

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 574**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2006 E 06800183 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1907540**

54 Título: **Activación en solución de factor VII**

30 Prioridad:

**22.07.2005 US 702041 P**

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

**20.03.2013**

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)  
555 White Plains Road  
Tarrytown, NY 10591 /, US**

72 Inventor/es:

**KREBBER, CLAUS, M. y  
VISWANATHAN, SRIDHAR**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 398 574 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

Activación en solución de factor VII

**Campo de la invención**

La presente invención está dirigida a un procedimiento para la activación del factor VII a FVIIa en solución.

5 **Antecedentes de la invención**

10 El factor VII (FVII), una proteína importante en la cascada de coagulación sanguínea, es una proteína plasmática dependiente de vitamina K sintetizada en el hígado y secretada en la sangre en forma de una glucoproteína monocatenaria con un peso molecular de 53 kDa. El precursor de FVII (a veces designado como "FVII monocatenario" o FVII<sub>mc</sub>) se convierte en la forma activada (FVIIa) mediante escisión proteolítica en un solo sitio, R152-I153, dando como resultado dos cadenas ligadas por un solo puente disulfuro. El FVIIa humano recombinante está comercialmente disponible en Novo Nordisk con el nombre NovoSeven® y se usa para el tratamiento de episodios hemorrágicos, por ejemplo en hemofilia o traumatismo. Se han reseñado también variantes producidas recombinantemente de FVII humano.

15 La conversión del factor VII en factor VIIa activo puede conseguirse usando el factor XIIa como se describe por Hedner y Kisiel (J. Clin. Invest. 71: 1836-1841, 1983), u otra proteasa que tenga especificidad de tipo tripsina (Kisiel y Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73: 29-42, 1983).

20 La activación de FVII a FVIIa puede lograrse también sin el uso de proteasa añadida empleado el FVII mismo, que tiene actividad autoproteolítica a través de su dominio de serinproteasa. Dicha "autoactivación" se ha logrado poniendo en contacto FVII con una superficie o resina cargada positivamente, tal como una resina de intercambio aniónico (Pedersen A. H. *et al.* Biochemistry 28: 9331-9336, 1989). Cuando se efectúa, por ejemplo, en formato de columna, el FVIIa activo puede liberarse de la superficie o resina cargada positivamente, por ejemplo, aumentando la fuerza iónica, reduciendo el pH o aumentando la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el tampón (Bjoern *et al.*, Research Disclosures 269: septiembre de 1986, pág. 564-565).

25 Aunque el uso de una superficie o resina cargada positivamente para la activación de FVII a FVIIa (a veces designada como activación "en fase sólida" o "en columna") evita el uso de proteasa o factor tisular añadido extrínsecamente, hay desventajas en dicho procedimiento. Puesto que la actividad proteasa de FVII intrínseca puede conducir también a la autodegradación de FVIIa, es esencial una monitorización cuidadosa de los parámetros de proceso críticos para limitar la formación de productos de degradación relacionados con el producto. Sin embargo, la activación que emplea una superficie o resina cargada positivamente, tal como a través de una columna de intercambio iónico, es altamente dependiente de una variedad de factores interdependientes que son difíciles de optimizar. Además, dichos procesos de activación en fase sólida o en columna no son susceptibles de un aumento de escala directo (por ejemplo, para fabricación) ni de una reducción de escala (por ejemplo, para optimización a pequeña escala y ensayo de parámetros múltiples).

30 Existe la necesidad de un procedimiento eficaz, fiable y reproducible para activar FVII a FVIIa en solución sin el uso de proteasa, factor tisular ni fosfolípido extrínsecos, que sea susceptible de cambios de escala, se optimice fácilmente y conduzca a una calidad mejorada del producto proteico activado final. El procedimiento de activación en solución descrito en la presente memoria satisface esta necesidad.

**Sumario de la invención**

40 Se han explorado las posibilidades de activar FVII a FVIIa en solución, es decir, sin poner en contacto el FVII con una superficie sólida tal como una resina de intercambio iónico para potenciar la activación, en ausencia de proteasa, factor tisular o fosfolípido añadido, y se ha encontrado sorprendentemente que se obtienen resultados excelentes usando este procedimiento de activación en solución.

45 Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para activar FVII a FVIIa en solución que comprende: obtener una solución que comprende una preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>mc</sub>; añadir a la solución un compuesto de amina y Ca<sup>2+</sup> a una concentración final de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM (tal como de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM), y ajustar el pH final de la solución a aproximadamente 7,2 a 8,6 (tal como de aproximadamente 7,6 a aproximadamente 8,2); incubar la mezcla de activación resultante a entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 25°C durante un periodo de tiempo suficiente para convertir al menos un 90% del FVII<sub>mc</sub> en FVIIa y, opcionalmente, aislar el FVIIa de la mezcla de activación. La solución que comprende la preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>mc</sub> contiene, por ejemplo, al menos un 80% de FVII<sub>mc</sub> respecto a FVIIa u otros fragmentos derivados de FVII tal como, por ejemplo, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 92%, al menos un 95% o al menos un 98% de FVII<sub>mc</sub> respecto a FVIIa u otros fragmentos derivados de FVII.

