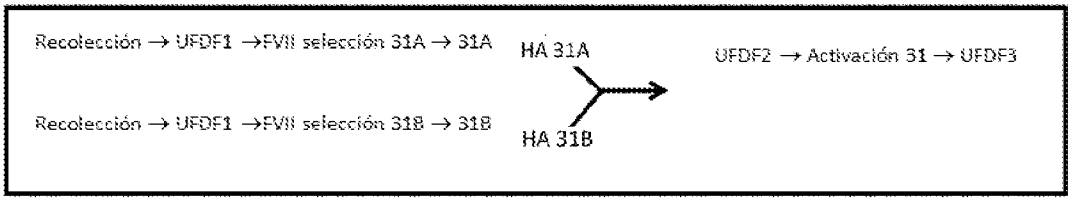


FIGURA 2A

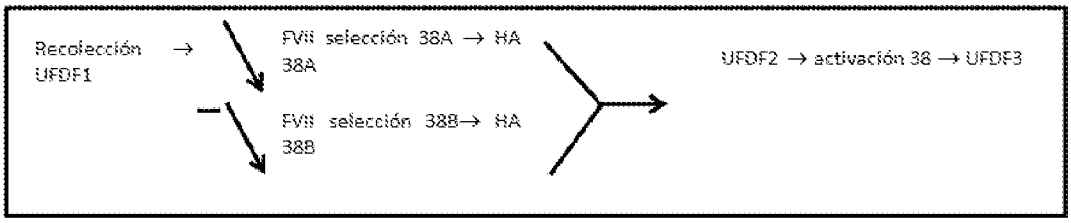


FIGURA 2B

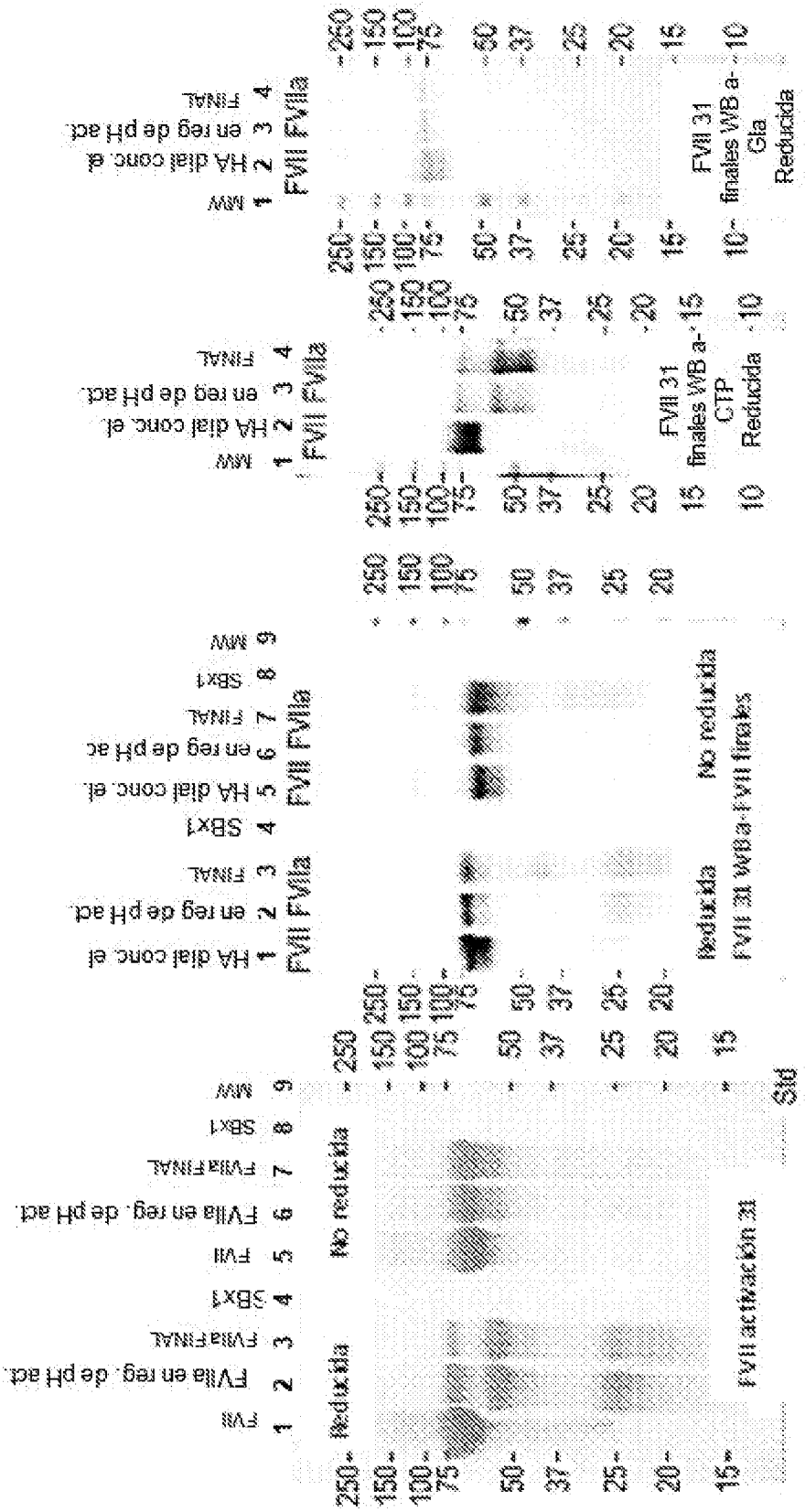


FIGURA 3A

FIGURA 3B

