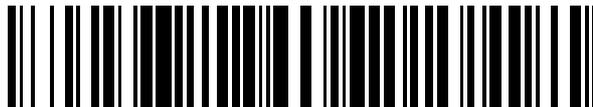


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 569**

51 Int. Cl.:

A61K 38/37 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08759229 .1**

96 Fecha de presentación: **13.06.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2167117**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2010**

54 Título: **Uso de preparaciones FVIII estabilizadas VWF para administración extravascular en la terapia y el tratamiento profiláctico de trastornos de hemorragias**

30 Prioridad:

13.06.2007 EP 07011545

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

11.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

11.12.2012

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

KRONTHALER, ULRICH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 392 569 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de preparaciones FVIII estabilizadas VWF para administración extravascular en la terapia y el tratamiento profiláctico de trastornos de hemorragias

Campo del invento:

- 5 El presente invento se refiere al uso de una preparación de VWF en combinación con un factor VIII de coagulación (FVIII) para una administración extravascular en la terapia y el tratamiento profiláctico de trastornos de hemorragias.

Antecedentes del invento:

10 Un VWF es una glicoproteína adhesiva multimérica presente en el plasma de mamíferos, que tiene múltiples funciones fisiológicas. Durante una hemóstasis primaria, un VWF actúa como un mediador entre unos receptores específicos sobre la superficie de las plaquetas y unos componentes de la matriz extracelular tales como un colágeno. A través del receptor de GP IIb/IIIa, un VWF contribuye a una hemóstasis también a través de una promoción de la interacción entre una plaqueta y otra plaqueta. Más aun, un VWF sirve como un vehículo y como una proteína estabilizadora para un FVIII procoagulante. Un VWF es sintetizado en células endoteliales y megacariocitos como una molécula precursora de 2.813 aminoácidos. El polipéptido precursor, pre-pro-VWF, 15 consiste en un péptido de señal de 22 residuos, un pro-péptido de 741 residuos y el polipéptido de 2.050 residuos encontrado en un VWF de un plasma maduro (Fischer y colaboradores, FEBS Lett. 351: 345-348, 1994). Después de una secreción dentro del plasma, un VWF circula en la forma de diversas especies con diferentes tamaños moleculares. Estas moléculas de VWF consisten en oligómeros y multímeros de la subunidad madura de 2.050 20 residuos de aminoácidos. Un VWF puede ser hallado usualmente en un plasma en forma de un dímero hasta llegar a multímeros que consisten en 50 - 100 dímeros (Ruggeri y colaboradores, Thromb. Haemost. 82: 576-584, 1999). La semivida in vivo de un VWF humano en la circulación humana es de aproximadamente 12 a 20 horas.

El trastorno de hemorragia más frecuente, heredado con la máxima frecuencia en seres humanos, es una enfermedad de von Willebrand (VWD), que puede ser tratada mediante una terapia de reemplazo con unos concentrados que contienen un VWF de origen plasmático o recombinante.

- 25 Un VWF puede ser preparado a partir de un plasma humano, tal como se describe, por ejemplo, en el documento de patente europea EP 05503991. El documento EP 0784632 describe un método para aislar un VWF recombinante.

30 Se sabe que un VWF estabiliza a un FVIII in vivo y, por lo tanto, desempeña un cometido crucial para regular los niveles de FVIII en plasma y, como consecuencia de ello, es un factor principal para reprimir unas hemóstasis primarias y secundarias. Se conoce también que a continuación de una administración por vía intravenosa de preparaciones farmacéuticas que contienen un VWF en pacientes de VWD, se puede observar un aumento en un FVIII:C endógeno a 1 hasta 3 unidades por ml en 24 horas, demostrando el efecto estabilizador in vivo de un VWF sobre un FVIII.

35 Un FVIII es una glicoproteína de plasma sanguíneo con una masa molecular de aproximadamente 260 kDa, producida en el hígado de mamíferos. Él es un componente crítico de la cascada de reacciones de coagulación que conducen a la coagulación de la sangre. Dentro de esta cascada se encuentra una etapa en la que el factor IXa (FIXa), en conjunción con un FVIII, convierte al factor X (FX) en una forma activada, FXa. Un FVIII actúa como un cofactor en esta etapa, siendo requerido con iones de calcio y un fosfolípido para la actividad del FIXa. Los trastornos hemofílicos más corrientes son causados por una deficiencia de FVIII funcional, denominada hemofilia A.

40 Un avance importante en el tratamiento de una hemofilia A ha sido el aislamiento de clones de ADNc (ADN cromosomal) que codifican la secuencia de 2.351 aminoácidos completa de un FVIII (patente de los Estados Unidos nº 4.757.006) y la provisión de la secuencia de ADN del gen de un FVIII humano y de métodos recombinantes para su producción.

45 Un análisis de la secuencia de aminoácidos primaria deducida de un FVIII humano, determinada a partir del ADNc clonado, indica que éste es un heterodímero procesado a partir de un polipéptido precursor más grande. El heterodímero consiste en una cadena ligera terminal de C de aproximadamente 80 kDa en una asociación dependiente de iones metálicos con un fragmento de cadena pesada terminal de N de aproximadamente 210 kDa. (Véase una recopilación hecha por Kaufman, Transfusion Med. Revs. 6:235 (1992)). Se realiza una activación fisiológica del heterodímero mediante una disociación proteolítica de las cadenas de la proteína mediante trombina. La trombina disocia a la cadena pesada para dar una proteína de 90 kDa, y luego para dar fragmentos de 54 kDa y 44 kDa. La trombina disocia también a la cadena ligera de 80 kDa para dar una proteína de 72 kDa. Son la última 50 proteína y los dos fragmentos de cadena pesada (de 54 kDa y 44 kDa anteriores), mantenidos juntos mediante iones de calcio, la/los que constituyen un FVIII activo. Una desactivación se realiza cuando las proteínas de 72 kDa y 54 kDa son disociadas aún más por trombina, una proteína C activada o un FXa. En un plasma, este complejo de FVIII

es estabilizado por asociación con un exceso 50 veces mayor de una proteína de VWF ("VWF"), que manifiesta inhibir la destrucción proteolítica de un FVIII tal como más arriba se ha descrito.

La secuencia de aminoácidos de un FVIII es organizada en tres dominios estructurales, un dominio A triplicado de 330 aminoácidos, un único dominio B de 980 aminoácidos, y un dominio C duplicado de 150 aminoácidos. El dominio B no tiene ninguna homología con otras proteínas y proporciona 18 de los 25 sitios de glicosilación enlazados con asparagina(N) potenciales de esta proteína. El dominio B no tiene aparentemente ninguna función en la coagulación y puede ser suprimido, teniendo la molécula del FVIII con el dominio B suprimido todavía una actividad procoaguladora.

El efecto estabilizador de un VWF sobre un FVIII ha sido usado también para ayudar a la expresión recombinante del FVIII en células CHO (Kaufman y colaboradores 1989, Mol Cell Biol).

Hasta hoy en día, el tratamiento clásico de una hemofilia A y de una VWD implica a infusiones intravenosas de preparaciones de concentrados de FVIII y VWF, derivadas de los plasmas de donantes humanos o, en el caso de un FVIII, las de preparaciones farmacéuticas basadas en un FVIII recombinante. Mientras que estas terapias de reemplazo son generalmente eficaces, p.ej. en pacientes de hemofilia A grave, que están siendo sometidos a un tratamiento profiláctico. Un factor VIII ha de ser administrado por vía intravenosa (i.v.) aproximadamente 3 veces por semana debido a la corta semivida en plasma del factor VIII, de aproximadamente 12 horas. Ya si se alcanzan unos niveles por encima de 1 % de la actividad de FVIII en individuos no hemofílicos sanos, p.ej. mediante un aumento en los niveles de FVIII de 0,01 U/ml, una hemofilia A grave es convertida en una hemofilia A moderada. En una terapia profiláctica se diseñan unos regímenes de dosificación tales que los niveles mínimos de actividad de FVIII no caen por debajo de unos niveles de 2-3 % de la actividad de FVIII en individuos no hemofílicos sanos. Cada administración por vía i.v. es complicada, está asociada con dolor e implica el riesgo de una infección especialmente puesto que ella se realiza en la mayor parte de los casos en un tratamiento doméstico por los pacientes propiamente dichos o por los padres de niños que se han diagnosticado como enfermos de hemofilia A. Además, las frecuentes inyecciones i.v. dan como resultado inevitablemente la formación de cicatrices, interfiriendo con futuras infusiones. Puesto que un tratamiento profiláctico en una hemofilia grave se empieza en una época temprana en la vida, con niños que con frecuencia tienen una edad menor que 2 años, es incluso más difícil inyectar un FVIII 3 veces por semana dentro de las venas de dichos pacientes pequeños. Durante un período de tiempo limitado, la implantación de sistemas de lumbreras, pueden ofrecer una alternativa. A pesar del hecho de que pueden producirse infecciones repetidas y las lumbreras pueden causar inconvenientes durante un ejercicio físico, ellas no obstante son consideradas típicamente como favorables en comparación con unas inyecciones intravenosas.

Por lo tanto hay una necesidad médica grande de evitar la necesidad de infundir un VWF o FVIII por vía intravenosa.

Puesto que un FVIII es una molécula muy grande e inestable, él exhibe una biodisponibilidad muy baja debido a una absorción insuficiente y a una degradación grave, si se administra por vía subcutánea, intramuscular o intradérmica, es decir extravascularmente.

El documento EP0710114 describe que unas formulaciones de FVIII de un FVIII con el dominio B suprimido en una concentración situada por encima de 1.000 UI/ml (unidades internacionales por mililitro) son apropiadas para una administración por vía subcutánea, intramuscular o intradérmica, conduciendo a una biodisponibilidad de 5-10 % a continuación de una administración s.c. (por vía subcutánea) en monos midiendo el área situada por debajo de la curva de actividad de (FVIII:C) y tiempo.

El documento EP0772452 describe que unas formulaciones de FVIII de un FVIII con el dominio B suprimido en una concentración de por lo menos 500 UI/ml conjuntamente con un aditivo orgánico, cuando se administra por vía subcutánea, pueden conducir durante más de 6 horas a un nivel de FVIII en plasma de por lo menos 1,5 % de los niveles normales de FVIII. Usando una gelatina hidrolizada o una emulsión de aceite de soja como el aditivo orgánico y un FVIII con el dominio B suprimido en una concentración de 1.100 UI/ml y en una dosis de 10.000 UI/kg, se observó en monos cinomolgos (macacos) una biodisponibilidad de más que 50 % medida como el área bajo la curva de actividad de (FVIII:C) y tiempo.

El documento EP1258497 divulga una biodisponibilidad de 5,3 % cuando se administraba por vía subcutánea un FVIII con el dominio B suprimido (actividad específica 15.000 UI/mg; dosis 2.500 UI/kg), mientras que un conjugado PEGilado de un FVIII conseguía unas biodisponibilidades de 22 % y 19 % respectivamente en monos cinomolgos.

Los documentos EP 0871649 y EP1258497 divulgan un aumento de la biodisponibilidad de un FVIII con el dominio B pegilado suprimido, y adicionalmente propone estabilizar a un VWF y/o a una combinación de un FVIII y un VWF por conjugación para permitir una administración por vía subcutánea, intramuscular o intradérmica, con el fin de tratar una hemofilia A o una VWD respectivamente.

El documento de solicitud de patente WO 2006/071801 enseña la pegilación de un VWF que se puede administrar mediante inyección, tal como una inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.

5 Se ha encontrado ahora de manera sorprendente que, aunque es una molécula extraordinariamente grande (los multímeros de VWF varían desde 1 MDa hasta 20 MDa), un VWF puede ser recogido en el torrente sanguíneo cuando se administra extravascularmente incluso sin modificaciones covalentes estabilizadoras de ningún tipo, que pueden implicar un riesgo aumentado de respuestas inmunitarias, y que un VWF puede ser usado para intensificar la absorción de un FVIII cuando se administra concomitantemente con un FVIII por vía no intravenosa.

10 El presente invento se refiere por lo tanto a un uso de una composición que comprende un factor de von Willebrand (VWF) y un factor VIII (FVIII) no conjugados, en donde la relación de un VWF:Ag con respecto a un FVIII:C es mayor que 5:1, en donde el FVIII no está modificado químicamente y en donde el VWF se deriva de un plasma humano o se produce por vía recombinante, para la producción de un medicamento destinado al tratamiento de una VWD y/o una hemofilia A para ser administrado por vía extravascular. La relación de un VWF con respecto a un FVIII ha de entenderse, en el sentido del invento, que es la relación de las unidades de un antígeno de VWF con respecto a las unidades de actividad de FVIII.

15 El antígeno de VWF (VWF:Ag) puede ser cuantificado por diversos ensayos inmunológicos, siendo los más frecuentemente usados una electroforesis en cohete de Laurell, un electroinmunoensayo y un ensayo de inmunosorbente enlazado con enzimas (ELISA acrónimo de enzyme - linked immunosorbent assay) [Dalton & Savidge, 1989]. Dalton RG, Savidge GF. Progress in vWf methodology and its relevance in VWD [Progresos en la metodología del VWF y su relevancia en una VWD]. In: Seghatchian MJ & Savidge GF (coordinadores de edición): Factor VIII - Factor de von Willebrand, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida 1989, volumen I, páginas 129-145. Aplicando el mismo patrón como referencia, todos estos ensayos comercialmente disponibles generan unos resultados esencialmente idénticos.

25 La actividad de factor VIII puede ser determinada por medio de un ensayo de una sola etapa (midiendo el tiempo de formación de fibrina en una única etapa de reacción (Rizza y colaboradores, 1982. Coagulation assay of FVIII:C and FIXa [Ensayo de coagulación de FVIII:C y FIXa] en Bloom, coordinador de edición. The Hemophilias [Las hemofilias]. NY Churchill Livingstone 1992)) o un ensayo cromogénico (la velocidad con la que se forma una enzima se mide usando la enzima para la disociación de un sustrato cromogénico (S. Rosen, 1984. Scand J Haematol 33: 139-145, supl.)). Ambos enfoques generan unos hallazgos esencialmente idénticos y se denominan idénticamente también FVIII:C.

30 Tanto para un VWF:Ag como para un FVIII:C una unidad internacional (UI) es definida por la actual norma internacional establecida por la Organización Mundial de la Salud, en donde una UI de FVIII:C o VWF:Ag es aproximadamente igual al nivel de factor VIII o de VWF encontrado en 1,0 ml de un plasma humano recientemente reunido.

35 Por vía de un ejemplo no limitativo, la relación de un antígeno de VWF a una actividad de FVIII puede ser mayor que 5:1, incluso más preferentemente mayor que 15:1 y de manera sumamente preferente mayor que 25:1.

40 De manera preferente se usa un VWF purificado. Un VWF purificado en el sentido del invento comprende unas composiciones de VWF en las que está presente un VWF:Ag en un líquido o, si se almacena en estado liofilizado, en el líquido después de una reconstitución antes de una inyección en una concentración que es más alta por lo menos en un factor de 20, de manera preferida por lo menos en un factor de 75, de manera más preferida por lo menos en un factor de 150, comparada con su concentración en plasma. Preferiblemente, no se usan crioprecipitados resuspendidos ni otras preparaciones de VWF de baja pureza y el VWF purificado es enriquecido a una pureza más alta que en un crioprecipitado. Preferentemente, se usa un VWF con una pureza de más que 1 U de VWF:Ag / mg de proteína total (sin proteínas estabilizadoras añadidas), incluso más preferentemente un VWF con una pureza de más que 10 U de VWF:Ag/mg de proteína total (sin proteínas estabilizadoras añadidas), incluso más preferentemente un VWF con una pureza de más que 25 U de VWF:Ag/mg de proteína total (sin proteínas estabilizadoras añadidas).