50 En una realización, el compuesto de amina se selecciona de Tris, lisina, arginina, fosforilcolina o betaina. En algunos casos, el compuesto de amina se añade a una concentración final de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500

mM (tal como de aproximadamente 100 mM) a la mezcla de activación. En algunos casos, se incluye un tampón tal como borato o HEPES para ajustar el pH de la mezcla de activación al pH deseado.

5 En una realización, la mezcla de activación tiene una concentración inicial de FVII<sub>Imc</sub> de al menos 4 mg/ml tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 4 mg/ml y 10 mg/ml. En otra realización, la mezcla de activación tiene una concentración inicial de FVII<sub>Imc</sub> de aproximadamente 1 mg/ml a 4 mg/ml, y la mezcla de activación comprende adicionalmente un potenciador de la activación. Algunos de dichos potenciadores de la activación incluyen polietilenglicol, glicerol y etilenglicol tales como, por ejemplo, PEG4000, PEG8000 o glicerol. En algunos casos, está presente PEG4000 o PEG8000 a entre aproximadamente 1% y 10% (p/v) en la mezcla de activación tal como, por ejemplo, 5% de PEG4000 o 5% de PEG8000. En algunos casos, está presente glicerol o etilenglicol a entre aproximadamente 5% y 15% (v/v) en la mezcla de activación tal como, por ejemplo, 10% de glicerol o 10% de etilenglicol.

15 En otra realización, los componentes de la mezcla de activación se ajustan de tal modo que el periodo de tiempo suficiente para convertir al menos un 90% del FVII<sub>Imc</sub> en FVIIa esté entre aproximadamente 4 horas y 24 horas a temperatura ambiente fría (por ejemplo, de aproximadamente 2 a 8°C, tal como aproximadamente a 4°C) o a temperatura ambiente (por ejemplo, de aproximadamente 18 a 25°C, tal como aproximadamente a 20°C o 22°C). En algunos casos, los componentes de la mezcla de activación se ajustan de tal modo que el periodo de tiempo suficiente para convertir al menos un 90% del FVII<sub>Imc</sub> en FVIIa esté entre aproximadamente 8 horas y 24 horas a temperatura ambiente fría (de aproximadamente 2 a 8°C, tal como aproximadamente a 4°C), tal como entre aproximadamente 8 horas y 16 horas.

20 En una realización, el FVII es una variante de FVII que difiere en 1-15 residuos aminoacídicos de la secuencia aminoacídica de FVII humano de tipo silvestre (SEQ ID NO:1). En otra realización, la variante de FVII comprende las sustituciones P10Q o K32E. En otra realización, la variante de FVII comprende las sustituciones P10Q y K32E. En otra realización, la variante de FVII comprende las sustituciones P10Q, K32E, T106N y V253N.

25 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para activar FVII a FVIIa en solución que comprende obtener una solución que comprende una preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>Imc</sub>; añadir Tris o lisina a la solución a una concentración final de aproximadamente 0,1 M; añadir Ca<sup>2+</sup> a una concentración final de aproximadamente 5 mM a 50 mM (tal como de aproximadamente 10 a 30 mM); ajustar el pH final de la solución a aproximadamente pH 8, en el que la concentración de FVII<sub>Imc</sub> es de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml; incubar la mezcla de activación resultante a temperatura ambiente fría (por ejemplo, aproximadamente a 4°C) durante de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 24 horas (tal como de aproximadamente 8 horas a 16 horas) y, opcionalmente, aislar el FVIIa de la mezcla de activación.

30 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para activar FVII a FVIIa en solución que comprende obtener una solución que comprende una preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>Imc</sub>; añadir Tris o lisina a la solución a una concentración final de aproximadamente 0,1 M, añadir Ca<sup>2+</sup> a una concentración final de aproximadamente 5 mM, añadir PEG4000, PEG8000 o glicerol a aproximadamente 5%, 5% o 10%, respectivamente, ajustar el pH final de la solución a aproximadamente 8,0, en el que la concentración de FVII<sub>Imc</sub> es de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml; incubar la mezcla de activación resultante a temperatura ambiente fría (por ejemplo, aproximadamente a 4°C) durante de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 24 horas y, opcionalmente, aislar el FVIIa de la mezcla de activación.

40 Estos y otros objetos y rasgos de la invención resultarán más claramente evidentes al leer la siguiente descripción detallada junto con las figuras acompañantes.

### Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 muestra un gel de PAGE-SDS de una preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>Imc</sub> preparada según los Materiales y procedimientos, después de incubación durante los tiempos indicados a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) en histidina 10 mM, NaCl 120 mM, 0,01% de Tween 80 con CaCl<sub>2</sub> 0,25 mM a 50 mM según se indica, pH 6. La densitometría indica que la preparación es al menos un 95% de FVII<sub>Imc</sub> (concretamente, menos de un 5% de FVII u otros fragmentos derivados de FVII) y que la preparación de FVII<sub>Imc</sub> no experimenta una autoactivación o degradación detectable en las condiciones mostradas.

50 Las Figuras 2A y 2B muestran la activación en solución de FVIIa desde una preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>Imc</sub>. Se añadió a la preparación de FVII<sub>Imc</sub> 8 mg/ml (mostrada en el carril C de la Fig. 2B) Tris (T), lisina (L) o tanto Tris como lisina (T/L) a una concentración total final de 0,1 M y un pH final de 8 en presencia de CaCl<sub>2</sub> 5 mM o 2,5 mM de cada uno de CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>. Se incubaron las mezclas de activación durante 8 h (Fig. 2A) o 16 h (Fig. 2B) aproximadamente a 4°C o aproximadamente a 20°C según se indica.

55 La Figura 3 muestra la activación en solución a FVIIa de una preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>Imc</sub>. Se añadió a la preparación de FVII<sub>Imc</sub> 4 mg/ml (mostrada en el carril 7) Tris o lisina a una concentración total final de 0,1 M en presencia de CaCl<sub>2</sub> 5 mM y un pH final de 7,2 o 8, según se indica. Se incubaron las mezclas de activación durante 16 h a aproximadamente 4°C o aproximadamente 20°C según se indica.

La Figura 4 muestra una señal de HPLC-FI del pico de FVIIa después de reacciones de activación en solución en presencia de diversos potenciadores de la activación. Se llevó a cabo la activación de FVII<sub>mc</sub> 3,5 mg/ml durante 16 h a aproximadamente 4°C en presencia de Tris 0,1 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 8, y los potenciadores de la activación PEG 4000, PEG 8000, glicerol y etilenglicol según se indica. Se analizaron los productos de reacción mediante HPLC-FI en una columna C8 de 2,1 mm de diámetro x 150 mm de longitud, 300 Å, 5 mm de Grace Vydac. La fase móvil A era 0,1% de TFA, 30% de acetonitrilo y la fase móvil B era 0,1% de TFA, 80% de acetonitrilo. Se equilibró la columna con 30% de acetonitrilo, 0,1% de TFA a 0,2 ml/min a una temperatura de columna de 70°C y se resolvieron las muestras de FVII<sub>mc</sub> o FVIIa usando un gradiente de 20-60% de B durante 37 min a 0,2 ml/min con detección a 214 nm.

### Descripción detallada de la invención

#### 10 DEFINICIONES

En la descripción y reivindicaciones siguientes, se aplican las siguientes definiciones:

El término "zimógeno de FVII" o "FVII<sub>mc</sub>" se refiere a una molécula de FVII proporcionada en forma monocatenaria.

El término "FVIIa" se refiere a una molécula de FVII proporcionada en su forma bicatenaria activada, en la que se ha escindido el enlace peptídico entre R152 e I153 de la forma monocatenaria.

15 Los términos "FVIIr" y "FVIIar" se refiere a moléculas de FVII y FVIIa, respectivamente, producidas mediante técnicas recombinantes. Estas pueden tener la secuencia humana de tipo silvestre o pueden ser variantes de la secuencia humana.

Los términos "FVIIh" y "FVIIah" se refieren a FVIIa y FVIIa humanos de tipo silvestre, respectivamente.

20 A menos que se indique en contra, o resulte evidente por el contexto, los términos "FVII", "proteína FVII" y "factor VIII" como se usan en la presente memoria se pretende que incluyan las formas monocatenaria y activada de FVII, y que incluyan la secuencia de tipo silvestre recombinante de FVII humano así como variantes de la misma.

El término "autoactivación" designa la activación de FVII a FVIIa sin la adición de otra proteasa tal como factor XIIa u otra proteasa con especificidad de tipo tripsina.

25 Una "preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>mc</sub>" comprende predominantemente FVII<sub>mc</sub> respecto a FVIIa u otros fragmentos derivados de FVII; es decir, comprende al menos un 80% de FVII<sub>mc</sub> y menos de un 20% de FVIIa u otros fragmentos derivados de FVII. La preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>mc</sub> puede comprender, por ejemplo, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 92%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de FVII<sub>mc</sub>, respecto a FVIIa u otros fragmentos derivados de FVII en la preparación. La cantidad de FVII<sub>mc</sub>, FVIIa y otros fragmentos derivados de FVII en una preparación, en una solución o en una mezcla puede determinarse mediante procedimientos conocidos en la materia tales como cuantificación de bandas en geles electroforéticos o transferencias Western, por ejemplo, mediante inspección visual o densitometría, detección espectrofotométrica y cuantificación de picos que eluyen de una columna de separación analítica y similares. Una preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>mc</sub> a menudo da lugar a esencialmente una banda en un gel de PAGE-SDS reductor (véase, por ejemplo, la Fig. 1).