FIGURA 3C

FIGURA 3D

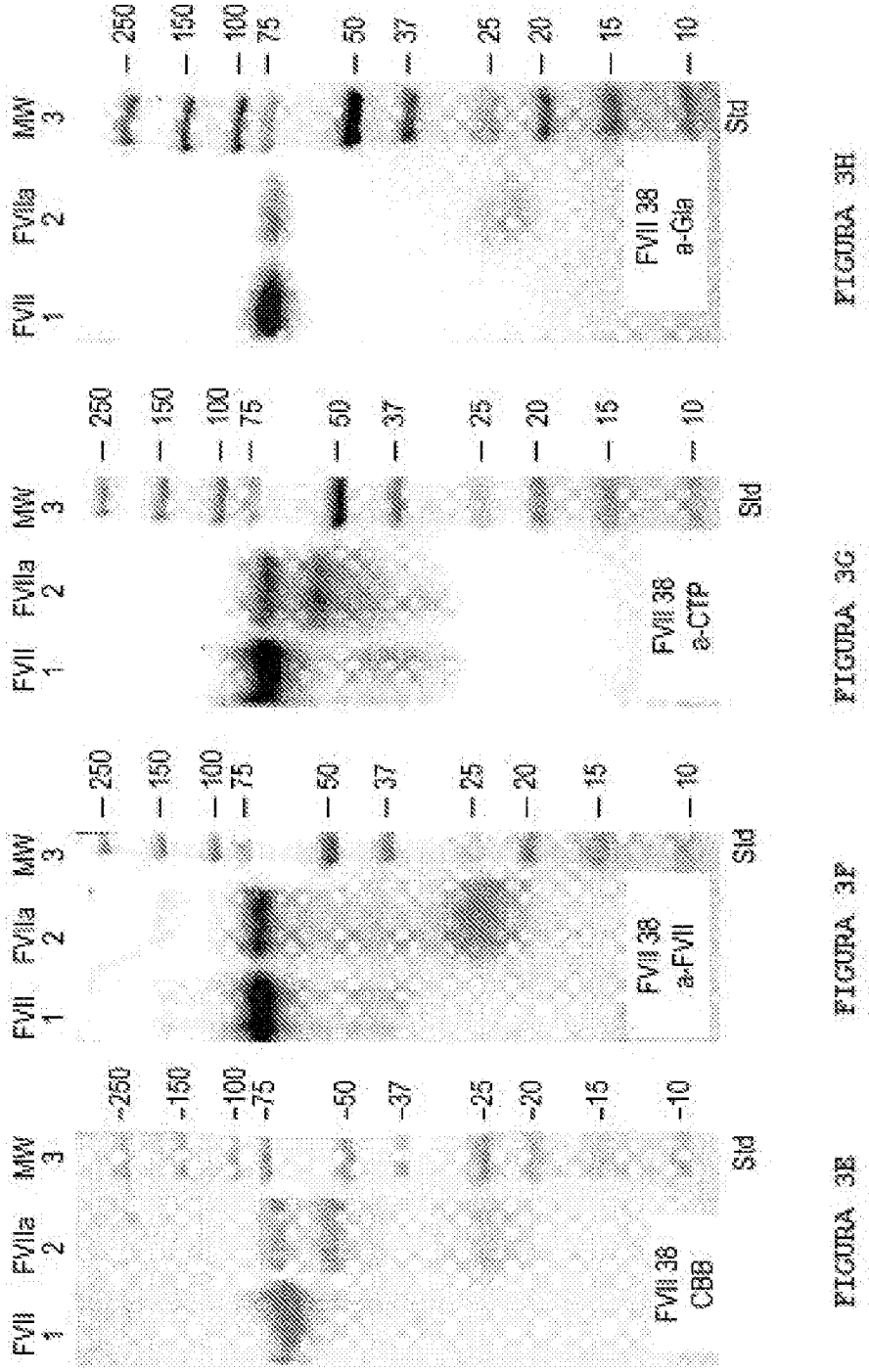


FIGURA 3E FIGURA 3F FIGURA 3G FIGURA 3H

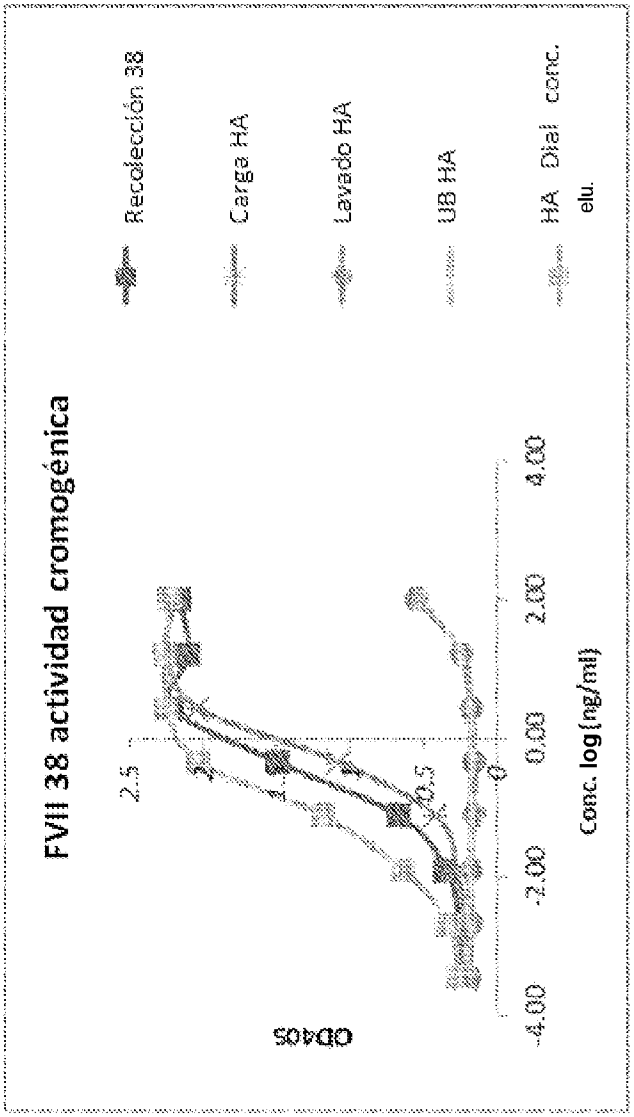

FVII 38 actividad cromogénica
Recolección 38
Carga HA
Lavado HA
UB HA
HA Diaf conc. elu.
OD405
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-4.00
-2.00
0.00
2.00
4.00
Conc. log (ng/ml)