50 Preferentemente, se usa un FVIII purificado. Un FVIII purificado en el sentido del invento abarca unas composiciones de FVIII en las que un FVIII:C está presente en un líquido o, si se almacena en estado liofilizado en el líquido después de una reconstitución antes de una inyección en por lo menos un factor de 10, preferentemente en por lo menos un factor de 30, más preferentemente en por lo menos un factor de 70 en comparación con su concentración en plasma. Preferiblemente, no se usa un crioprecipitado resuspendido y el FVIII purificado es enriquecido más altamente hasta una pureza más alta que el FVIII en un crioprecipitado. Preferentemente se usa un FVIII de una actividad específica (FVIII:C/mg de proteína total sin proteínas estabilizadoras añadidas) de 1 UI/mg o más preferentemente de más que 5 UI/mg o incluso más preferentemente de más que 10 UI/mg.

Preferiblemente, la formulación que comprende un VWF en combinación con un FVIII se administra por vía subcutánea. Sin embargo, están abarcadas todas las otras modalidades de administración extravascular, p.ej. una administración por vía intramuscular o intradérmica.

5 Por vía de ejemplo no limitativo, la concentración de VWF puede ser igual a o mayor que 150 U de (VWF:Ag)/ml, preferentemente igual a o mayor que 450 U de (VWF:Ag)/ml, más preferentemente igual a o mayor que 1.500 U de (VWF:Ag)/ml.

Una dosis típica podría ser igual a o mayor que 225 U de (VWF:Ag)/kg, o igual a o mayor que 75 U de (VWF:Ag)/kg, o igual a o mayor que 15 U de (VWF:Ag)/kg.

10 Por vía de ejemplo no limitativo, una dosis típica de una actividad de FVIII podría ser igual a o mayor que 75 U/kg, o igual a o mayor que 25 U/kg, o igual a o mayor que 5 U/kg.

La fuente del FVIII es irrelevante, p.ej. éste se puede derivar de un plasma humano o se puede producir por vía recombinante.

15 Cuando un FVIII es recombinante, puede estar o bien en su forma de plena longitud o preferiblemente en la de un derivado por delección del mismo. Más preferiblemente, el derivado por delección es un factor VIII SQ recombinante (r-VIII SQ). Por el concepto de derivado por delección se entiende aquí un factor de coagulación VIII, en el que falta la totalidad o una parte del dominio B.

20 El concepto de los "polinucleótidos que codifican un VWF o FVIII modificado" como se describe en esta solicitud, se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o poidesoxirribonucleótido que puede ser un ARN o ADN no modificado o un ARN o ADN modificado. El polinucleótido puede ser un ADN de una sola hebra o de doble hebra, o un ARN de una sola hebra o de doble hebra. Como se usa en el presente contexto, el término "polinucleótido(s)" incluye también unos DNA's o ARN's que comprenden una o más bases modificadas y/o bases inusuales, tales como inosina. Se apreciará que se pueden hacer una diversidad de modificaciones en un ADN y en un ARN, que sirven para muchas finalidades conocidas para los expertos en la especialidad. El término "polinucleótido(s)" tal como se emplea aquí, abarca las formas de polinucleótidos modificados por vía química, enzimática o metabólica
25 así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo, por ejemplo, células simples y complejas.

Una persona experta comprenderá, que debido a la degeneración del código genético, un polipéptido dado puede ser codificado por diferentes polinucleótidos.

30 Preferiblemente, el polinucleótido es un polinucleótido purificado. El término polinucleótido "purificado" se refiere a un polinucleótido que está sustancialmente exento de otras secuencias de ácidos nucleicos, tales como y sin limitarse a otros ADN y ARN cromosomales y extra-cromosomales. Unos polinucleótidos purificados pueden ser purificados a partir de una célula anfitriona. Unos métodos convencionales de purificación de ácidos nucleicos, conocidos para los profesionales expertos, pueden ser usados para obtener polinucleótidos purificados. El término incluye también unos polinucleótidos recombinantes y unos polinucleótidos sintetizados químicamente.

35 Se describe adicionalmente un plásmido o vector que comprende el polinucleótido. Preferiblemente, el plásmido o vector es un vector de expresión. En un caso, el vector es un vector de transferencia destinado a usarse en una terapia génica de seres humanos.

Todavía otro caso de la presente descripción es una célula anfitriona que comprende el polinucleótido o el plásmido o vector.

40 Las células anfitrionas se pueden emplear en un método de producir un VWF recombinante y/o un FVIII recombinante. El método comprende:

- a) cultivar células anfitrionas del invento en unas condiciones tales que se expresa un VWF y/o FVIII; y
- b) recuperar opcionalmente un VWF y/o FVIII a partir de las células anfitrionas o a partir del medio de cultivo.

45 El grado y la localización de una glicosilación o de otras modificaciones posteriores a la traducción pueden variar dependiendo de las células anfitrionas escogidas y de la naturaleza del entorno celular de la anfitriona. Cuando se hace referencia a secuencias específicas de aminoácidos, unas modificaciones posteriores a la traducción de dichas secuencias están abarcadas en esta solicitud.

Un "FVIII" como se usa en esta solicitud significa un producto que consiste en la forma no activada de un (FVIII). Los "FVIII" y "VWF" tal como se usan en este invento incluyen unas proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos de FVIII y VWF humanos nativos respectivamente. También, él incluye unas proteínas con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo un extremo terminal de N modificado que incluye delecciones o adiciones de aminoácidos en el extremo terminal de N siempre y cuando que estas proteínas retengan sustancialmente la actividad de FVIII o de VWF respectivamente. Los "FVIII" y "VWF" dentro de la definición anterior incluyen también unas variaciones alélicas naturales que pueden existir y aparecer de un individuo a otro. Los "FVIII" o "VWF", dentro de la definición anterior, incluyen además unas variantes de FVIII o VWF. Dichas variantes difieren en uno o más residuos de aminoácidos con respecto de la secuencia del tipo salvaje. Ejemplos de dichas diferencias pueden incluir una truncación del extremo terminal de N y/o de C por uno o más residuos de aminoácidos (p.ej. por 1 a 10 residuos de aminoácidos), o la adición de uno o más residuos suplementarios en el extremo terminal de N y/o C, p.ej. una adición de un residuo de metionina en el extremo terminal de N, así como unas sustituciones conservativas de aminoácidos, es decir sustituciones realizadas dentro de grupos de aminoácidos con características similares, p.ej. (1) pequeños aminoácidos, (2) aminoácidos de carácter ácido, (3) aminoácidos de carácter polar, (4) aminoácidos de carácter básico, (5) aminoácidos de carácter hidrófobo, (6) aminoácidos de carácter aromático. Ejemplos de dichas sustituciones conservativas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1:

(1)	Alanina	Glicina		
(2)	Ácido aspártico	Ácido glutámico		
(3a)	Asparagina	Glutamina		
(3b)	Serina	Treonina		
(4)	Arginina	Histidina	Lisina	
(5)	Isoleucina	Leucina	Metionina	Valina
(6)	Fenilalanina	Tirosina	Triptófano	

El término "recombinante" significa por ejemplo que la variante ha sido producida en un organismo anfitrión por técnicas de ingeniería genética. La variante de FVIII o de VWF de este invento es usualmente una variante recombinante.

Expresión de las variantes propuestas:

La producción de proteínas recombinantes a altos niveles en apropiadas células anfitrionas requiere el ensamblaje de los ADNc's modificados más arriba mencionados para dar unas eficientes unidades de transcripción conjuntamente con unos apropiados elementos reguladores en un vector de expresión recombinante, que pueden ser propagados en diversos sistemas de expresión de acuerdo con unos métodos conocidos para los expertos en la especialidad. Unos eficientes elementos reguladores de la transcripción se podrían derivar a partir de unos virus que tengan células de animales como sus anfitrionas naturales o a partir del ADN cromosomal de células de animales. Preferiblemente, se pueden usar unas combinaciones de un promotor y un intensificador, que se derivan del Virus de Simio 40, de adenovirus, de virus de polioma de BK, de citomegalovirus humano, o de la repetición terminal larga del virus de sarcoma de Rous, o unas combinaciones de un promotor y un intensificador que incluyen genes fuertemente transcritos constitutivamente en células de animales tales como los de beta-actina o GRP78. Con el fin de conseguir unos altos niveles estables de un ARNm (mensajero) transcrito a partir de los ADNc's, la unidad de transcripción debería contener en su parte próxima a 3' una región de ADN que codifique una secuencia de terminación de la transcripción-poliadenilación. Preferiblemente, la secuencia se deriva de la región de transcripción temprana del Virus de Simio 40, del gen de beta-globina de conejo, o del gen del activador de plasminógeno tisular humano.

Los ADNc's son luego integrados dentro del genoma de un apropiado linaje de células anfitrionas para la expresión de un FVIII o VWF. Preferiblemente, este linaje de células debería ser un linaje de células de animales con origen de vertebrados con el fin de asegurar un plegamiento correcto, la síntesis de dominios Gla, la formación de enlaces de disulfuro, una glicosilación enlazada con asparagina, una glicosilación enlazada con O y otras modificaciones posteriores a la traducción, así como una secreción dentro del medio de cultivo. Ejemplos de otras modificaciones posteriores a la traducción son una hidroxilación y un tratamiento proteolítico de la cadena de polipéptido naciente. Ejemplos de linajes celulares que se pueden usar son células COS de mono, células L de ratón, células C127 de ratón, células BHK-21 de hámster, células de riñón embrionario humano 293 y células CHO de hámster.

El vector de expresión recombinante que codifica los correspondientes ADNc's se puede introducir dentro de un linaje de células de animales en varios modos diferentes. Por ejemplo, se pueden crear unos vectores de expresión recombinante a partir de unos vectores basados en diferentes virus de animales. Ejemplos de éstos son unos vectores basados en baculovirus, virus de vaccinia, adenovirus, y preferiblemente el virus del papiloma bovino.

Las unidades de transcripción que codifican los correspondientes ADN's se pueden introducir dentro de células de animales conjuntamente con otro gen recombinante, que puede funcionar como un marcador seleccionable dominante en estas células con el fin de facilitar el aislamiento de específicos clones de células, que tienen integrado el ADN recombinante dentro de su genoma. Unos ejemplos de este tipo de genes marcadores seleccionables dominantes son la Tn5 amino glicósido fosfotransferasa, que confiere resistencia a la geneticina (G418), la higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a la higromicina, y la puromicina acetil transferasa, que confiere resistencia a la puromicina. El vector de expresión recombinante que codifica dicho marcador seleccionable puede residir o bien en el mismo vector que el que codifica el ADNc de la deseada proteína, o puede ser codificado en un vector separado que es introducido e integrado simultáneamente en el genoma de la célula anfitriona, dando como resultado frecuentemente un apretado enlace físico entre las diferentes unidades de transcripción.

Otros tipos de genes marcadores seleccionables, que se pueden usar conjuntamente con el ADNc de la deseada proteína, se basan en diversas unidades de transcripción que codifican la dihidrofolato reductasa (dhfr). Después de una introducción de este tipo de gen en células que carecen de actividad de dhfr endógena, preferentemente células CHO (DUKX-B11, DG-44) esto habilitará a éstos para crecer en unos medios que carecen de nucleósidos. Un ejemplo de dicho medio es el F12 de Ham sin hipoxantina, timidina y glicina. Estos genes de dhfr pueden ser introducidos conjuntamente con las unidades de transcripción de ADNc del factor de coagulación en células CHO del tipo anterior, enlazadas ya sea en el mismo vector o en diferentes vectores, creando de esta manera unos linajes de células positivos para dhfr, que producen una proteína recombinante.

Si los anteriores linajes celulares se hacen crecer en presencia del agente inhibidor de dhfr citotóxico metotrexato, brotarán nuevos linajes celulares resistentes al metotrexato. Estos linajes celulares pueden producir una proteína recombinante con una velocidad aumentada debido al número amplificado de dhfr enlazadas y las deseadas unidades de transcripción de una proteína. Cuando se propagan estos linajes celulares en unas concentraciones crecientes de metotrexato (1-10.000 nM), se pueden obtener nuevos linajes celulares que producen la proteína deseada a una velocidad muy alta.

Los anteriores linajes celulares que producen la deseada proteína, se pueden hacer crecer a una gran escala, ya sea en un cultivo en suspensión o sobre diferentes soportes sólidos. Ejemplos de estos soportes son unos micro vehículos basados en matrices de dextrano o colágeno, o unos soportes sólidos en la forma de fibras huecas o diversos materiales cerámicos. Cuando se hacen crecer en un cultivo en suspensión de células o sobre micro vehículos, el cultivo de los anteriores linajes celulares se puede realizar o bien como un cultivo en un baño o como un cultivo por perfusión con producción continua de un medio acondicionado durante extensos períodos de tiempo. Por lo tanto, de acuerdo con el presente invento, los anteriores linajes celulares son bien idóneos para el desarrollo de un proceso industrial para la producción de las deseadas proteínas recombinantes.

La proteína recombinante, que se acumula en el medio de células secretoras de los tipos anteriores, se puede concentrar y purificar por una diversidad de métodos bioquímicos y cromatográficos, incluyendo unos métodos que utilizan diferencias en el tamaño, la carga, la hidrofobia, la solubilidad, la afinidad específica, etc., entre la deseada proteína y otras sustancias en el medio de cultivo de células.

Un ejemplo de dicha purificación es la adsorción de la proteína recombinante a un anticuerpo monoclonal, que está inmovilizado sobre un soporte sólido. Después de una desorción, la proteína puede ser purificada adicionalmente por una diversidad de técnicas de cromatografía que se basan en las propiedades anteriores.

Se prefiere purificar al FVIII o VWF biológicamente activo del presente invento hasta una pureza ≥ 80 %, más preferiblemente hasta una pureza ≥ 95 %, y se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente puro que es puro en más de un 99,9 % con respecto a las macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y otros ácidos nucleicos y está exento de agentes infecciosos y pirógenos. Preferiblemente, un FVIII o VWF biológicamente activo aislado o purificado del invento está sustancialmente exento de otros polipéptidos, excepto cuando debería administrarse una combinación de FVIII y VWF.

Las proteínas recombinantes descritas en este invento se formulan para dar preparaciones farmacéuticas destinadas a un uso terapéutico. Las proteínas purificadas se pueden disolver en unas soluciones tamponadoras acuosas fisiológicamente compatibles convencionales, a las que se les pueden añadir, opcionalmente, unos excipientes farmacéuticos para proporcionar unas preparaciones farmacéuticas.

Dichos vehículos y excipientes farmacéuticos así como unas apropiadas formulaciones farmacéuticas son bien conocidas en la especialidad (véase, por ejemplo, "Desarrollo de formulaciones farmacéuticas de péptidos y proteínas", Frokjaer y colaboradores. Taylor & Francis (2000) o el "Manual de excipientes farmacéuticos", 3ª edición Kibbe y colaboradores, Pharmaceutical Press (2000)). La composición farmacéutica que comprende la variante de polipéptido del invento se puede formular en una forma liofilizada o soluble estable. La variante de polipéptido se puede liofilizar mediante una diversidad de procesos conocidos en la especialidad. Las formulaciones liofilizadas son reconstituídas antes del uso mediante la adición de uno o más diluyentes aceptables farmacéuticamente, tales como agua estéril para inyección o una solución salina fisiológica estéril.

Las formulaciones de la composición se suministran al individuo por cualquier medio farmacéuticamente aceptable de administración por vía no intravenosa. Diversos sistemas de suministro se conocen y se pueden usar para administrar la composición por cualquier ruta conveniente. Preferentemente, las composiciones del invento se formulan para una administración por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmica, de manera sumamente preferible para una administración por vía subcutánea, intramuscular o transdérmica de acuerdo con métodos convencionales. Las formulaciones se pueden administrar de una manera continua por infusión o por inyección de bolos. Algunas formulaciones abarcan unos sistemas de liberación lenta.

Los polipéptidos FVII y VWF biológicamente activos modificados del presente invento se administran a los pacientes en una dosis efectiva terapéuticamente, que significa una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados, prevenir o disminuir la gravedad o la diseminación de la condición o indicación que se esté tratando, sin alcanzar una dosis que produzca unos efectos colaterales adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores, tales como p.ej. la indicación, la formulación o el modo de administración, y ha de ser determinada en pruebas preclínicas y clínicas para cada indicación respectiva.

La composición farmacéutica del invento se puede añadir a solas o en conjunción con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden incorporar como una parte del mismo producto farmacéutico.