35 Un "potenciador de la activación" es un compuesto que acelera la activación de FVII<sub>mc</sub> cuando está presente FVII<sub>mc</sub> a bajas concentraciones (por ejemplo, menos de aproximadamente 4 mg/ml, tal como más de aproximadamente 0,5 mg/ml y menos de aproximadamente 4 mg/ml) en la mezcla de activación. Dichos potenciadores de la activación incluyen, por ejemplo, polietilenglicol, glicerol y etilenglicol.

#### ACTIVACIÓN EN SOLUCIÓN DE FVII

40 La proteína FVII que puede activarse mediante el procedimiento de la invención incluye FVII recombinante humana y variantes del mismo. Las variantes que pueden activarse mediante el procedimiento de la invención incluyen, por ejemplo, aquellas descritas en los documentos WO 01/58935, WO 03/093465, WO 2004/029091, WO 2004/111242, WO 99/20767, WO 00/66753, WO 88/10295, WO 92/15686, WO 02/29025, WO 01/70763, WO 01/83725, WO 02/02764, WO 02/22776, WO 02/38162, WO 02/077218, WO 03/027147, WO 03/037932, WO 2004/000366, WO 2004/029090, WO 2004/108763 y US 20050164932. La proteína FVII puede producirse, por ejemplo, en células eucarióticas tales como células de mamífero o levadura, más preferiblemente en células de mamífero tales como células CHO, células HEK o células BHK.

50 La variante de FVII puede incluir una o más sustituciones, inserciones o deleciones en comparación con el FVII humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) dando como resultado, por ejemplo, una variante que difiere en 1-15 residuos aminoacídicos de la secuencia aminoacídica de FVII humano de tipo silvestre, típicamente en 1-10 o en 2-10 residuos aminoacídicos, por ejemplo, en 1-8 o en 2-8 residuos aminoacídicos, tal como en 3-7 o en 4-6 residuos aminoacídicos de la secuencia aminoacídica, siendo las diferencias en la secuencia aminoacídica de tipo silvestre típicamente sustituciones. Dichas sustituciones pueden efectuarse, por ejemplo, con el objeto de introducir uno o más sitios de glucosilación o PEGilación *in vivo* en la proteína y/o para mejorar o modificar de otro modo la actividad coagulante de la

5 proteína de tipo silvestre; dichas variantes se describen, por ejemplo, en los documentos WO 01/58935, WO 03/093465, WO 2004/029091, WO 2004/111242 y US 20050164932. En una realización, la variante de FVII comprende una o más de las sustituciones P10Q, K32E y A34E. En otra realización, la variante de FVII comprende las sustituciones P10Q y K32E. En otra realización, la variante de FVII comprende una o más de las sustituciones T106N o V253N. En otra realización, la variante FVII comprende las sustituciones P10Q, K32E, T106N y V253N. En otra realización, la variante de FVII comprende las sustituciones P10Q, K32E, A34E, T106N y V253N. En otra realización, la variante de FVII comprende las sustituciones P10Q, K32E, A34E, R36E, T106N y V253N.

10 Una solución que comprende una preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>mc</sub> que contiene al menos un 80% de FVII<sub>mc</sub> respecto a FVII<sub>a</sub> u otros fragmentos derivados de FVII tal como, por ejemplo, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 92%, al menos un 95% o al menos un 98% de FVII<sub>mc</sub> respecto a FVII<sub>a</sub> u otros fragmentos derivados de FVII, puede obtenerse según el procedimiento descrito a continuación, o mediante cualquier otro procedimiento conocido por los especialistas en la materia. Se añade a esta solución lo siguiente: un compuesto de amina tal como Tris, lisina, arginina, fosforilcolina o betaína, a una concentración final de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM, tal como de aproximadamente 100 mM.

15 Se añade Ca<sup>2+</sup> (generalmente CaCl<sub>2</sub>) a una concentración final de al menos 2 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM a 50 mM, tal como de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM.

20 Se ajusta el pH final de la solución a entre aproximadamente pH 7,2 y 8,6, por ejemplo aproximadamente de pH 7,4 a 8,4, tal como aproximadamente de pH 7,6 a 8,2, por ejemplo aproximadamente a pH 8. Si se usan Tris, lisina, arginina o fosforilcolina en la mezcla de activación, a menudo no es necesario un tampón adicional para ajustar el pH al pH deseado. Si se usa betaína, que no tampona, se incluye un tampón adicional para ajustar el pH al pH deseado. El tampón adicional no tiene que ser un tampón que contenga amina; por ejemplo, el borato es un tampón adecuado. La concentración de NaCl en la mezcla de activación está generalmente entre aproximadamente 50 y 300 mM, preferiblemente es aproximadamente 100 mM.