FIGURA 4

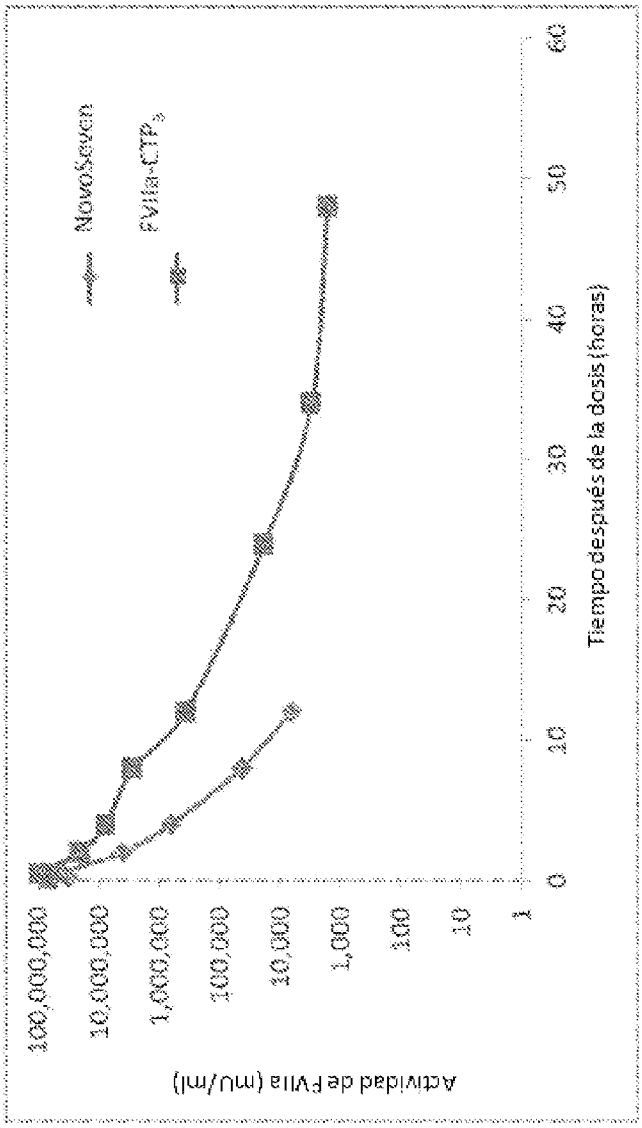

NovoSeven
FVIIa-CTP$_3$
Actividad de FVIIa (mU/ml)
100,000,000
10,000,000
1,000,000
100,000
10,000
1,000
100
10
1
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo después de la dosis (horas)