El modo de administración es preferiblemente por la vía subcutánea, pero abarca todas las rutas de administración extravasculares. Esto significa que deberían ser sumamente preferibles para el paciente unas administraciones superficiales, es decir no vasculares, al contrario que las inyecciones intravasculares. La mayor parte de las administraciones superficiales serían una administración por la vía de superficies epiteliales (sobre la piel). Tendría una utilidad clínica especial una aplicación a través de un parche. Esta administración por vía tópica requiere la absorción a través de la piel, que puede ser sin embargo bastante señalada, no solamente con abrasiones superficiales sino también con una piel intacta, y puede incluir gotas oculares y aplicaciones nasales. Una administración por la vía de superficies epiteliales incluye una inhalación, que es apropiada debido a la superficie extraordinariamente grande que es cubierta con la proteína, conduciendo a una absorción rápida y a una derivación del hígado. Una administración sobre superficies epiteliales incluye unas formas de dosificación que son retenidas en la boca o por debajo de la lengua, es decir que son unas formas de dosificación bucales o sublinguales, posiblemente incluso en forma de una goma de mascar. Puesto que el pH en la boca es relativamente neutro (al contrario que el medio estomacal ácido) esto sería positivo para una proteína inestable tal como un FVIII. Una administración por vía vaginal e incluso rectal puede ser considerada también, puesto que algunas de las venas que drenan el recto conducen directamente a la circulación general. Típicamente, esto es sumamente útil para pacientes que no pueden ingerir sustancias a través de la vía oral, tales como niños pequeños.

La inyección por vía intradérmica (en la piel) sería un modo de administración más invasivo, pero todavía apropiado para un tratamiento sin asistencia ni siquiera ejecución por un personal entrenado. Una administración intradérmica sería seguida por una inyección subcutánea (justamente por debajo de la piel). Típicamente la absorción es bastante sustancial y puede ser aumentada por calentamiento o masaje de la zona de inyección. Alternativamente se puede conseguir una vasoconstricción, dando como resultado el comportamiento opuesto, es decir reducir la adsorción pero prolongar el efecto.

Una administración extravascular incluso más invasiva incluye el suministro por vía intramuscular (dentro del cuerpo del músculo). Esto puede proporcionar beneficios por orillarse el tejido adiposo, pero es típicamente más doloroso que las inyecciones subcutáneas, y especialmente con pacientes caracterizados por un sistema de coagulación deficiente, que ha de ser mejorado por la inyección, existe el riesgo de lesiones de tejidos, dando como resultado hemorragias.

De manera independiente del grado de invasividad, el complejo de VWF:FVIII puede ser cargado en partículas biológicamente degradables, que pueden ser diseñadas para tener una alta afinidad con superficies epiteliales y cargarse con el complejo de VWF:FVIII con el fin de mejorar la adsorción.

Uno de los problemas principales en la terapia de una hemofilia A es el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra un FVIII. Aproximadamente un 25 % de estos pacientes desarrollan anticuerpos inhibidores, que neutralizan la actividad de FVIII. Correspondientemente, la sustitución del FVIII no ayuda ya más a corregir la hemóstasis de un paciente. Mientras que dichos anticuerpos inhibidores son generados típicamente por el primer par de tratamientos, actualmente es muy difícil predecir qué pacientes padecerán de esta complicación. El hecho de que el concentrado particular de FVIII usado desempeña un cometido en esto es un tema de discusión controvertida en la bibliografía científica. A partir de otras proteínas, diseñadas para conseguir una respuesta inmunitaria máxima, es por lo menos claro que el modo de aplicación desempeña un cometido crucial, es decir que las inyecciones i.v. son típicamente menos inmunogénicas que las inyecciones s.c. No obstante, se ha encontrado con sorpresa que si un FVIII es formulado con un VWF incluso si se administra por vía s.c., esta formulación genera en ratones con hemofilia A menos anticuerpos inhibidores que un FVIII administrado por vía i.v. y ciertamente menos anticuerpos inhibidores que una administración por vía s.c. de un FVIII.

Figuras:

- Figura 1: Farmacocinética de 200 U/kg de Monoclate-P[®] inyectado por vía i.v. o s.c. (n = 2/grupo; media + DT (= desviación típica))
- Figura 2: Actividad de FVIII en plasma en ratones ko con FVIII a continuación de 100 U/kg de Monoclate-P[®] por vía i.v. o s.c. y de 1,800 U/kg por vía s.c. (media + DT; n= 4-5/momento = punto de tiempo)
- Figura 3: Nivel de la actividad de FVIII en plasma en ratones ko con FVIII a continuación de 1.800 U de (FVIII:C)/kg de Monoclate-P[®] o Haemate[®] P (media +DT; n = 4-5/momento)
- Figura 4: Actividad de FVIII media + DT hasta 2 días a continuación de una inyección s.c. de 900 o 1.800 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P (n = 5/momento)
- Figura 5: Actividad de FVIII media ± DT hasta 2 días a continuación de una inyección s.c. de 400 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P, caracterizada por una relación de VWF:Ag/FVIII:C variada (n = 5/momento)
- Figura 6: Curso en el tiempo de una actividad de FVIII media + DT hasta 2 días a continuación de una inyección s.c. de 200 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P, caracterizada por una relación de VWF:Ag/FVIII:C típica y aumentada (n = 5/momento)
- Figura 7: Aumento de la AUDC (FVIII) por una relación de VWF:Ag/FVIII:C aumentada
- Figura 8: Tiempo de formación de coágulos (in TEM) a continuación de una inyección s.c. de Haemate[®] P (n = 7-24; media +DT)
- Figura 9: Alfa (in TEM) a continuación de una inyección s.c. de Haemate[®] P (n = 7-24; media +DT)
- Figura 10: Comparación de la farmacocinética de un FVIII:Ag humano en ratones ko con FVIII a continuación de una inyección i.v. de 100 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P o Helixate (media + DT; n = 3-5/momento)
- Figura 11: Comparación de la farmacocinética un FVIII:Ag humano en ratones ko con VWF a continuación de una inyección i.v. de 50 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P o Monoclate P (media + DT; n = 5-6/momento)
- Figura 12: Comparación de la actividad de FVIII en plasma a continuación de una inyección s.c, de 400 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P a ratones ko con FVIII y ko con VWF (media + DT, n = 4-5/momento)
- Figura 13: Curso en el tiempo de un VWF:Ag a continuación de una inyección s.c. de 2.300 U de (VWF:Ag)/kg de Haemate[®] P a conejos (media +DT, n = 4/momento)
- Figura 14: Curso en el tiempo de un nivel de VWF:Ag, VWF:RCo y FVIII:C en plasma medio + DT hasta 3 días a continuación de una inyección s.c. de 523 U de (VWF:Ag)/kg (n = 5/momento)
- Figura 15: Cometido del VWF para la generación de anticuerpos anti-FVIII y de anticuerpos inhibidores de FVIII (ensayo de Bethesda) a continuación de una administración por vía i.v. o s.c. de FVIII.
- Figura 16: Curso en el tiempo de los niveles en plasma de la actividad de FVIII ± DT a continuación de una inyección s.c. de 500 U de preparaciones de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P, caracterizada por diferentes relaciones de VWF:RCO / VWF:Ag (n = 4/momento).

Ejemplos comparativos

- Ejemplo 1:** Averiguación de la disponibilidad de Monoclate-P[®] aplicado por vía s.c. en conejos.

200 U/kg de un FVIII (Monoclate-P[®]) se administraron por la ruta intravenosa (por una vena de oreja) en t = 0 o a través de la ruta subcutánea (por el cuello) en t = 0 mediante una única inyección a conejos CHB, que pesan aproximadamente 2,5 - 3 kg. Se sacaron muestras de sangre a través de la vena de oreja (contralateralmente en el caso de una inyección i.v.) para la determinación de un antígeno de FVIII antes de la adición dosificada (en la línea de base) y a los 5, 15, 30, 45 min., y a las 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h (Tabla 1). La sangre fue anticoagulada como sangre con 10 % de citrato. El FVIII:Ag humano fue cuantificado en un plasma, elaborado a partir de sangre por centrifugación usando un ELISA comercial; de Cedarlane Laboratories Ltd. El plasma fue almacenado a -20°C antes de un análisis. La Figura 1 ilustra la mala biodisponibilidad de un FVIII plasmático de alta pureza aplicado por vía subcutánea. Solamente una cantidad diminuta del FVIII inyectado s.c. alcanzó el torrente sanguíneo. Los niveles de

picos en plasma llegaron a aproximadamente 0,05 U/ml, lo que está próximo al nivel de la línea de base de 0,03 U/ml, correspondiente a la reactividad cruzada del ELISA con proteínas de conejo. La AUDC relativa, corregida por la línea de base (biodisponibilidad) del Monoclato-P[®] era baja, esto es < 5 %.

La AUDC es el área bajo la curva de datos de concentración en plasma y de tiempo (calculada de acuerdo con la regla trapezoidal) y la biodisponibilidad se calcula como (AUDC (s.c.) X Dosis (i.v.)) / (AUDC (i.v.) X Dosis (s.c.)).

Tabla 1: Grupos con tratamiento (conejos) para la averiguación de la biodisponibilidad de Monoclato-P[®] aplicado por vía s.c.

Nº	Tratamiento	Dosis de FVIII:C /volumen / esquema / ruta	Concentración de FVIII	N (m/f)
1	Monoclato-P [®]	200 U/kg / 2,2 ml/kg / i.v.	91 U/ml	1 m / 1 f
2	Monoclato-P [®]	200 U/kg / 2,2 ml/kg / s.c.	91 U/ml	1 m / 1 f

* m = masculino, f = femenino

Ejemplo 2: Averiguación de la biodisponibilidad de Monoclato-P[®] aplicado por vía s.c. en un modelo de hemofilia A (ratones ko con FVIII)

Unos conejos sanos usados como un modelo para averiguar la biodisponibilidad relativa de Monoclato-P[®] en el Ejemplo 1 tienen un nivel normal fisiológico de un FVIII endógeno. Esta circunstancia puede inhibir la resorción de Monoclato-P[®] a continuación de una inyección s.c. dando como resultado una subestimación de su biodisponibilidad relativa. Además, un enfoque basado en un antígeno se requirió en el modelo de conejos para realizar una cuantificación específica que permitiese una diferenciación entre el FVIII humano endógeno y el aplicado exógenamente. Un método basado en un antígeno, sin embargo, no permite sacar conclusiones acerca de la actividad funcional del FVIII resorbido.

Para tratar este tema, unos ratones knockout (ko) [desprovistos de inmunidad] con FVIII, que pesaban aproximadamente 25 g, se usaron con un modelo de hemofilia A. Estos ratones no expresan nada de FVIII (Bi L. y colaboradores Nature genetics, 1995, volumen 10(1), 119-121; Bi L. y colaboradores Blood, 1996, Vol 88 (9), 3446-3450). Esto permite la cuantificación de la actividad de FVIII administrado experimentalmente en el plasma de los ratones ko con FVIII. 100 U/kg o 1.800 U/kg de un FVIII (Monoclato-P[®]) se administraron a través de la ruta intravenosa (por la vena de cola) en t = 0 mediante una única inyección. Con el mismo diseño, se administraron 100 U/kg del FVIII (Monoclato-P[®]) por la ruta subcutánea (por el cuello). Bajo una anestesia a corto plazo, unas muestras de sangre se sacaron retroorbitalmente, se anticoagularon usando citrato de calcio para dar una sangre con 10 a 20 % de citrato, se elaboraron para dar un plasma y se almacenaron a -20°C para la determinación de la actividad de FVIII. Para la inyección i.v., los momentos de las tomas de muestras fueron: En la línea de base, en los 5, 30 min, y en las 2, 4, 6 y 24 h, para inyecciones s.c., se tomó una muestra adicional en t = 8 h (Tabla 2). Una cuantificación de la actividad de FVIII en plasma se realizó mediante un enfoque clásico basado en el aPTT (Temporizador de Coagulación de Behring).

Tomados conjuntamente, los resultados obtenidos a partir de ratones ko con FVIII estaban en línea con los resultados obtenidos a partir de conejos. La AUDC_{0-1d} para 100 U de (FVIII:C)/kg de Monoclato-P[®] por vía i.v. fue de aproximadamente 27,8 h.U/ml, y para la misma dosis aplicada por vía s.c. fue de 1,5 h.U/ml, correspondientes a una biodisponibilidad de aproximadamente 5 %. El hecho de aumentar la dosis administrada por vía s.c. casi en 20 veces hasta 1.800 U/kg dio como resultado un aumento de la AUDC_{0-1d} por solamente un factor de aproximadamente 2,5 veces (Figura 2).

Tabla 2: Grupos en tratamiento (ratones ko con FVII) para la averiguación de la biodisponibilidad de Monoclato-P[®] aplicado por vía s.c.

Nº	Tratamiento	Dosis de FVIII:C / volumen / esquema / ruta	Concentración de FVIII	N (total)
1	Monoclato-P [®]	100 U/kg / 0,2 ml / 20 g / i.v.	10 U/ml	35
2	Monoclato-P [®]	100 U/kg / 0,2 ml / 20 g / s.c.	10 U/ml	30
3	Monoclato-P [®]	1.800 U/kg / 0,4 ml/kg / s.c.	90 U/ml	40

Ejemplo 3: Averiguación de la biodisponibilidad de Haemate[®] P administrado por vía s.c. en un modelo de hemofilia A (ratones ko con FVIII)

Sorprendentemente, cuando la misma dosis de FVIII se administró por vía s.c. a ratones ko con FVIII usando un producto que contenía un VWF (Haemate[®] P) se observó un manifiesto aumento de la actividad de FVIII en plasma (Figura 3). Usando el mismo diseño de estudio y los mismos métodos que en el Ejemplo 2, la AUDC_{0-2d} era llamativamente alrededor de 2 veces mayor con Haemate[®] P en comparación con la misma dosis de Monoclato-P[®] (Tabla 3): La concentración de pico en plasma conseguida por el Haemate[®] P fue aproximadamente 2,5 a 3 veces

más alta, con una diferencia máxima de hasta 10 veces. A partir de esta diferencia, se puede sacar una conclusión firme acerca del cometido beneficioso de un VWF para la resorción de un FVIII desde el espacio subcutáneo. Para explorar aun más el cometido del VWF, la dosis de Haemate[®] P fue reducida por un 50 % hasta 900 U de (FVIII:C)/kg en un experimento repetido (Tabla 4; Figura 4). Sorprendentemente, esto no condujo a una AUDC_{0-1d} más pequeña (Tabla 5). Frente al fondo de este resultado, aparece como plausible que, con dichas altas dosis, los mecanismos de resorción pueden ser saturados. La averiguación de la mejoría conseguible por una solución que contenía VWF, por lo tanto, subestima el aumento de los niveles de FVIII en plasma, que se pueden conseguir.