25 Se incuba la mezcla de reacción resultante a entre aproximadamente 2 y aproximadamente 25°C, por ejemplo a "temperatura ambiente fría" (por ejemplo, de aproximadamente 2 a 8°C, tal como aproximadamente a 4°C) o a temperatura ambiente (por ejemplo, de aproximadamente 18 a 25°C, tal como aproximadamente a 20°C o aproximadamente a 22°C), durante un período de tiempo suficiente para convertir al menos un 90% del FVII<sub>mc</sub> en FVII<sub>a</sub>. La conversión de FVII<sub>mc</sub> en FVII<sub>a</sub> puede monitorizarse, por ejemplo, mediante electroforesis en gel en geles de PAGE-SDS reductor como se describe a continuación, mediante cromatografía de exclusión por tamaño o mediante cualquier otro medio conocido por los especialistas en la materia.

30 La concentración inicial de FVII<sub>mc</sub> en la mezcla de activación es generalmente de al menos 0,5 mg/ml, tal como de al menos 1 mg/ml, por ejemplo, al menos 4 mg/ml tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 4 mg/ml y 10 mg/ml. Si la mezcla de activación tiene una concentración inicial de FVII<sub>mc</sub> menor de 4 mg/ml, la mezcla de activación comprende además preferiblemente un potenciador de la activación tal como polietilenglicol, glicerol o etilenglicol tal como, por ejemplo, PEG4000, PEG8000 o glicerol. El PEG4000 o PEG8000 está preferiblemente presente a entre aproximadamente 1% y 10% (p/v) en la mezcla de activación tal como, por ejemplo, 5% de PEG4000 o 5% de PEG8000. El glicerol o etilenglicol está preferiblemente presente a entre aproximadamente 5% y 15% (v/v) en la mezcla de activación tal como, por ejemplo, 10% de glicerol o 10% de etilenglicol, preferiblemente 10% de glicerol.

35 Es una ventaja importante del procedimiento de activación en solución de la presente invención frente a los procedimientos de activación existentes, tales como aquellos que emplean una superficie cargada positivamente o resina de intercambio aniónico, que el proceso de activación en solución es más susceptible de optimización, por ejemplo a pequeña escala, y los parámetros así optimizados pueden aumentarse de escala fácilmente para fabricación a gran escala. Los parámetros para activación en solución a gran escala pueden ajustarse además más fácilmente para adaptarse a las variaciones de proceso. Las condiciones pueden establecerse para que la reacción de activación proceda en un marco temporal y a una temperatura práctica con fines de fabricación a gran escala tales como, por ejemplo, aproximadamente 4 horas, 8 horas, una noche (por ejemplo 16 horas) o 24 horas; preferiblemente de 4 horas a 16 horas y, por ejemplo, a temperatura "ambiente fría" o temperatura ambiente. La capacidad de controlar cuidadosamente el proceso de activación minimiza adicionalmente la formación de productos de degradación indeseables.

50 La invención se describirá adicionalmente con referencia al siguiente ejemplo no limitante.

### **Materiales y procedimientos**

#### **PREPARACIÓN DE FVII<sub>mc</sub>**

55 Se expresó una variante de FVII ejemplar que comprende las sustituciones P10Q K32E A34E R36E T106N y V253N (respecto a la SEQ ID NO: 1) en células CHO-K1 y se secretó la proteína variante de FVII en el medio de cultivo. Se esterilizó por filtración y se ultrafiltró el sobrenadante de cultivo. Se ajustó el pH de los sobrenadantes concentrados a 6 con ácido acético, se ajustó la concentración de CaCl<sub>2</sub> a 0,25 mM, se ajustó la concentración de L-histidina a 10 mM y se añadió Tween-80 al 0,04%.

Se cargó posteriormente el sobrenadante ajustado en una columna ANX Sepharose™ 4 FF o una columna Q-Sepharose™ FF (GE Healthcare) equilibradas anteriormente con L-histidina-HCl 25 mM, NaCl 140 mM, 0,04% de Tween-80, pH 6. Se lavó entonces la columna con L-histidina-HCl 25 mM, NaCl 140 mM, 0,04% de Tween-80, pH 6, seguido de L-histidina-HCl 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, 0,04% de Tween-80, pH 6. Se eluyó la proteína con L-histidina-HCl 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 34 mM, 0,04% de Tween-80, pH 6 cuando se usaba ANX-Sepharose 4 FF, o con L-histidina-HCl 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 33 mM, 0,04% de Tween 80, pH 6 cuando se usaba Q-Sepharose FF.

Se ajustó la solución eluida de la columna ANX- o Q-Sepharose a una concentración final de NaCl 100 mM antes de aplicar a una columna de afinidad por Mab (preparada mediante el acoplamiento de un anticuerpo monoclonal dependiente de calcio anti-dominio FVIII G1a con Sepharose FF activada con CNBr) equilibrada anteriormente con L-histidina-HCl 25 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 35 mM, pH 6. Se lavó la columna con L-histidina-HCl 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,25 mM, pH 6 y se eluyó el FVIII mc de la columna con L-histidina-HCl 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 6. El FVIII mc eluido de la columna de Mab tenía una pureza de aproximadamente 95% determinada visualmente en un gel de PAGE-SDS.