FIGURA 5

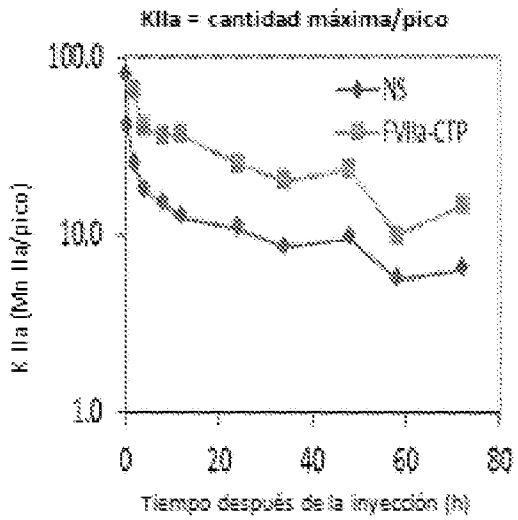


FIGURA 6A

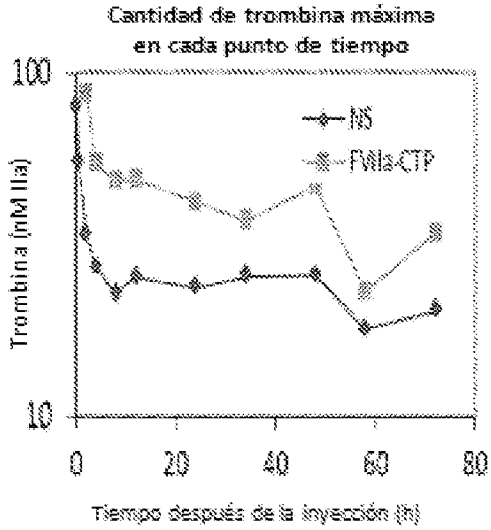


FIGURA 6B

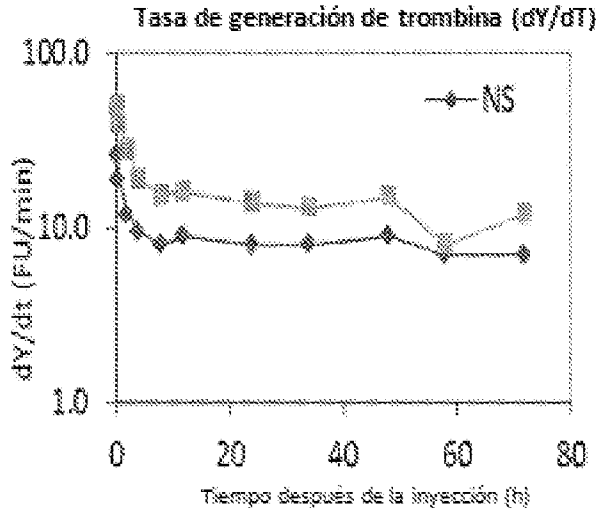


FIGURA 6C

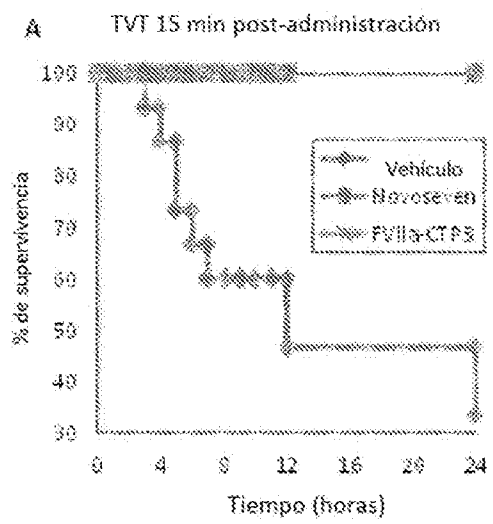


FIGURA 7A

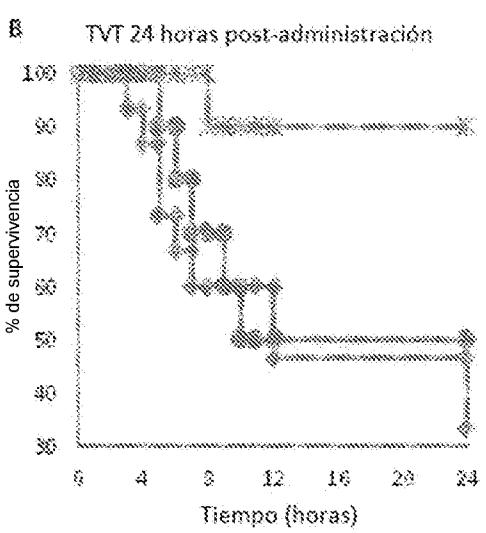


FIGURA 7B

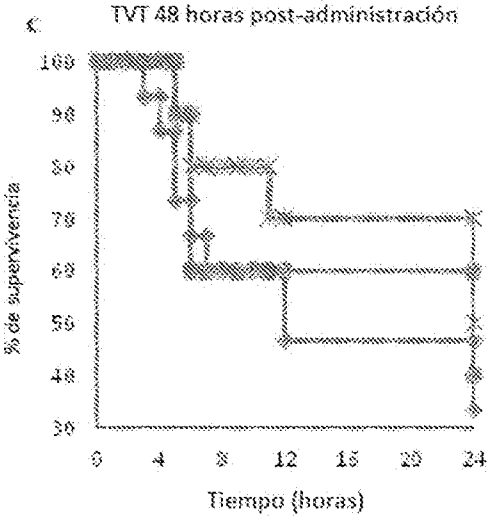


FIGURA 7C

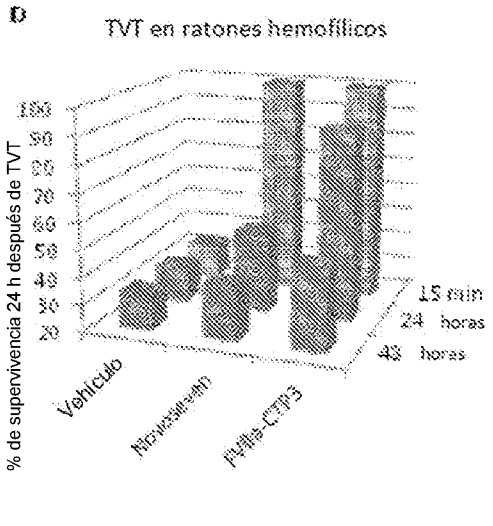


FIGURA 7D