Tabla 3: Comparación de la AUDC para el nivel de la actividad de FVIII en plasma en ratones ko con FVIII a continuación de 1.800 U/kg de Monoclate-P[®] o Haemate[®] P

Nº	Tratamiento	AUDC _{0-2d} [h.U/ml]	Relación de VWF:Ag/FVIII:C
1	1.800 U de (FVIII:C) / kg de Haemate [®] P	11,2	3:1
2	1.800 U de (FVIII:C) / kg de Monoclate-P [®]	5,6	

Tabla 4: Grupos en tratamiento (ratones ko con FVIII) para estudiar el efecto de una reducción de la dosis

Nº	Tratamiento	Dosis de (FVIII:C) / volumen/ esquema / ruta	Concentración de FVIII	N (total)
1	Haemate [®] P	1.800 U/kg / 0,56 ml/20 g de peso corporal / un único t = 0 / s.c.	64 U/ml	40
2	Haemate [®] P	900 U/kg / 0,64 ml/20 g de peso corporal / un único t = 0 / s.c.	28 U/ml	40

Tabla 5: Comparación de la AUDC para el nivel de la actividad de FVIII en plasma en ratones ko con FVIII a continuación de 900 y 1.800 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P

Nº	Tratamiento	AUDC _{0-1d} [h.U/ml]	Relación de VWF:Ag/FVIII:C
1	1.800 U de (FVIII:C) / kg de Haemate [®] P	9,8	3:1
2	900 U de (FVIII:C) / kg de Haemate [®] P	9,2	

Ejemplo 4: Averiguación del cometido de la relación de VWF:Ag/FVIII:C para la biodisponibilidad de un FVIII en ratones con hemofilia A

Estando dado el hallazgo sorprendente del impacto de un VWF, la relación del VWF:Ag con respecto al FVIII:C en la solución aplicada se hizo variar sistemáticamente. La relación de VWF:Ag/FVIII:C en Haemate[®] P está situada típicamente en el intervalo de aproximadamente 3:1. Como una siguiente etapa, se ensayó una relación de VWF:Ag/FVIII:C de 0,9:1 (Tabla 6). Se aplicaron los mismos métodos que en el Ejemplo 2. La Figura 5 ilustra que en un nivel de dosis de 400 U de (FVIII:C) / kg de FVIII:C, el nivel en la línea de base todavía no se había alcanzado después de aproximadamente 48 h para Haemate[®] P (relación de VWF:Ag/FVIII:C de 3:1). Para la solución "baja en VWF:Ag" el nivel de FVIII:C volvió a la línea de base ya después de aproximadamente 30 horas. Además, con la relación de VWF:Ag/FVIII:C de 3:1, los niveles de pico de FVIII en plasma fueron aproximadamente de 2 veces a 3 veces más altos en comparación con la relación de 0,9:1. El hecho de disminuir la relación de VWF:Ag/FVIII:C desde 3:1 a 0,9:1 redujo la AUDC_{0-2d} hasta justo un 22 % de la AUDC_{0-2d} conseguida con la formulación en la relación de 3:1. Se puede sacar la conclusión de que, con este nivel de dosis, el hecho de aumentar la relación de VWF:Ag/FVIII:C aumenta la AUDC y los niveles de pico de FVIII en plasma y da como resultado un período de tiempo más largo con elevados niveles de FVIII en plasma. En otro experimento adicional, se ensayó una relación de VWF:Ag/FVIII:C de 6,5:1 (Tabla 6) en un nivel de dosis de 200 U de (FVIII:C)/kg. Sorprendentemente, el hecho de aumentar la relación de VWF:Ag/FVIII:C desde 3:1 hasta 6,5:1 dio como resultado un nivel de pico de FVIII:C similarmente alto, sin embargo, el FVIII:C fue observado en plasma durante un período de tiempo de aproximadamente 2 a 3 veces más largo (Figure 6). Correspondientemente, la AUDC_{0-1d} subió en aproximadamente 2,7 veces. Aparentemente un VWF:Ag puede no solamente puede afectar a la recuperación in vivo de un FVIII:C sino que puede conducir también a unos niveles de pico de FVIII más altos y un período de tiempo más largo con niveles elevados de FVIII:C.

La recopilación y la interpolación de los resultados acerca de la AUDC con una dosis corregida de FVIII a partir de los precedentes ejemplos conducen a una manifiesta conexión entre la relación de VWF:Ag/FVIII:C y la fracción de FVIII que llega a la circulación (Figura 7). A lo largo de un amplio intervalo, la conexión parece ser bastante lineal.

Esta conexión permite sacar la firme conclusión de que también con unas relaciones de VWF:Ag/FVIII:C más altas que las ensayadas hasta ahora, la fracción FVIII transportada a la circulación aumentaría aun más. Debido a la pendiente lineal de la conexión, parece razonable establecer la hipótesis de que para unas relaciones de por lo menos 10:1 e incluso posiblemente de 20:1, que son un múltiplo de aproximadamente 2 veces o 3 veces la relación máxima ensayada hasta ahora, se puede esperar un aumento adicional de la AUDC (FVIII:C) a continuación de una administración por vía subcutánea.

Tabla 6: Grupos en tratamiento (ratones ko con FVIII) para la averiguación del cometido de la relación de VWF:Ag/FVIII:C

Nº	Tratamiento	Dosis / volumen / esquema / ruta	Concentración de FVIII	N (total)
1	Haemate [®] P relación típica (3:1)	400 U de (FVIII:C)/kg + 1.150 U de (VWF:Ag) / kg /kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / único t=0 / s.c.	40 U/ml	25
2	Haemate [®] P "VWF bajo" (0,9:1)	400 U/kg de (FVIII:C)/kg + 370 U de (VWF:Ag) / kg / kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = 0 h. / s.c.	40 U/ml	25
3	Haemate [®] P relación típica (3:1)	200 U/kg de (FVIII:C)/kg + 570 U de (VWF:Ag) / kg / kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / único t=0 / s.c.	20 U/ml	20
4	Haemate [®] P "VWF alto" (6,5:1)	200 U/kg de (FVIII:C)/kg + 1.300 U (VWF:Ag) / kg / kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = 0 h. / s.c.	20 U/ml	25

10 **Ejemplo 5:** Determinación de la dosis mínima de Haemate[®] P (s.c.) requerida para la corrección de la coagulación de ratones con hemofilia A.

Como una etapa siguiente, se trató la cuestión acerca de qué dosis de Haemate[®] P (relación típica de VWF:Ag/FVIII:C de 3:1) se requeriría para corregir el déficit de coagulación de ratones ko con FVIII. Para esta finalidad, unos ratones ko con FVIII fueron tratados por vía s.c. con Haemate[®] P y las consecuencias para la coagulación fueron cuantificadas por medio de un equipo clásico para tromboelastografía. Se realizó el ensayo in-TEM[®] usando sangre entera con un analizador Roteg[®] 05. Se sacaron muestras de sangre retroorbitalmente y se analizaron inmediatamente después de la toma de muestras, usando el reactivo in-TEM[®] para comenzar la tromboelastografía; el protocolo usado refleja esencialmente la guía para un análisis de sangre humana, proporcionada por el fabricante del equipo (Pentapharm, GmbH, Munich, Alemania). Dicho brevemente, la reacción se comenzó añadiendo el reactivo in-TEM[®] a las muestras de sangre que habían sido incubadas a 37°C en el instrumento ROTEG. Globalmente, el proceso refleja el enfoque descrito para ratones con hemofilia A en la cita de K. A. Landskroner y colaboradores, Haemophilia (2005), 11, 346-352. Aplicando el ensayo in-TEM[®] a ratones deficientes en FVIII, típicamente se prolongan el tiempo de coagulación, C.T, y el tiempo de formación de coágulos, CFT, se disminuye el ángulo alfa (y correspondientemente la velocidad máxima, maxVel), se aumenta el tiempo hasta la observación de la velocidad máxima, t-MaxVel; se observan unos cambios mínimos, si es que los hay, en el área integrada bajo la curva de coagulación (AUC) y la firmeza máxima de los coágulos, MCF, permanece normal.

Una inyección subcutánea de 100, 50 ó 25 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P dio como resultado una inversión dependiente de la dosis del ángulo alfa y del tiempo de formación de coágulos (CFT) de ratones ko con FVIII (Tablas 7-10; Fig. 8 y 9). La Tabla 11 detalla los resultados conseguidos con una infusión intravenosa de 25 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P. El grado de corrección corresponde aproximadamente a la inyección subcutánea de una infusión intravenosa de 100 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P, es decir que el tratamiento subcutáneo con la formulación de FVIII que contenía VWF requería solamente una dosis aproximadamente 4 veces más alta que la infusión intravenosa, con el fin de conseguir un nivel comparable de corrección de una hemóstasis.

Usando el Haemate[®] P, una dosis tan baja como la de 50 U de (FVIII:C)/kg era suficiente para una corrección completa del defecto de coagulación durante aproximadamente un día. La corrección de la hemóstasis duró incluso más largo tiempo cuando eran aplicadas unas dosis más altas, es decir que la corrección conseguida por 100 U de (FVIII:C)/kg duró aproximadamente 2 días. Con el fin de proyectar sobre esta base la dosis requerida para mejorar sustancialmente la coagulación en pacientes con hemofilia A, se ha de tener en cuenta que los ratones sanos tienen un nivel de FVIII endógeno aproximadamente 2 a 3 veces más alto en comparación con el de seres humanos sanos. Por lo tanto, la dosis de 50 U de (FVIII:C)/kg se traduce en un equivalente de aproximadamente 15-25 U de (FVIII:C)/kg en seres humanos. Esto corresponde a una dosis de FVIII que un paciente de hemofilia A recibe en un tratamiento profiláctico a través de una administración por vía i.v. por un tratamiento convencional. Esto correspondería también a un volumen de inyección, bien apropiado para inyecciones s.c., incluso para pacientes adultos. Además, esta perspectiva ilustra la pronunciada corrección de la hemóstasis conseguida por una inyección s.c. de un FVIII de plena longitud, basada en una formulación con VWF. Esto apunta también a la conclusión de que el nivel de FVIII en plasma alcanzado en los pacientes puede ser por lo menos suficiente para un tratamiento

profiláctico - una situación para la que la conveniencia de una inyección no intravenosa desempeñaría un cometido principal para la calidad de vida de los pacientes.

Tabla 7: Grupos en tratamiento o determinación por tromboelastografía

Nº	Tratamiento	Dosis de (FVIII:C) / volumen / esquema / ruta	Concentración de FVIII	N (m/f)
1		na (no aplicable)	na	19(12/7)
2	Haemate® P	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = 0 h / s,c,	10 U/ml	56 (37/19)
3	Haemate® P	50 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = 0 h / s,c,	5 U/ml	24 (20/4)
4	Haemate® P	25 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = 0 h / s,c,	2,5 U/ml	48 (25/23)
5	Haemate® P	25 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = 0 h / i,v,	2,5 U/ml	25 (25/0)

5 Tabla 8: Resultados de in-TEM® a continuación de una administración por vía subcutánea de 100 U de (FVIII:C)/kg de Haemate® P

Nº	Momento [h]	CT [seg]	CFT [seg]	Ángulo alfa [°]	MaxVel	t-maxVel [seg]	AUC	MCF [mm]	N
1	0	199 ± 68	68 ± 27	76 ± 5	22 ± 8	250 ± 89	7184 ± 609	72 ± 6	19
2	5	190 ± 57	45 ± 15	82 ± 3	37 ± 9	232 ± 69	7541 ± 519	76 ± 5	9
3	8	177 ± 36	38 ± 6	82 ± 1	36 ± 4	205 ± 41	7037 ± 152	71 ± 2	12
4	16	240 ± 60	58 ± 11	79 ± 2	26 ± 3	289 ± 67	7306 ± 306	72 ± 3	8
5	20	199 ± 48	58 ± 13	78 ± 2	26 ± 5	241 ± 58	6795 ± 295	68 ± 3	7
6	24	207 ± 50	54 ± 14	79 ± 3	27 ± 7	242 ± 57	6933 ± 314	69 ± 3	8
7	32	189 ± 25	50 ± 5	81 ± 1	29 ± 3	238 ± 34	7548 ± 161	76 ± 2	4
8	48	230 ± 99	70 ± 27	76 ± 5	22 ± 8	293 ± 38	7161 ± 278	72 ± 3	8

10 Tabla 9: Resultados de in-TEM® a continuación de una administración por vía subcutánea de 50 U de (FVIII:C)/kg de Haemate® P

Nº	Momento [h]	CT [seg]	CFT [seg]	Ángulo alfa [°]	MaxVel	t-maxVel [seg]	AUC	MCF [mm]	N
1	0	199 ± 68	68 ± 27	76 ± 5	22 ± 8	250 ± 89	7184 ± 609	72 ± 6	19
2	5	167 ± 71	46 ± 13	81 ± 2	31 ± 6	206 ± 88	7211 ± 398	72 ± 4	8
3	8	211 ± 43	51 ± 13	80 ± 3	32 ± 12	258 ± 54	7281 ± 567	73 ± 6	8
4	16	225 ± 89	66 ± 24	77 ± 5	22 ± 8	283 ± 113	7102 ± 305	71 ± 3	8
5	20	172 ± 35	49 ± 12	80 ± 2	28 ± 6	214 ± 54	7083 ± 337	71 ± 3	8

Tabla 10: Resultados de in-TEM® a continuación de una administración por vía subcutánea de 25 U de (FVIII:C)/kg de Haemate® P

Nº	Momento [h]	CT [seg]	CFT [seg]	Ángulo alfa [°]	MaxVel	t-maxVel [seg]	AUC	MCF [mm]	N
1	0	199 ± 68	68 ± 27	76 ± 5	22 ± 8	250 ± 89	7184 ± 609	72 ± 6	19
2	5	223 ± 54	60 ± 14	78 ± 3	23 ± 5	271 ± 71	7072 ± 200	71 ± 2	16
3	8	181 ± 66	53 ± 22	79 ± 4	28 ± 9	224 ± 90	7143 ± 335	72 ± 3	24
4	16	248 ± 83	75 ± 28	75 ± 5	21 ± 9	313 ± 110	7304 ± 598	73 ± 6	12
5	20	191 ± 47	66 ± 15	77 ± 3	20 ± 5	231 ± 57	7009 ± 343	70 ± 3	8

Tabla 11: Resultados de in-TEM[®] a continuación de una administración por vía intravenosa de 25 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P

Nº	Momento [h]	CT [seg]	CFT [seg]	Ángulo alfa [°]	MaxVel	t-maxVel [seg]	AUC	MCF [mm]	N
1	0	199 ± 68	68 ± 27	76 ± 5	22 ± 8	250 ± 89	7184 ± 609	72 ± 6	19
2	4	158 ± 24	36 ± 4	83 ± 1	39 ± 5	184 ± 24	7206 ± 150	73 ± 1	4
3	8	192 ± 15	40 ± 4	80 ± 1	35 ± 3	222 ± 16	7300 ± 119	74 ± 1	4
4	16	196 ± 14	40 ± 3	82 ± 1	35 ± 3	228 ± 14	7059 ± 118	71 ± 1	4
5	24	192 ± 75	47 ± 5	80 ± 1	29 ± 3	228 ± 81	6778 ± 410	68 ± 4	4
6	32	181 ± 19	37 ± 3	83 ± 1	42 ± 4	215 ± 20	7465 ± 170	75 ± 2	4

5 **Ejemplo 6:** Exclusión de un compartimiento intra-vascular como localización de los efectos beneficiosos de un VWF:Ag para aumentar la biodisponibilidad después de inyecciones s.c.

10 Un VWF es una proteína multifuncional. Además de su cometido directo en una hemóstasis, un VWF desempeña también un cometido importante para estabilizar y proteger a un FVIII en la circulación. Los pacientes que padecen de una enfermedad de VWF del tipo III, que es un trastorno en el que un VWF:Ag es virtualmente indetectable, demuestran claramente esto, puesto que ellos padecen también de una deficiencia secundaria de FVIII. Frente a este fondo se puede establecer la hipótesis de que en pacientes de la enfermedad de von Willebrand, la biodisponibilidad de un FVIII no formulado con un VWF puede realmente no diferir de un FVIII formulado con un VWF. En el primer caso, un FVIII sólo quedaría rápidamente despejado desde la circulación, mientras que él es estabilizado en la circulación por un VWF en el segundo caso.

15 Con el fin de ensayar esta hipótesis, unos ratones ko con FVIII se inyectaron con un único tratamiento en t = 0, i.v. (por la vena de cola) con 100 U de (FVIII:C)/kg, kg de Helixate o Haemate[®] P. Además, unos ratones ko con VWF fueron inyectados por un único tratamiento en t = 0, i.v. (por la vena de cola) con 50 U de (FVIII:C)/kg de Helixate o Haemate[®] P. Estos ratones ko con VWF carecen de los exones 4 y 5 y no expresan un VWF endógeno (Denis C. y colaboradores Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Vol 95, 9524-9529). Se sacaron muestras de sangre retroorbitalmente bajo anestesia a corto plazo, y el tratamiento adicional de la muestra se realizó como en el Ejemplo 2. Todas las muestras fueron cuantificadas acerca de su concentración de FVIII:Ag humano usando un ELISA comercial (de Cedarlane Laboratories Ltd.).