Se dializó o diafiltró la preparación de FVIII mc sustancialmente purificada frente a L-histidina-HCl 10 mM, NaCl 120 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,25 mM, pH 6, que contiene opcionalmente 0,01% de Tween-80, y se concentró adicionalmente la proteína según se desee. En estas condiciones, la preparación de FVIII mc era estable a temperatura ambiente (aprox. 20°C) durante al menos 24 horas en presencia de CaCl<sub>2</sub> 0,25 mM a 50 mM (Figura 1).

### Ejemplo 1

Se incubó FVII monocatenario (FVIII mc) preparado como se describe anteriormente a temperatura ambiente fría (aproximadamente a 4°C, con un intervalo de aproximadamente 2 a 8°C) o a temperatura ambiente (aproximadamente a 20°C, con un intervalo de aproximadamente 18 a 25°C) en diversas condiciones. Se monitorizó la presencia de cualquier producto de degradación adicional usando cuantificación espectrofotométrica de los picos eluidos de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o una columna de HPLC en fase inversa (HPLC-FI).

Los compuestos de amina Tris, lisina, arginina, fosforilcolina y betaína eran eficaces para convertir el FVIII mc en FVIIa cuando se añadían a la preparación de FVIII mc sustancialmente purificada en presencia de al menos CaCl<sub>2</sub> 5 mM a pH 8. Se encontró que Tris y lisina eran eficaces a concentraciones entre aproximadamente 50 mM y 0,5 M en presencia de CaCl<sub>2</sub> 5 mM y pH 8. Se encontró que arginina, fosforilcolina y betaína eran eficaces a una concentración final de aproximadamente 0,1 M en presencia de CaCl<sub>2</sub> 5 mM y pH 8. Generalmente no era necesario un agente de tamponación adicional para ajustar el pH de la mezcla de activación a 8 cuando se usaban Tris, lisina, arginina o fosforilcolina. Cuando se empleaba betaína, que no tampona, se añadió un tampón tal como borato, HEPES o TRIS a la mezcla de activación para ajustar el pH a 8. La concentración de NaCl en la mezcla de activación era generalmente de aproximadamente 100 mM.

La conversión de FVIII mc en FVIIa era sensible a la concentración de Ca<sup>2+</sup> en la mezcla de activación. La activación era mínima en presencia de CaCl<sub>2</sub> 0,25 mM, pero era notable en presencia de al menos CaCl<sub>2</sub> 2 mM, tal como en el intervalo de CaCl<sub>2</sub> 5 mM a CaCl<sub>2</sub> 50 mM, por ejemplo, de CaCl<sub>2</sub> 10 mM a CaCl<sub>2</sub> 30 mM. El Mg<sup>2+</sup> podría sustituir al menos a parte del Ca<sup>2+</sup>, como se demuestra a continuación.

Había una dependencia significativa de la concentración inicial de FVIII mc sobre el tiempo de activación. Las Fig. 2A y 2B muestran el curso temporal de la activación en solución de una concentración inicial de FVIII mc 8 mg/ml (mostrado en el carril 9 de la Fig. 2B). La Fig. 2A muestra que en presencia de Ca<sup>2+</sup> 5 mM y Tris 0,1 M o lisina 0,1 M a pH 8, la conversión de FVIII mc en FVIIa era esencialmente completa después de 8 horas a temperatura ambiente (TA, aproximadamente 20°C, carriles 1 y 2) y era aproximadamente un 95% completa después de 8 horas aproximadamente a 4°C (carriles 3 y 4). En estas condiciones, la activación en solución en presencia de Ca<sup>2+</sup> 2,5 mM más Mg<sup>2+</sup> 2,5 mM procedía ligeramente más lenta que en presencia de Ca<sup>2+</sup> 5 mM (carriles 5-9). Después de 16 horas (Fig. 2B), la conversión de FVIII mc 8 mg/ml en FVIIa era esencialmente completa tanto a 4°C como a TA, y a Ca<sup>2+</sup> 5 mM y Ca<sup>2+</sup> 2,5 mM más Mg<sup>2+</sup> 2,5 mM.

La Fig. 3 muestra que, a una concentración inicial de FVIII mc de 4 mg/ml, la conversión de FVIII mc en FVIIa a pH 8 y Ca<sup>2+</sup> 5 mM en presencia de Tris 0,1 M o lisina 0,1 M era esencialmente completa después de 16 horas a TA (carriles 4 y 6), y era aproximadamente un 90% completa después de 16 horas aproximadamente a 4°C (carriles 1 y 3). La Fig. 3 demuestra también el papel del pH en la reacción de activación en solución; la comparación de los carriles 1 y 2 y de los carriles 4 y 5 muestra que, siendo iguales todos los demás parámetros, la activación a pH 7,2 era más lenta que la activación a pH 8. La activación a pH 8,6 era comparable con la de pH 8,0 (datos no mostrados).