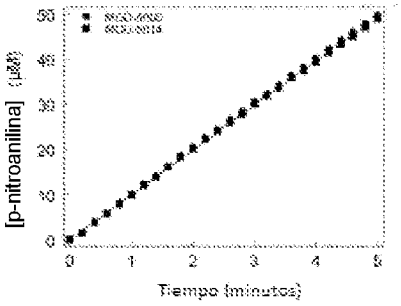


FIGURA 8

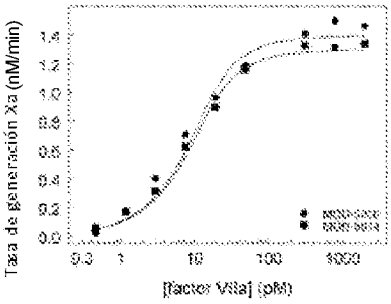


FIGURA 10

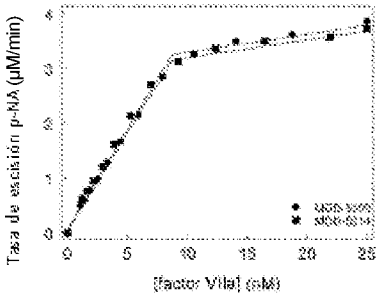


FIGURA 9

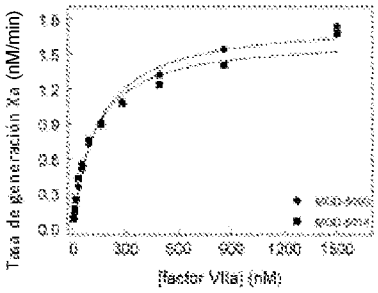


FIGURA 11

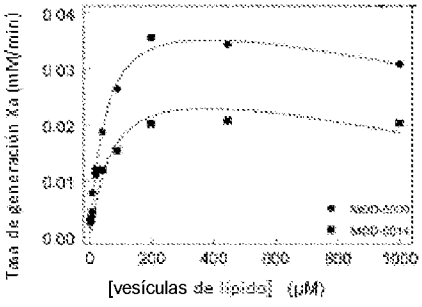


FIGURA 12A

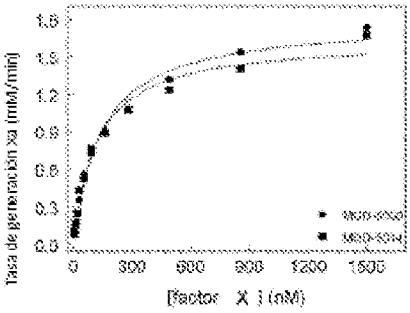


FIGURA 13

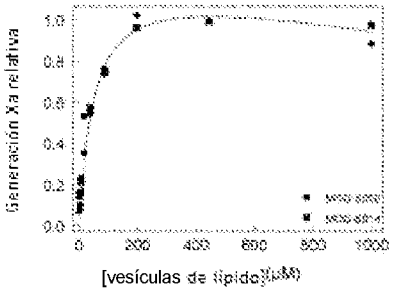


FIGURA 12B