25 La Figura 10 ilustra la farmacocinética casi idéntica de un FVIII de alta pureza y de un producto de un FVIII formulado con un VWF a continuación de una inyección i.v. en ratones ko con FVIII. Esto muestra que un FVIII humano no requiere un VWF humano en ratones para la estabilización en la circulación. Hay sin embargo, una diferencia sustancial si no está presente nada de VWF endógeno para estabilizar a un FVIII humano en la circulación (Figura 11): En ratones que no tienen nada de VWF endógeno en la circulación (ratones ko con VWF) la recuperación de un producto FVIII de alta pureza (Monoclata-P[®]) es más baja en comparación con la de un producto formulado con un VWF (Haemate[®] P) y éste queda despejado asimismo con mayor rapidez.

30 Tomados conjuntamente con los resultados obtenidos con ratones ko con FVIII (Fig. 10), esto demuestra también que un FVIII humano queda igualmente estabilizado por el VWF heterólogo de un animal en comparación con un VWF humano. Puesto que evidentemente una cantidad adicional de VWF:Ag en la circulación no estabiliza aún más a un FVIII:C humano a continuación de una aplicación por vía i.v. a ratones ko con FVIII, la estabilización de un FVIII:C por una formulación que contiene un VWF:Ag a continuación de una aplicación por vía s.c. debe de ser mediada en un compartimiento diferente que el sistema vascular. Integrando estos hallazgos, se puede sacar la conclusión de que la mejorada biodisponibilidad observada a continuación de una inyección s.c. de un FVIII formulado con un VWF:Ag, siempre que esté presente suficiente cantidad del VWF:Ag en la circulación, no es la consecuencia de estabilizar a un FVIII:C en la circulación, sino junto con los procesos implicados para llegar a la circulación. Estos procesos pueden abarcar la protección de un FVIII con respecto de proteasas, degradando la proteína antes de llegar a la circulación. La biodisponibilidad aumentada puede representar también la consecuencia de mecanismos de transporte, potencialmente activos. Ellos pueden trabajar más eficientemente en un VWF, que entonces transporta pasivamente de manera concomitante a un FVIII, o ellos pueden trabajar más eficientemente en un complejo de VWF-FVIII que en un FVIII a solas.

Tabla 12: Grupos en tratamiento para la comparación de la farmacocinética de un FVIII de alta pureza formulado con un VWF:Ag en ratones ko con FVIII y ko con VWF

Nº	Especie	Tratamiento	Dosis de (FVIII:C) / volumen / esquema / ruta	N
1	Ratón ko con FVIII	Helixate	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = 0 h / i,v,	6
2	Ratón ko con FVIII	Haemate [®] P	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = 0 h / i,v,	6
3	Ratón ko con VWF	Monoclata-P [®]	50 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = 0 h / i,v,	20
4	Ratón ko con VWF	Haemate [®] P	50 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = 0 h / i,v,	20

Ejemplo 7: Terapia de una deficiencia de FVIII relacionada con una enfermedad de von Willebrand por inyecciones s.c. - beneficio de una solución de un FVIII formulado con un VWF:Ag

Unos niveles de FVIII:C disminuidos no solamente son causantes para el fenotipo de hemorragia en una hemofilia A, sino que desempeñan también un cometido crucial en una enfermedad de von Willebrand (VWD). Como se detalla en el Ejemplo 7, unos niveles disminuidos de FVIII:C resultan de la estabilización perturbada por un VWF. Puesto que se demostró que un FVIII formulado con un VWF:Ag es apropiado para aplicaciones por vía s.c. de hemofilia A, se ensayó si los niveles de FVIII:C pueden ser aumentados también en una VWD (Tabla 13). 400 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P se inyectaron s.c. a ratones ko con VWF y ko con FVIII y su plasma se analizó en cuanto a la actividad de FVIII:C. Se usaron el mismo diseño de estudio y los mismos métodos que en el Ejemplo 2. En comparación con ratones testigo sanos con un nivel de FVIII:C endógeno de aproximadamente 3 U/ml, un nivel reducido de FVIII:C en la línea de base es corriente para ratones tanto ko con VWF como ko con FVIII, mientras que los ratones ko con VWF adicionalmente carecen de su VWF endógeno. Por lo tanto, el cometido beneficioso de un VWF:Ag aplicado por vía s.c. puede ser sumamente pronunciado en estos ratones, puesto que los procesos implicados en un FVIII que llega a la circulación, pueden estar plenamente disponibles para un VWF:Ag aplicado por vía s.c. La Figura 12 muestra que, de hecho, el aumento de FVIII:C es mucho más pronunciado en ratones ko con VWF en comparación con ratones ko con FVIII. Ajustados a la línea de base, los niveles de pico fueron hasta 6 veces más altos y la AUCD fue por lo menos 3 veces más alta en ratones ko con VWF. Esto indica que en una VWD, los pacientes pueden beneficiarse también de una terapia por vía s.c. con un producto de un FVIII formulado con un VWF:Ag, potencialmente incluso más que los pacientes de hemofilia A, puesto que un VWF:Ag tiene un efecto doble a): de una estabilización/intensificación de la absorción de un FVIII aplicado por vía s.c. y b) de una subsiguiente estabilización del FVIII una vez que éste ha llegado al plasma.

Tabla 13: Grupos en tratamiento para la comparación de la farmacocinética de un FVIII formulado con un VWF:Ag en ratones ko con FVIII y ko con VWF

Nº	Especie	Tratamiento	Dosis de (FVIII:C) / volumen / esquema / ruta	N
1	Ratón ko con FVIII	Haemate [®] P	400 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = 0 h / s.c.	25
2	Ratón ko con VWF	Haemate [®] P	400 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = 0 h / s.c.	25

Ejemplo 8: Terapia de una deficiencia de VWF en una enfermedad de von Willebrand a continuación de inyecciones s.c. de un VWF:Ag

El Ejemplo 8 recopila los datos que muestran la terapia potencial de una deficiencia de FVIII en una VWD por inyecciones s.c. Con el fin de ensayar si también la deficiencia de VWF puede ser tratada por una inyección s.c. de un producto de VWF, unos conejos CHB fueron inyectados con 2.300 U/kg de VWF:Ag (Haemate[®] P) a través de la ruta subcutánea en t = 0 por una única inyección. Los conejos pesaban alrededor de 2,5 - 3 kg. Se sacaron muestras de sangre a través de la vena de oreja para la determinación de un VWF:Ag humano antes de la dosificación (línea de base) y a las 1, 2, 4, 6, 24, 30 h, y a los 2 y 3 días después del tratamiento (Tabla 14). La sangre fue anticoagulada como sangre con 10 % de citrato. Un VWF:Ag humano fue cuantificado en un plasma, elaborado a partir de la sangre por centrifugación usando un ELISA comercial; de Roche Diagnostics. El plasma fue almacenado a -20°C antes del análisis. Se encontró de modo sorprendente que también un VWF aunque incluso en más cantidad que un FVIII entra en la circulación, lo que ofrece una opción para una terapia de una enfermedad de von Willebrand basándose también en una administración por vía s.c. de un VWF:Ag (Figura 13).

Tabla 14: Grupo en tratamiento para la averiguación de la resorción de un VWF:Ag a continuación de una inyección s.c. a conejos

Nº	Tratamiento	Dosis / volumen / esquema / ruta	N
1	Haemate [®] P	2300 U/kg VWF:Ag / 12,6 ml/kg de peso corporal / t=0 h / s.c.	4

Unas muestras de plasma fueron analizadas en cuanto a un VWF:Ag humano usando un estuche ELISA comercialmente disponible (VWF:Ag, de Roche Diagnostics). Se encontró de manera sorprendente que también un VWF, aunque incluso en mayor cantidad que un FVIII, entra en la circulación, lo cual ofrece una opción para una terapia de una enfermedad de von Willebrand basándose también en una administración por vía s.c. de un VWF:Ag.

Ejemplo 9: Administración por vía s.c. de un VWF:Ag sin nada de FVIII en ratones ko con VWD

Un VWF de alta pureza se inyectó por vía subcutánea a ratones ko con VWF en una dosis de 523 U de (VWF:Ag)/kg (Tabla 15). Se sacaron muestras de sangre retroorbitalmente para la determinación de un VWF:Ag humano antes de la dosificación (línea de base) y antes de la dosis y a las 2, 4, 6, 16 horas y a los 1, 2 y 3 días después del tratamiento. La sangre fue anticoagulada como sangre con 10 % de citrato. Un VWF:Ag humano fue cuantificado en un plasma, elaborado a partir de sangre por centrifugación usando un ELISA comercial; de Roche Diagnostics. El plasma fue almacenado a -20°C antes del análisis. El nivel de VWF:Ag en plasma subió a continuación de este

tratamiento hasta unos niveles de pico de aproximadamente 0,1 - 0,2 U de (VWF:Ag)/ml (Figura 14). El curso de tiempo de VWF:RCo apareció como algo más pronunciado, reflejando una combinación de transporte al plasma y de despeje desde éste. Además de la averiguación de que un VWF humano es transportado al plasma en este modelo de VWD, se analizó en los mismos momentos (puntos de tiempo) si este aumento de nivel de VWF plasmático (humano) da como resultado un aumento secundario de los niveles de FVIII:C endógeno en plasma, debido a la estabilización restaurada de FVIII:C endógeno. Desde luego, se observó un aumento de FVIII:C en plasma, lo cual ocurría de modo algo retrasado en comparación con el curso en el tiempo de un VWF. Esto apunta a la conclusión de que un VWF aplicado por vía s.c. no solamente es transportado al plasma sino que adicionalmente retiene una actividad funcional, como se muestra por el nivel de VWF:RCo, así como su función para estabilizar el FVIII:C endógeno. El aumento de FVIII no era sin embargo tan pronunciado como se observó en el Ejemplo 7, así, el aumento de FVIII:C a continuación de una inyección s.c. de una solución de un FVIII formulado con un VWF representa tanto el transporte de FVIII desde el espacio subcutáneo así como la estabilización de FVIII endógeno.

Tabla 15: Grupos en tratamiento para aplicación por vía s.c. de un VWF puro a ratones ko con VWF

Nº	Tratamiento	Dosis / volumen / esquema / ruta	N
1	Factor de Von Willebrand humano	523 U de (VWF:Ag) /kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / único en t = 0 / subcutánea	40

Ejemplo 10: Averiguación de la inmunogenicidad de un FVIII formulado con un VWF en un modelo de hemofilia A (ratones ko con FVIII)

El desarrollo frecuente de anticuerpos neutralizadores contra un FVIII es un problema principal para el tratamiento de pacientes con hemofilia A grave. Aproximadamente un 25 % de estos pacientes desarrollan estos anticuerpos inhibidores, neutralizando a la actividad de FVIII. Correspondientemente, la sustitución del FVIII no ayuda ya a corregir una hemostasis de los pacientes. Aunque dichos anticuerpos inhibidores son generados típicamente por el primer par de tratamientos, p.ej. en pacientes no tratados previamente (PUP's acrónimo de Previously Untreated Patients), actualmente es muy difícil predecir qué pacientes padecerán de esta complicación. El hecho de si el concentrado particular de FVIII desempeña un cometido en esto, es un asunto de discusión controvertida en la bibliografía científica. A partir de otras proteínas, diseñadas para conseguir una respuesta inmunitaria máxima, se ha puesto por lo menos en claro que el modo de aplicación desempeña un cometido crucial, es decir que las inyecciones i.v. son típicamente menos inmunogénicas que las inyecciones s.c.

Este ejemplo trató la cuestión de si la biodisponibilidad aumentada de un FVIII por una formulación con un VWF puede ir en paralelo con una inmunogenicidad aumentada de FVIII en un modelo de animal que representa a pacientes con hemofilia A grave. Unos ratones ko con FVIII fueron tratados tal como se detalla en la Tabla 16.

El título total anti-FVIII se determinó usando unas placas de ELISA revestidas con Helixate[®]. Dicho brevemente, la primera reacción inmunológica fue la fijación de anticuerpos en la muestra de plasma frente a un FVIII humano aplicado como revestimiento sobre los pocillos de microtitulación. A continuación de una etapa de lavado, estos anticuerpos capturados son detectados con una IgG anti ratón marcada con peroxidasa, es decir con una segunda reacción inmunitaria. La actividad de peroxidasa es determinada fotométricamente después de añadir tetrametilbencidina y de detener la reacción, después de un período de tiempo previamente determinado, con ácido sulfúrico 0,5 N.

El ensayo de Bethesda se realizó de acuerdo con el siguiente proceso. Dicho brevemente, 1 BU es definida como el valor recíproco de la dilución de un plasma de ensayo que inhibe un 50 % de la actividad total de FVIII después de una incubación durante 2 horas a 37°C. Unas diluciones de muestras de plasma y un plasma testigo de un ser humano sano se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 2 horas. La actividad residual de FVIII fue cuantificada después de la incubación. Correspondientemente, los datos fueron informados como Unidades de Bethesda (BU) y se normalizaron para el título anti-FVIII total más alto informado, con el fin de permitir una comparación directa.

Los datos recopilados en la Tabla 17 indican que, a continuación de una inyección i.v., un FVIII formulado con un VWF (Haemate[®] P) generó un título anti-FVIII ligeramente más bajo que el producto de un FVIII exento de un VWF (Helixate[®]). Dicha observación está en línea con una tendencia en la bibliografía científica que apunta a un riesgo potencialmente más bajo de generar anticuerpos inhibidores por productos formulados con VWF (Goudemand J., Haemophilia, Vol. 13 Supl. 5: 47-51, 2007; Etingshausen C.E., Kreuz W., Haemophilia, Vol. 12 Supl. 6: 102-106, 2006). No había esencialmente ninguna diferencia acerca de si la comparación estaba basada en todos los anticuerpos anti FVIII o más específicamente en los que inhiben a la actividad de FVIII.

En los grupos tratados por vía s.c. o bien con un FVIII formulado con un VWF o exento de VWF en combinación con el coadyuvante de Freud completo (cFA) y en un esquema ligeramente diferente, la respuesta inmunitaria era más alta que en los grupos i.v. tal como se esperaba. Lo que es más importante, sin embargo, se encontró con sorpresa

que cuando un FVIII era formulado con un VWF para la inyección s.c., la respuesta inmunitaria era mucho más baja que para la inyección s.c. de un FVIII que no había sido formulado con un VWF.

Este fue el caso tanto para el título anti-FVIII total como también para los inhibidores. Con el fin de excluir que esta observación sorprendente es debida a una interferencia con el efecto inmunoestimulante del adyuvante así como con el esquema de tratamiento, el experimento se repitió sin ningún adyuvante con el esquema de tratamiento idéntico que para la comparación por vía i.v. En línea con el hallazgo a partir de la combinación con un adyuvante, se observó un título más alto a continuación de una inyección s.c. de Helixate[®] (Fig. 1) en comparación con la inyección i.v. de Helixate[®]. Los resultados confirmaron que también en un diseño ligeramente diferente, una formulación con VWF disminuye la respuesta inmunitaria a un FVIII a continuación de una inyección s.c., en comparación con un FVIII que no había sido formulado con VWF. Esto fue comprobado en dos niveles de dosis. La dosis de 100 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P se escogió para conseguir un nivel de FVIII en plasma, que es similar al nivel en plasma conseguido por 200 U de (FVIII:C)/kg de Helixate[®], a continuación de su aplicación por vía s.c. La dosis de 200 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P se escogió para aplicar la misma dosis de FVIII que con Helixate[®], localmente, con el fin de conseguir unos similares niveles de FVIII en ambos compartimientos, lo que probablemente es crítico para el nivel de respuesta inmunitaria observada, es decir o bien en la circulación con la baja dosis o en el espacio subcutáneo con la alta dosis. Independientemente de la dosis al igual que del enfoque para cuantificar la respuesta inmunitaria, la reacción a un FVIII formulado con un VWF (Haemate[®] P) era mucho menos pronunciada en comparación con el Helixate[®]. Puesto que la actividad de FVIII específica del Helixate[®] es sustancialmente más alta en comparación con el Haemate[®] P, mientras que la respuesta inmunitaria debería ser dirigida para inactivar asimismo al FVIII, el efecto beneficioso del VWF es probablemente subestimado en este ejemplo.

Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que había un gran beneficio de la formulación con VWF para conseguir una formación mínima de anticuerpos anti-FVIII e inhibir específicamente a anticuerpos anti-FVIII a continuación de una administración por vía s.c. que era sustancialmente mayor que a continuación de una administración por vía i.v. Esto era incluso más sorprendente frente al fondo por cuanto que el grupo por vía s.c. en la alta dosis de Haemate[®] P era más alto que los niveles en plasma conseguidos por la aplicación por vía s.c. de Helixate[®], debido a la más alta biodisponibilidad por la formulación de VWF.

Tabla 16: Grupos en tratamiento (ratones ko con FVIII) para la averiguación del cometido del VWF sobre la inmunogenicidad de un FVIII aplicado por vía s.c.

Nº	Tratamiento	Dosis de (FVIII:C) / volumen / esquema / ruta	N
1	Helixate [®]	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 4, 7, 11 / i.v.	10
2	Haemate [®] P	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 4, 7, 11 / i.v.	10
3	Helixate [®]	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 14, 25 / s.c. (+ cFA d 0)	5
4	Haemate [®] P	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 14, 25 / s.c. (+ cFA d 0)	5
5	Helixate [®]	200 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 4, 7, 11 / s.c.	5
6	Haemate [®] P	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 4, 7, 11 / s.c.	8
7	Haemate [®] P	200 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 4, 7, 11 / s.c.	9

Tabla 17: Cometido del VWF para el título de anticuerpos anti-FVIII y de anticuerpos inhibidores de FVIII a continuación de un tratamiento por aplicación por vía i.v. o s.c. de FVIII

Nº	Tratamiento	Dosis de (FVIII:C) / volumen / esquema / ruta	Título anti-FVIII total	Ensayo de Bethesda ¹ [BU/ml]
1	Helixate [®]	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 4, 7, 11 i.v.	571	854
2	Haemate [®] P	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 4, 7, 11 i.v.	268	737
3	Helixate [®]	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 14, 25 s.c. (+ cFA d 0)	16648	16648
4	Haemate [®] P	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 14, 25 s.c. (+ cFA d 0)	739	619
5	Helixate [®]	200 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 4, 7, 11 s.c.	2417	4479
6	Haemate [®] P	100 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 4, 7, 11 s.c.	365	501
7	Haemate [®] P	200 U/kg / 0,2 ml/20 g de peso corporal / t = d 0, 4, 7, 11 s.c.	489	1031

¹ Datos normalizados para el título anti-FVIII más alto observado (en el grupo 3)

Ejemplo 11: Cometido de la relación de VWF:Ag / VWF:RCo sobre la biodisponibilidad de VWF y de FVIII:C (formulado con VWF) a continuación de una aplicación por vía s.c.

Los Ejemplos anteriores han mostrado que un VWF aplicado por vía s.c. llega sorprendentemente a la circulación. Además, se demostró que una formulación de un FVIII con un VWF aumenta la biodisponibilidad del FVIII:C en ratones ko con FVIII, después de una aplicación por vía s.c. Este Ejemplo examina el cometido potencial del modelo de multímeros de VWF a este respecto. Para tratar este tema, dos grupos de ratones ko con FVIII fueron tratados por vía s.c. con la misma dosis de FVIII:C (500 U/kg) y esencialmente con la misma dosis de VWF:Ag (500 ó 520 U/kg). Su dosis de VWF:RCo difería, sin embargo, por un factor de aproximadamente tres veces. Esto se consiguió usando unas soluciones de VWF, que fueron caracterizadas por un modelo diferencial de multímeros de VWF, es decir que consistía en multímeros o bien predominantemente pequeños o grandes. La relación de VWF:RCo / VWF:Ag variaba correspondientemente desde 1:1,05 hasta 1:0,35 (Tabla 18). Un grupo adicional con ratones ko con FVIII no tratados se incluyó como referencia. El esquema, la ruta y el volumen de inyección eran idénticos para todos los grupos es decir que la administración se realizó por vía subcutánea en t = 0 con un volumen de inyección de 0,2 ml/20 g de peso corporal.

Tabla 18: Grupos en tratamiento (ratones ko con FVIII) para la averiguación del cometido de la relación de VWF:RCo / VWF:Ag

Nº	Tratamiento	Dosis de				Relación de VWF:Ag/FVIII:C	Relación de VWF:RCo / FVIII:C	N
		FVIII:C [U/kg]	VWF:Ag [U/kg]	VWF:RCo [U/kg]				
1	No hay tratamiento	No apl.	No apl.	No apl.	No apl.	No apl.	5	
2	“Monómero de VWF” Haemate® P	500	500	474	1:1	1:1,05	20	
3	“Multímero de VWF” Haemate® P	500	520	1494	1,04:1	1:0,35	20	

Aunque los grupos 2 y 3 fueron tratados con la misma dosis de FVIII:C y esencialmente con la misma dosis de VWF:Ag, se observó una diferencia sustancial en la concentración de FVIII:C en plasma (Figura 16). Aunque no había ninguna diferencia relevante en la dosis de VWF:Ag, el aumento del nivel de FVIII:C en plasma por encima de la línea de base era sorprendentemente alrededor de dos veces más alto en el grupo tratado con la preparación de “monómero” de Haemate® P en comparación con el grupo tratado con la preparación de “multímero”. En línea con esto se puso de manifiesto que el aumento de FVIII observado con la preparación de “monómero” da como resultado un nivel de FVIII:C en plasma más alto que el conseguido con Haemate® P en una dosis comparable (Fig. 5). Se saca la conclusión de que, en contraste con el cometido en una hemóstasis, una preparación de VWF que contiene muchos multímeros, es decir con una relación de VWF:RCo / VWF:Ag de aproximadamente 1:0,35, da como resultado una biodisponibilidad de FVIII disminuida cuando se administra por vía s.c. en comparación con el aumento de FVIII más alto y más largamente duradero que es conseguido por una preparación de VWF que contiene muchos monómeros.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición que comprende un factor de von Willebrand (VWF) y un factor VIII (FVIII) no conjugados, en donde la relación de VWF:Ag por FVIII:C es mayor que 5:1, en donde el FVIII no está modificado químicamente y en donde el factor de von Willebrand se deriva de un plasma humano o es producido por vía recombinante, para la producción de un medicamento destinado al tratamiento de una VWD y/o de una hemofilia A, que ha de ser administrado extravascularmente.

Figura 1: Farmacocinética de 200 U/kg de Monoclate-P® inyectado i.v. o s.c. (n = 2/grupo; media + DT)

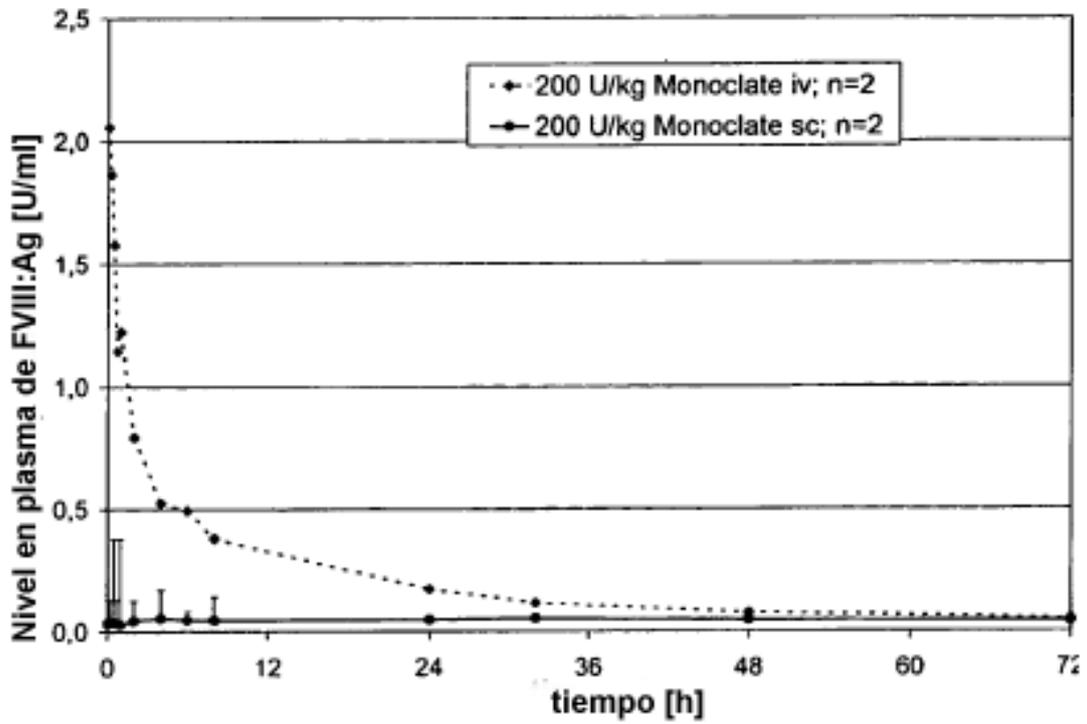


Figura 2: Actividad de FVIII en plasma de ratones ko con FVIII a continuación de 100 U/kg de Monoclate-P® i.v. o s.c. y de 1.800 U/kg s.c. (media + DT; n = 4-5/momento)

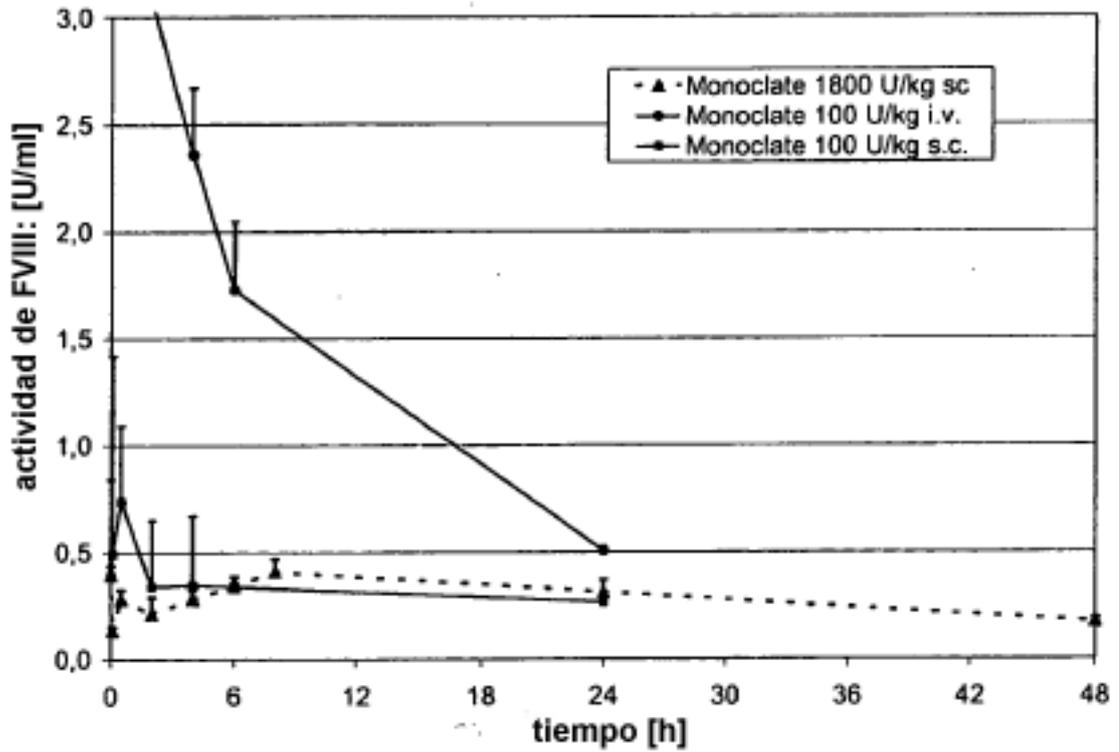


Figura 3: Nivel de la actividad de FVIII en plasma en ratones ko con FVIII a continuación de 1.800 U de (FVIII:C)/kg de Monoclate-P® o Haemate® P (media + DT; n= 4-5/momento)

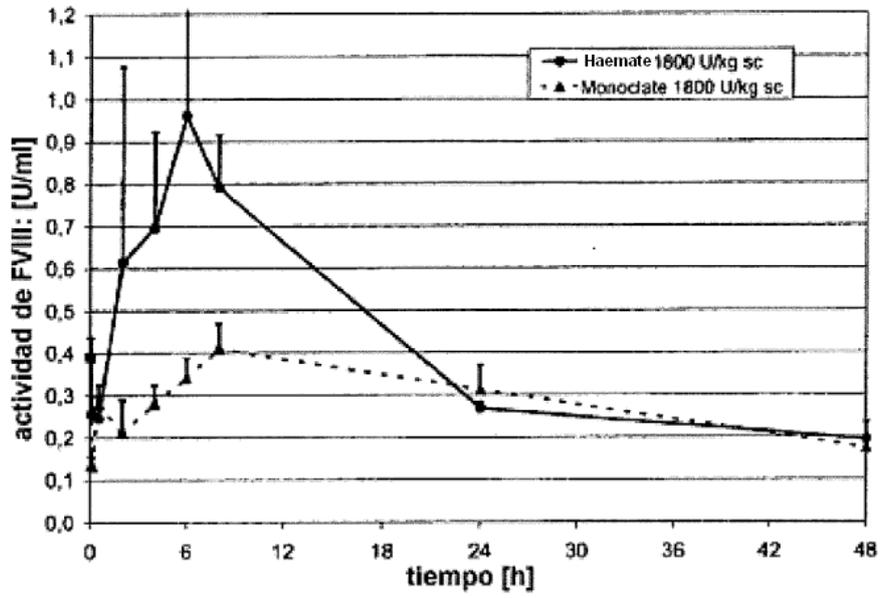
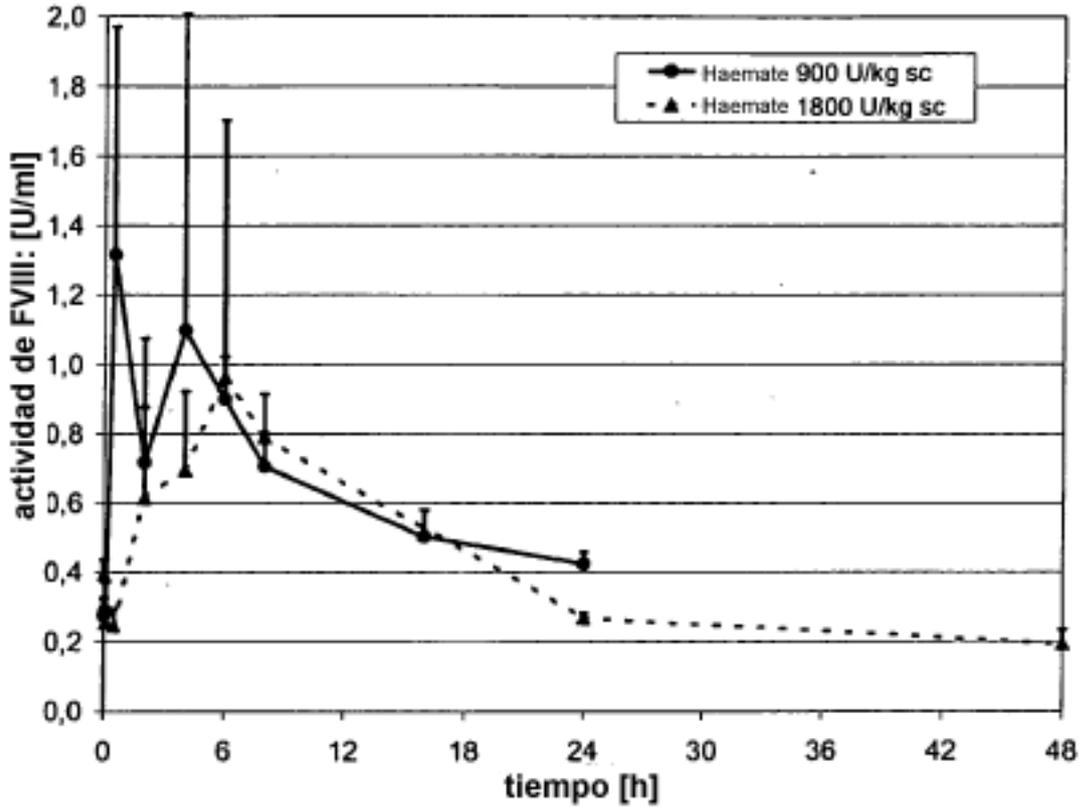