A concentraciones iniciales de FVIII mc menores de aproximadamente 4 mg/ml, se encontró que la presencia de un potenciador de la activación tal como PEG (por ejemplo, PEG4000 o PEG8000) y glicerol era eficaz en la aceleración de la reacción de activación, de tal modo que pudo conseguirse una activación significativa a las 16 horas sin generación de un nivel inaceptable de productos de degradación. Se observaron resultados óptimos usando 5% (p/v) de PEG4000, 5% (p/v) de PEG8000 y 10% (v/v) de glicerol (Fig. 4).

Por tanto, los parámetros tales como concentración de FVII<sub>mc</sub>, concentración de compuesto de amina, concentración de Ca<sup>2+</sup> o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, pH y temperatura pueden ajustarse para obtener el marco temporal deseado para la reacción de activación, lo que es particularmente útil en aplicaciones de fabricación a gran escala.

5 Aunque la invención precedente se ha descrito con cierto detalle con fines de claridad y comprensión, resultará evidente para un especialista en la materia tras la lectura de esta memoria descriptiva que pueden hacerse diversos cambios en formas y detalles sin apartarse del alcance real de la invención. Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria son solo con fines ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a la vista de los mismos por especialistas en la materia, y que se han de incluir en el ámbito de esta solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente pueden usarse en diversas combinaciones.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Maxygen Holdings Ltd.

Krebber, Claus M.

Viswanathan, Sridhar

15 <120> Activación en disolución de factor VII

<130> 0285wo210

<150> US 60/702.041

<151> 22-07-2005

<160> 1

20 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 406

<212> PRT

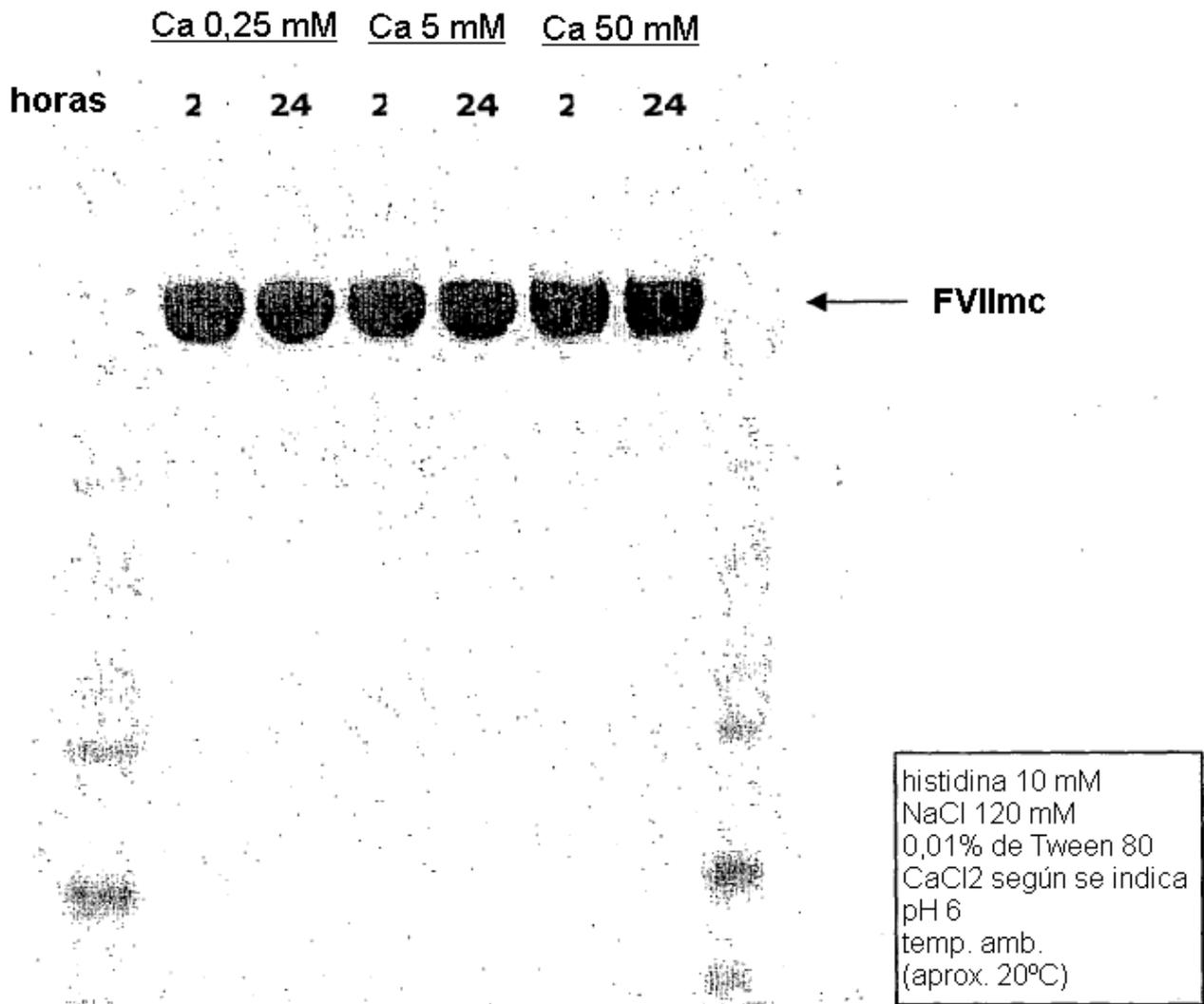
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
		20						25					30		
Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50					55					60				
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65					70					75					80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
			85						90					95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100					105					110		
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
		115					120					125			
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
	130					135					140				
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
145					150					155					160
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
			165						170					175	
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190		
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200				205				
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210					215					220				
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
225					230					235					240
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp
			245						250					255	
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260					265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280						285		
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295					300				
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340					345					350		
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
		355					360						365		
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
	370					375					380				
Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro										
				405											