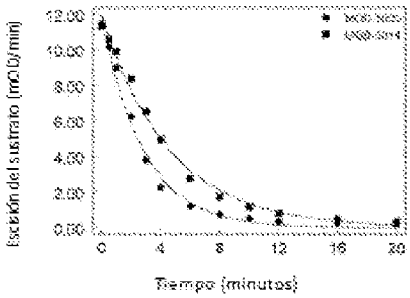


FIGURA 14



FIGURA 15A

FIGURA 15B

FIGURA 15C

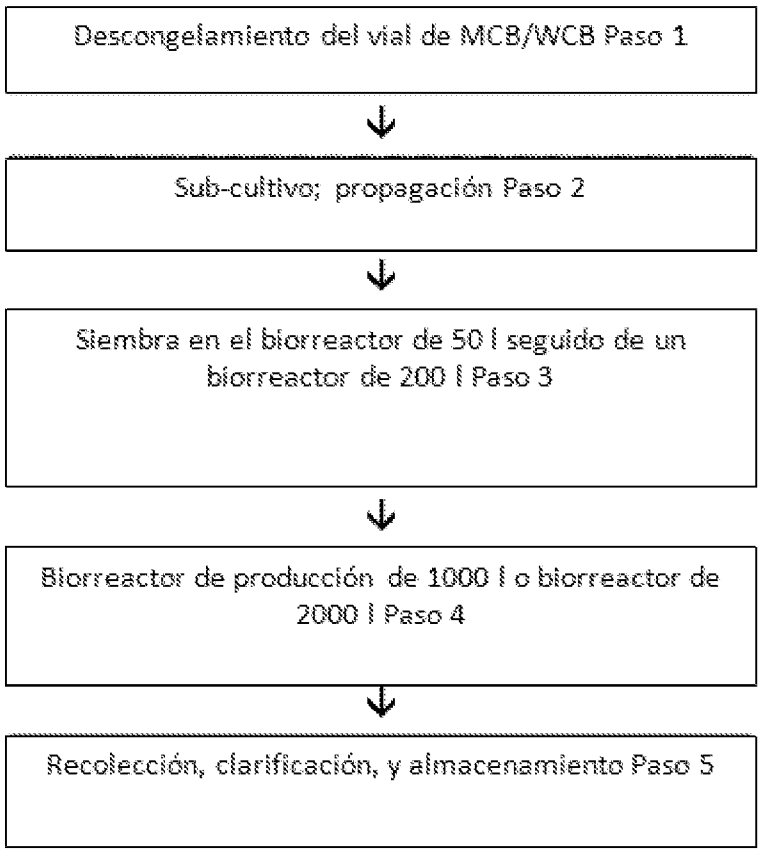

Descongelamiento del vial de MCB/WCB Paso 1
Sub-cultivo; propagación Paso 2
Siembra en el biorreactor de 50 l seguido de un biorreactor de 200 l Paso 3
Biorreactor de producción de 1000 l o biorreactor de 2000 l Paso 4
Recolección, clarificación, y almacenamiento Paso 5