Figura 4: Actividad de FVIII media + DT hasta 2 días a continuación de una inyección s.c. de 900 o 1.800 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P (n = 5/momento)



5

Figura 5: Actividad de FVIII media + DT hasta 2 días a continuación de una inyección s.c. de 400 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P, caracterizado por una relación de VWF:Ag/FVIII:C variada (n = 5/momento)

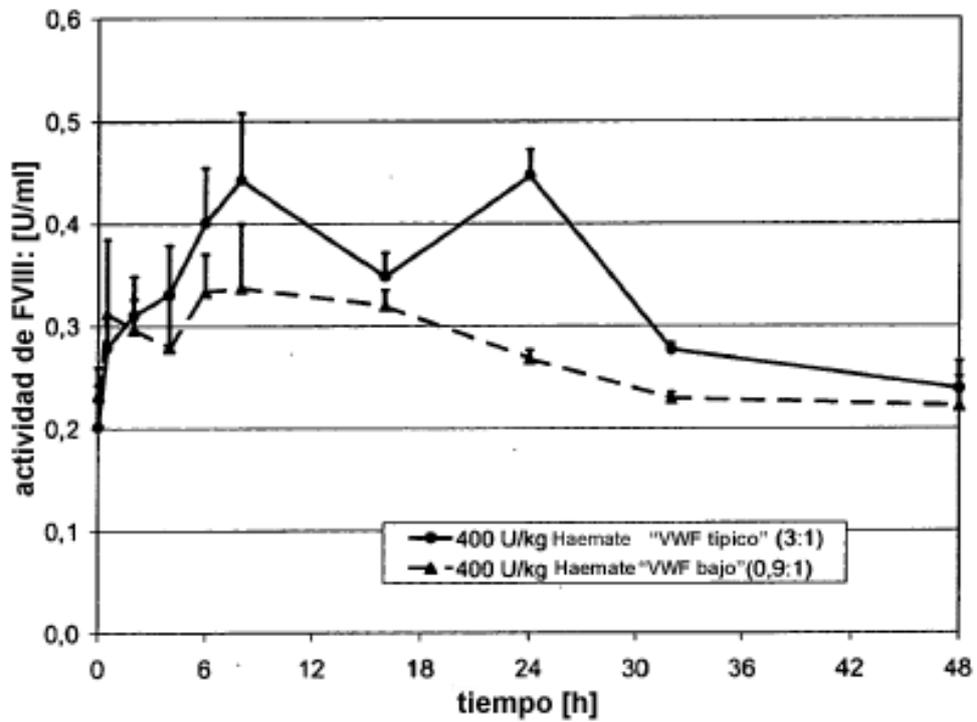


Figura 6: Curso en el tiempo de la actividad de FVIII media + DT hasta 2 días a continuación de una inyección s.c. de 200 U de (FVIII:C)/kg de Haemate® P, caracterizado por una relación de VWF:Ag/FVIII:C aumentada (n = 5/momento)

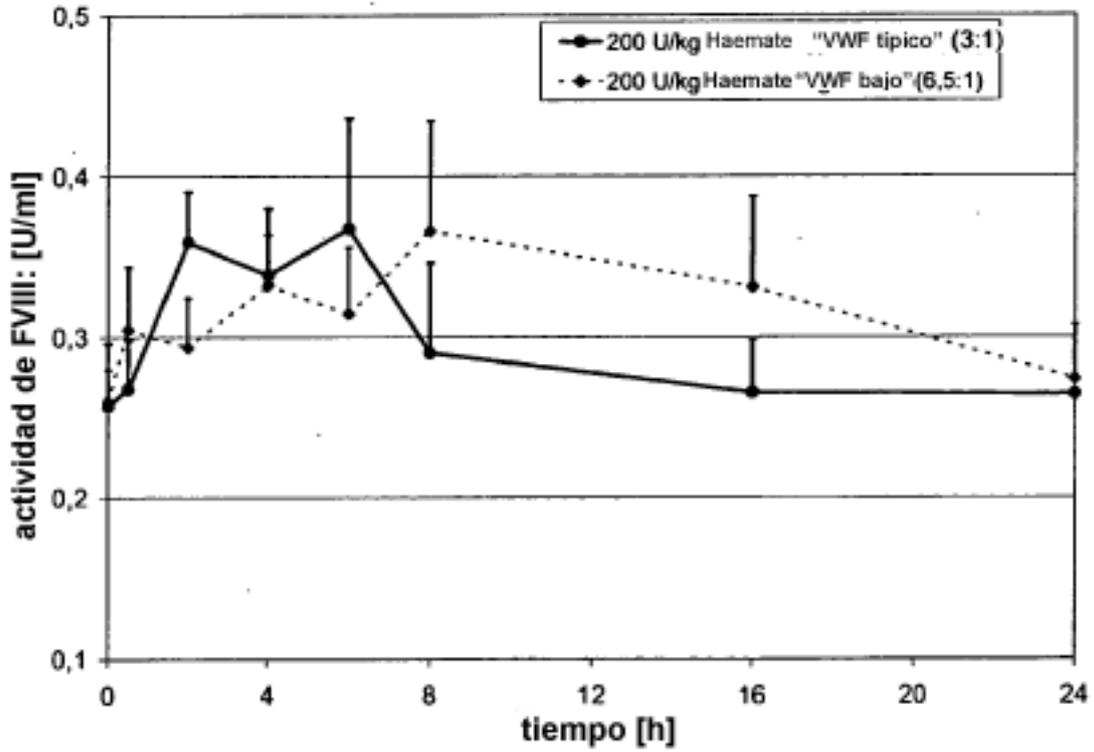


Figura 7: Aumento de la AUCD (FVIII) por una relación de VWF:Ag/FVIII:C aumentada

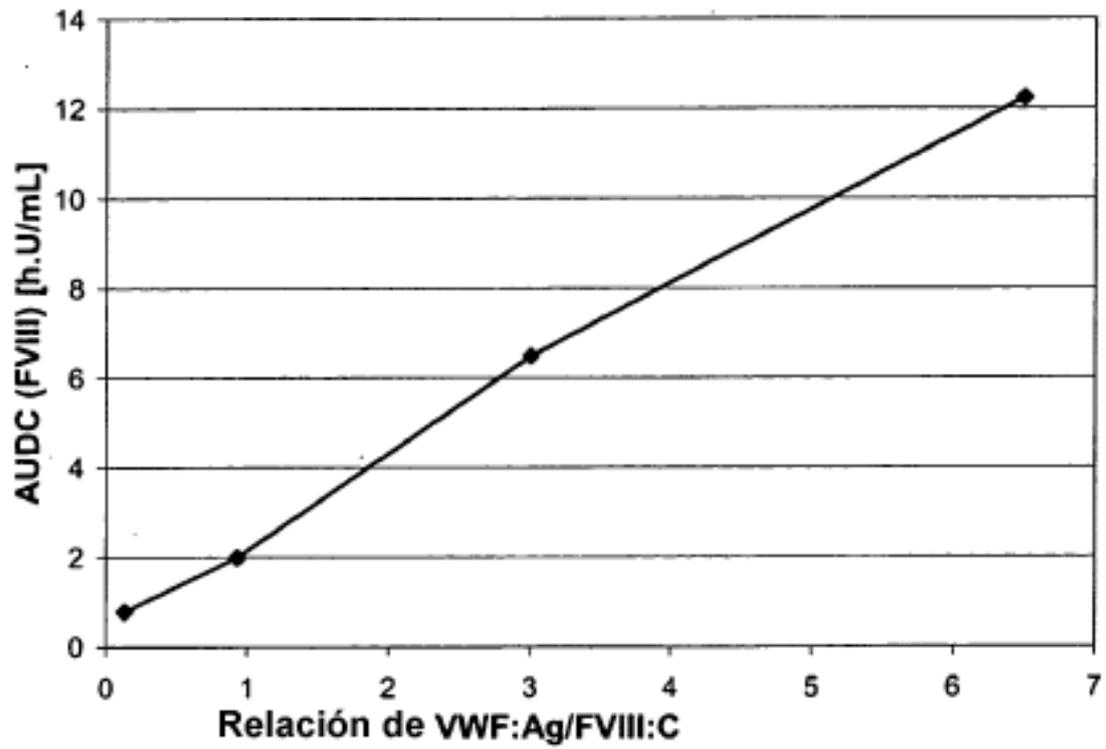


Figura 8: Tiempo de formación de coágulos (in TEM) a continuación de una inyección s.c. de Haemate® P (n = 7-24; media +DT)

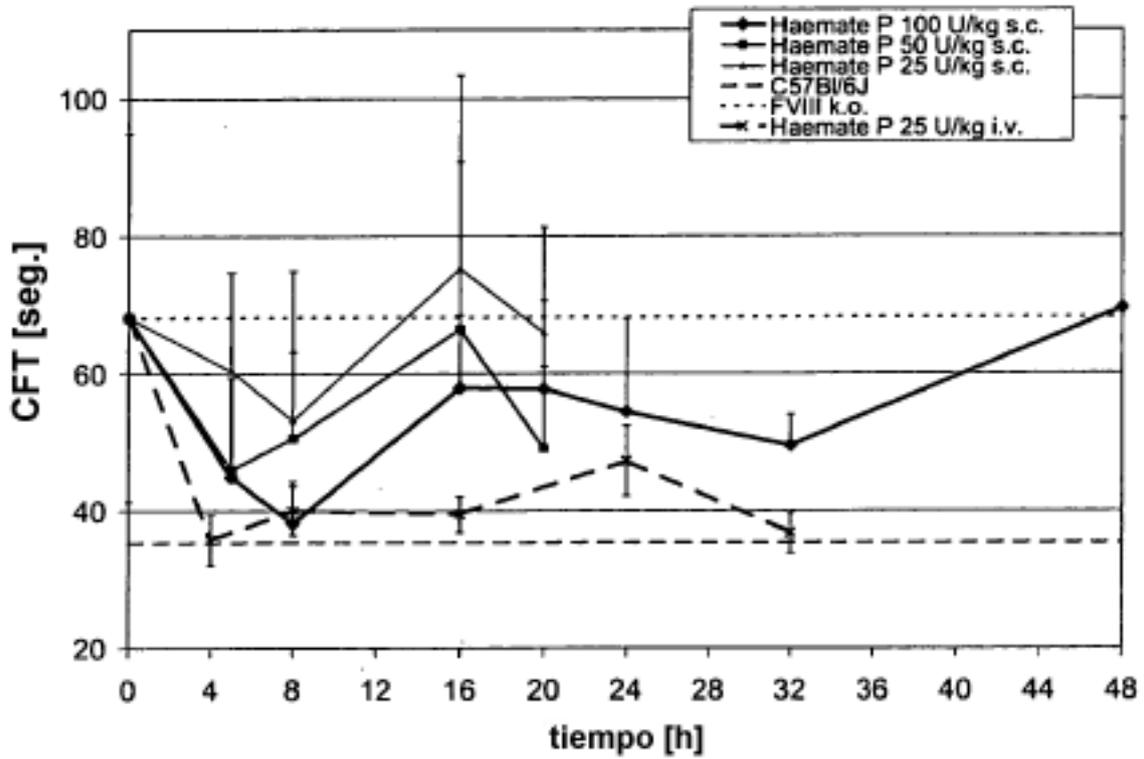


Figura 9: Alfa (in TEM) a continuación de una inyección s.c. de Haemate® P (n = 7-24; media + DT)

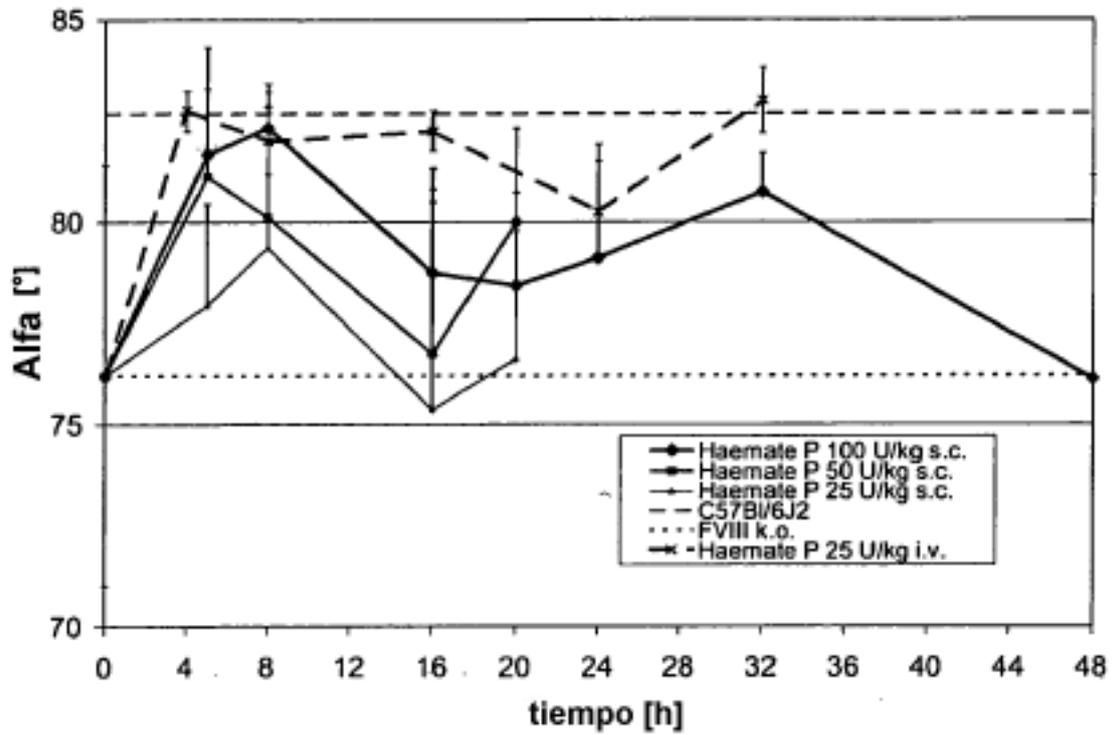


Figura 10: Comparación de la farmacocinética de FVIII:Ag humano en ratones ko con FVIII a continuación de una inyección i.v. de 100 U de (FVIII:C)/kg de Haemate[®] P, o Helixate[®] (media +DT; n =3-5/momento)

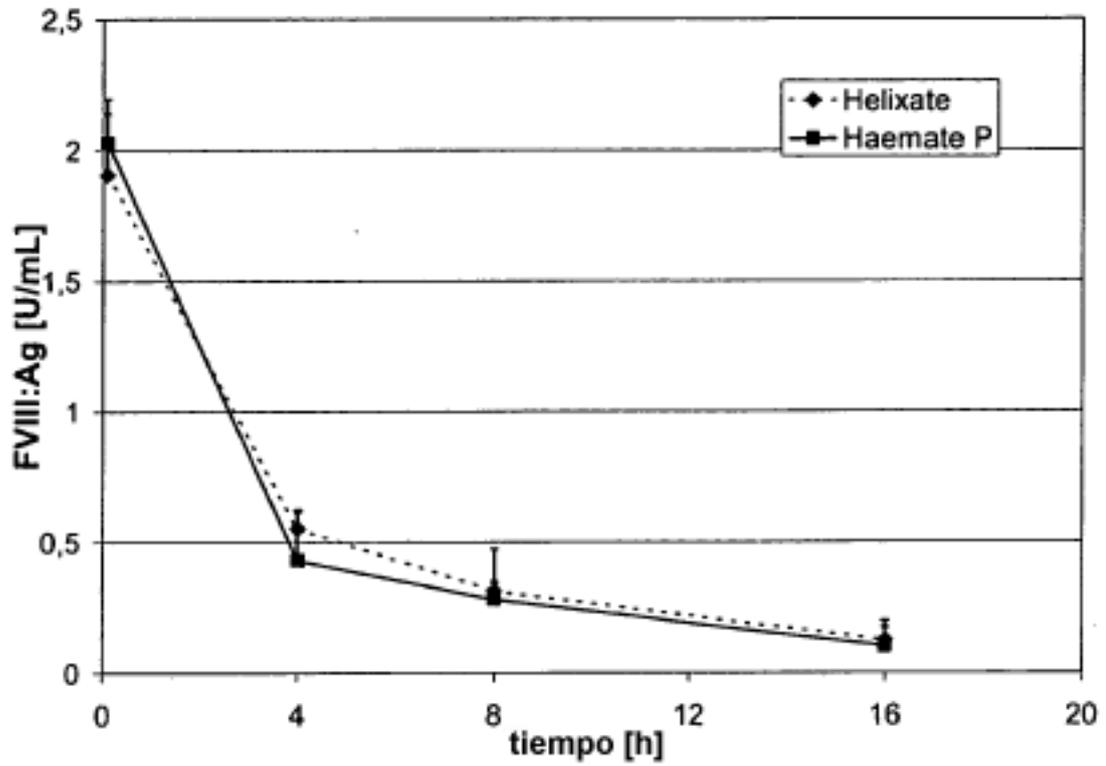


Figura 11: Comparación de la farmacocinética de FVIII:Ag humano en ratones ko con VWF a continuación de una inyección i.v. de 50 U de (FVIII:C)/kg de Haemate® P y Monoclate P (media +DT; n = 5-6/momento)

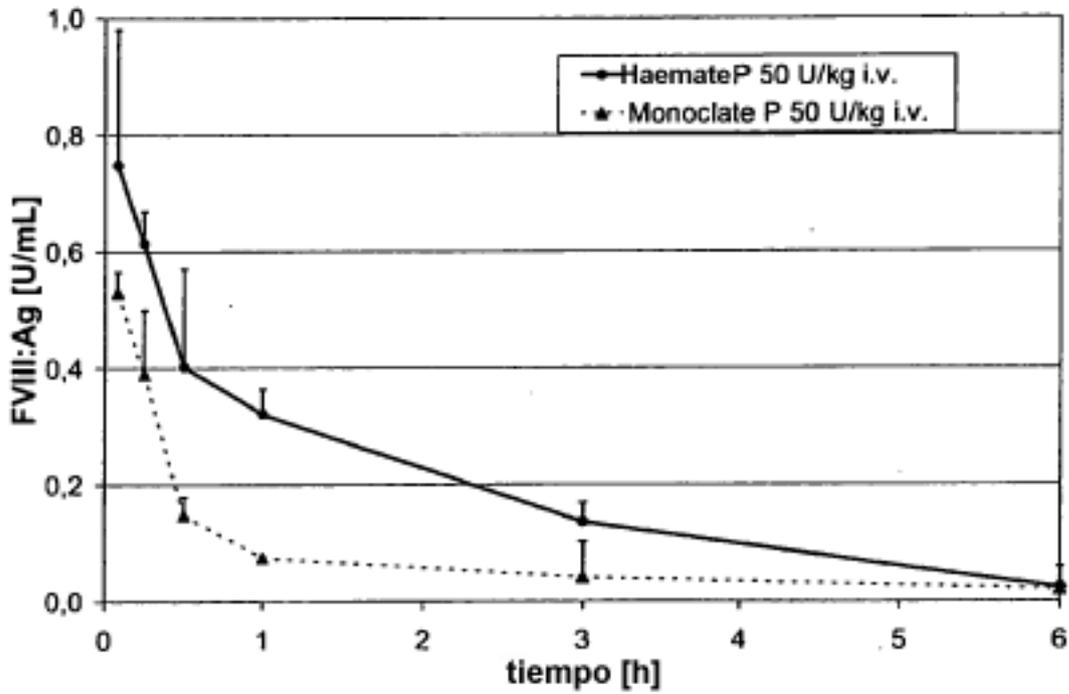


Figura 12: Comparación de la actividad de FVIII en un plasma a continuación de una inyección s.c. de 400 U de (FVIII:C)/kg de Haemate® P a ratones ko con FVIII y ko con VWF (media +DT; n = 4-5/momento)

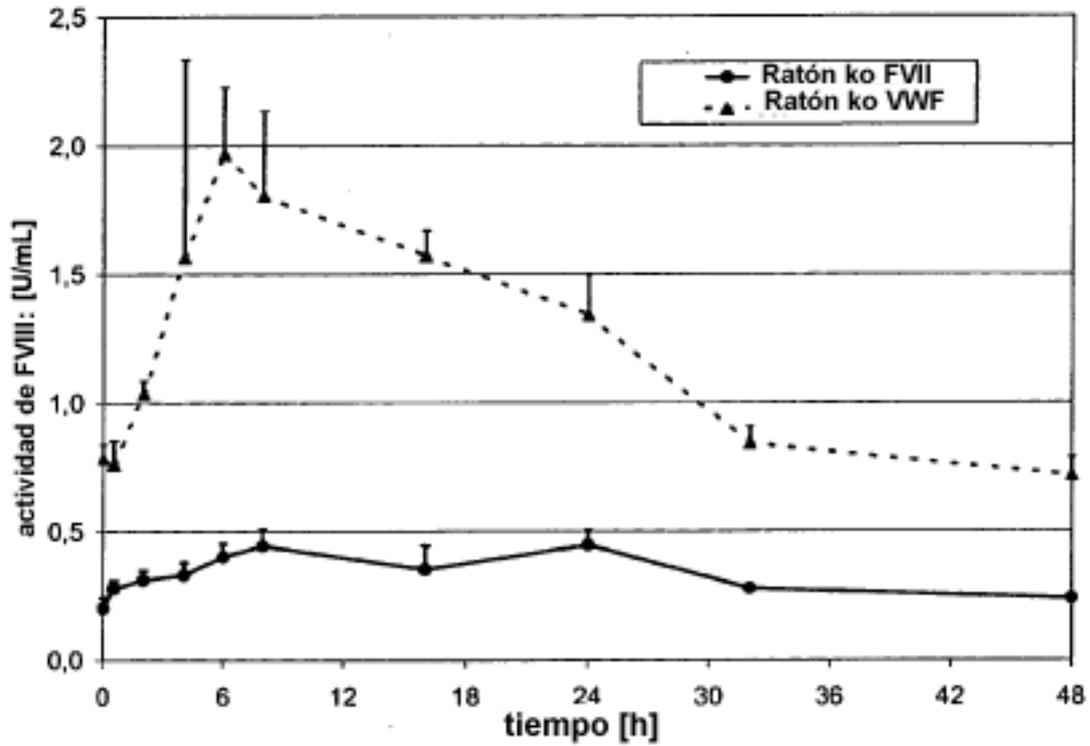


Figura 13: Curso en el tiempo de un VWF:Ag a continuación de una inyección s.c. de 2.300 U de VWF:Ag/kg de Haemate® P a conejos (media + DT; n = 4/momento)

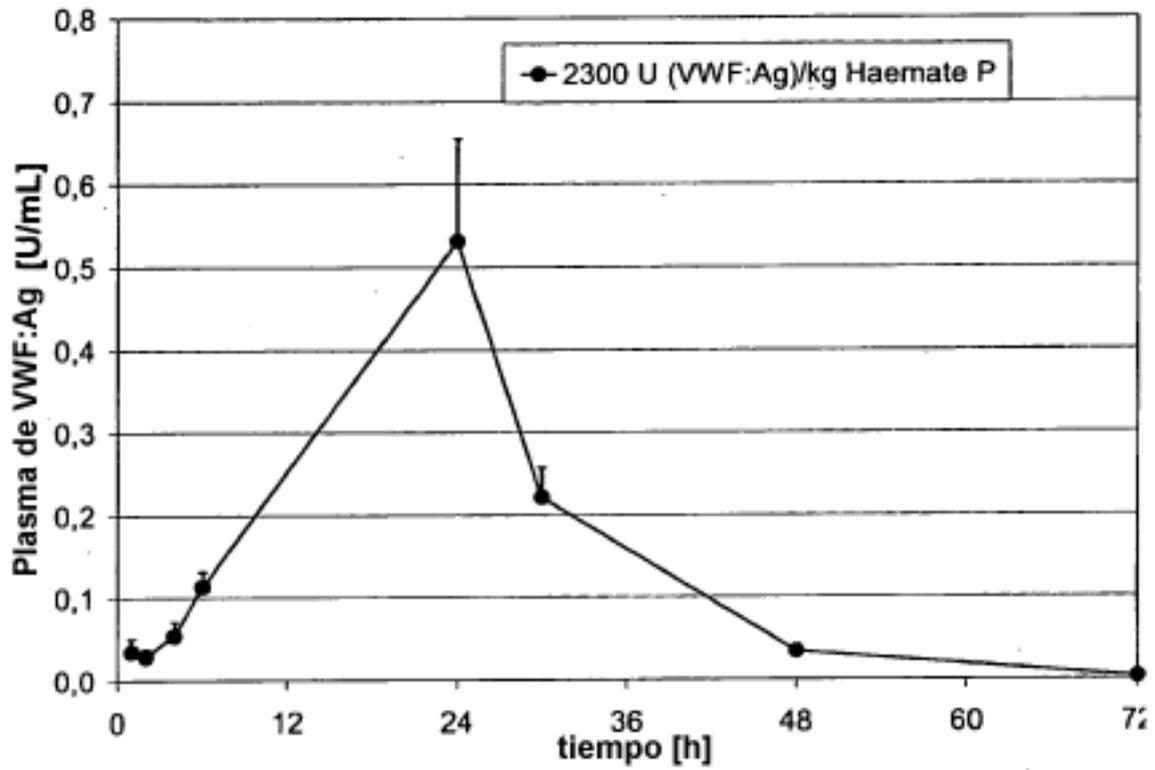


Figura 14: Curso en el tiempo del nivel de VWF:Ag, VWF:RcoF y FVIII:C en plasma medio + DT hasta 3 días a continuación de una inyección s.c. de 523 U de (VWF:Ag)/kg (n = 5/momento)

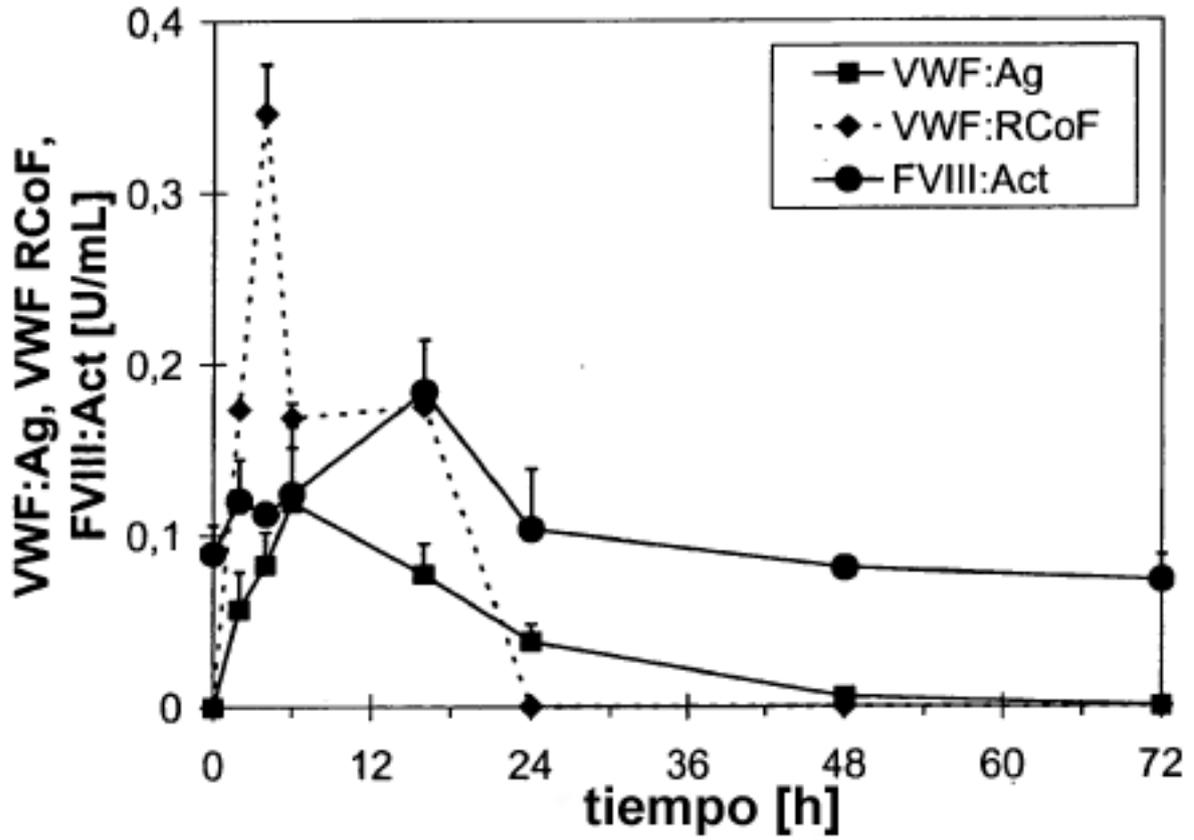


Figura 15: Cometido del VWF para la generación de anticuerpos anti-FVIII y de anticuerpos inhibidores de FVIII (ensayo de Bethesda) a continuación de una administración por vía i.v. o s.c. de FVIII

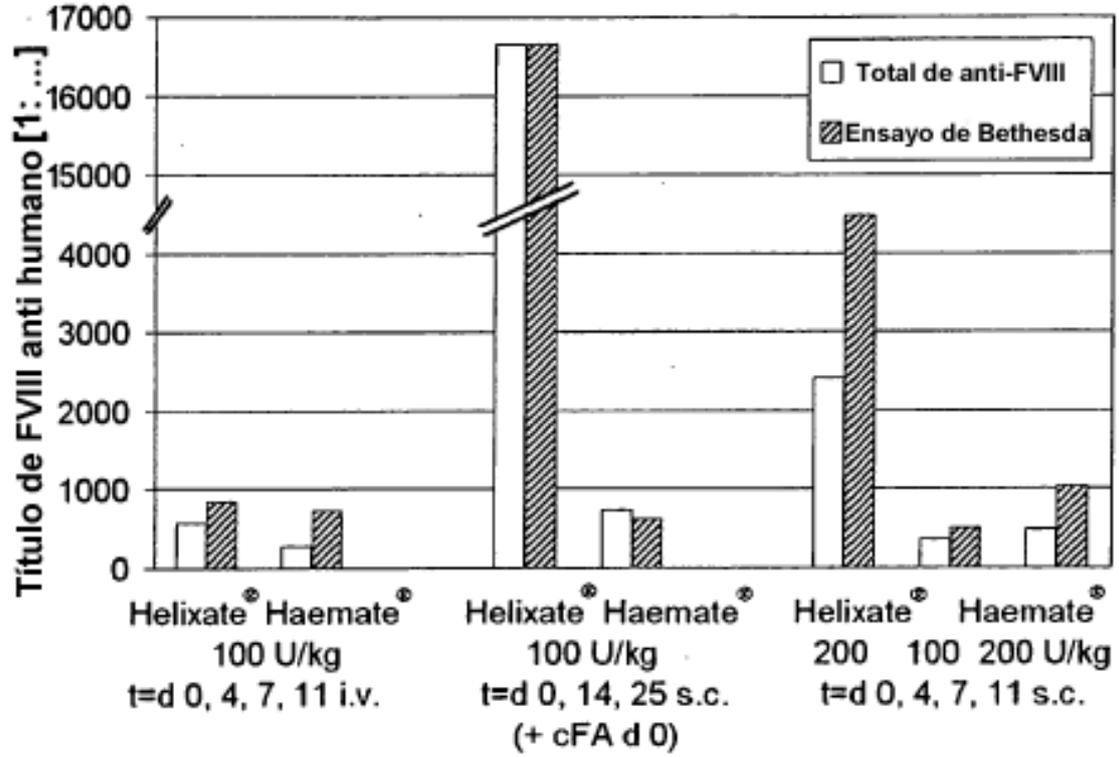


Figura 16: Curso en el tiempo de los niveles de la actividad de FVIII en plasma medios \pm DT a continuación de una inyección s.c. de 500 U de preparaciones de (FVIII:C)/kg de Haemate® P, caracterizado por diferentes relaciones de VWF:RCo / VWF:Ag (n = 4/momento)