FIGURA 16

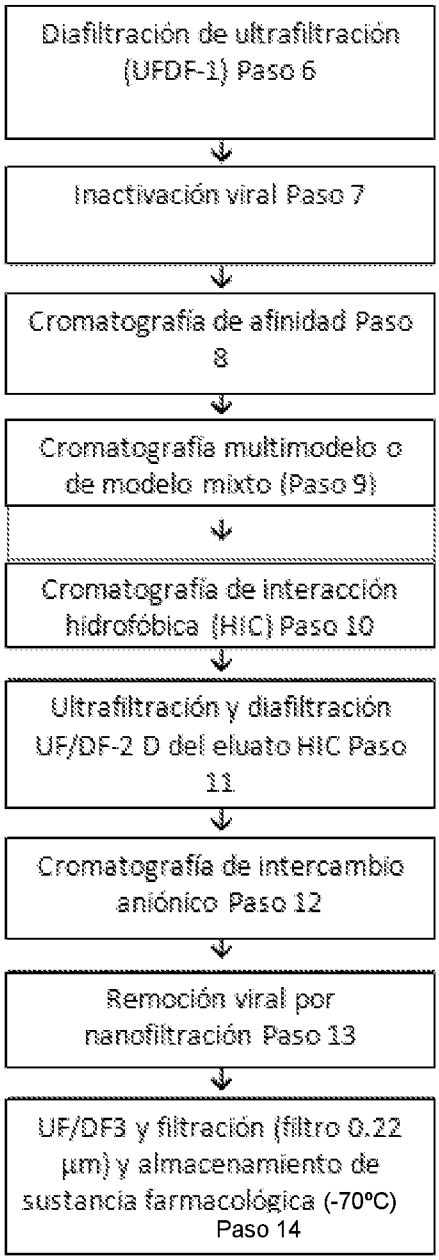

Diafiltración de ultrafiltración (UFDF-1) Paso 6
Inactivación viral Paso 7
Cromatografía de afinidad Paso 8
Cromatografía multimodelo o de modelo mixto (Paso 9)
Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) Paso 10
Ultrafiltración y diafiltración UF/DF-2 D del eluato HIC Paso 11
Cromatografía de intercambio aniónico Paso 12
Remoción viral por nanofiltración Paso 13
UF/DF3 y filtración (filtro 0.22 µm) y almacenamiento de sustancia farmacológica (-70ºC) Paso 14

FIGURA 17

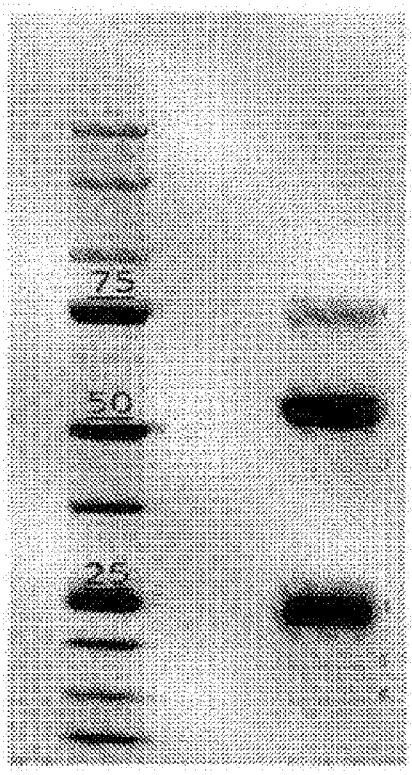


FIGURA 18

Paso de purificación	N-glicanos cargados (%)
Recolección	NA
Inactivación viral + Cromatografía de afinidad VII	80.01
Cromatografía multimodelo o de modo mixto	79.4
UF/DF2	78.5
UF/DF3	79.5

FIGURA 19

Paso de purificación	RP-HPLC(%)		
	Pico principal	Formas oxidadas	Otras formas relacionadas
Recolección	NA	NA	NA
Inactivación viral + Cromatografía de afinidad VII	89.10	4.66	6.23
Cromatografía multimodelo o de modo mixto	91.31	4.38	4.31
Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)	94.03	2.68	3.29
Cromatografía de intercambio aniónico	94.69	2.48	2.83

FIGURA 20

Paso de purificación	Gamma carboxilado (%)
Recolección	NA
Inactivación viral + Cromatografía de afinidad VII	95.4
Cromatografía multimodelo o de modo mixto	100

FIGURA 21

Paso de purificación	Ácido siálico (mol/mol de producto)
Recolección	NA
Inactivación viral + Cromatografía de afinidad VII	15.25
CHT	16.6
UF/DF2	16.6
UF/DF3	16.4

FIGURA 22