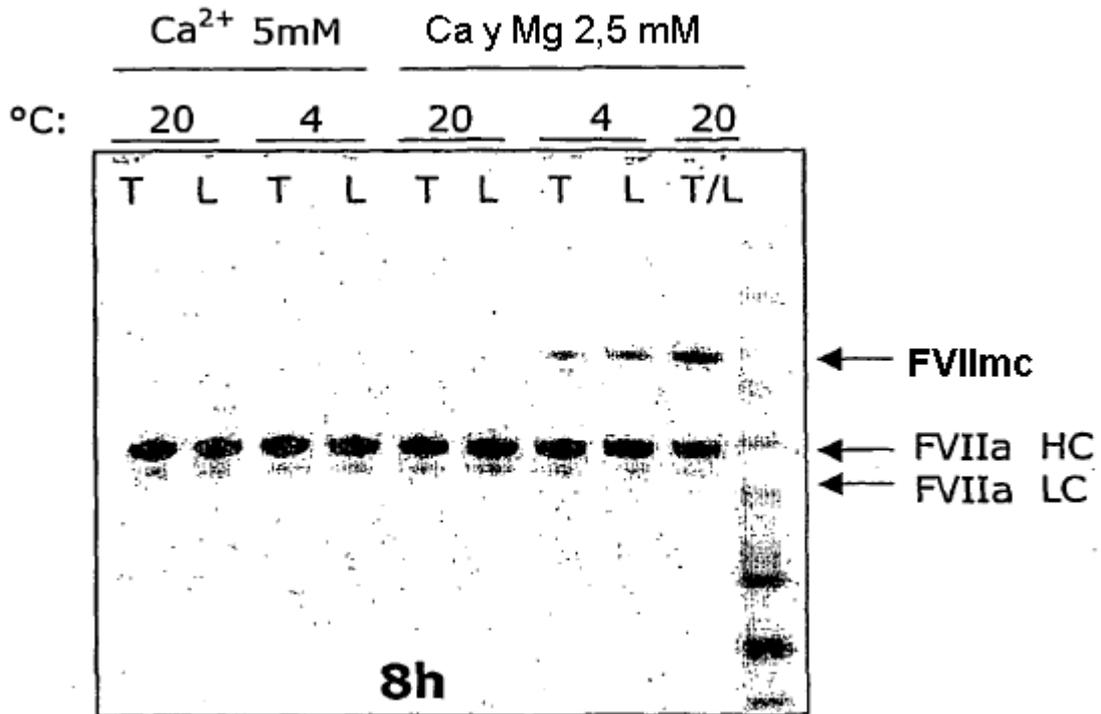
**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para activar FVII a FVIIa en solución que comprende
  - (a) obtener una solución que comprende una preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>mc</sub>;
  - (b) añadir a la solución un compuesto de amina, Ca<sup>2+</sup> a una concentración final de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, y ajustar el pH final de la solución hasta aproximadamente un pH de 7,2 a 8,6;
  - (c) incubar la mezcla de activación resultante a entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 25°C durante un periodo de tiempo suficiente para convertir al menos un 90% de FVII<sub>mc</sub> en FVIIa; y
  - (d) opcionalmente, aislar el FVIIa de la mezcla de activación.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución que comprende la preparación sustancialmente purificada de FVII<sub>mc</sub> contiene al menos un 85% de FVII<sub>mc</sub> respecto a FVIIa y otros fragmentos derivados de FVII.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto de amina es Tris, lisina, arginina, fosforilcolina o betaína.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto de amina se añade a una concentración final de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH final de la solución es de pH 7,6 a 8,2.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el pH final de la solución es de aproximadamente pH 8.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la mezcla de activación tiene una concentración inicial de FVII<sub>mc</sub> de al menos 4 mg/ml.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la mezcla de activación tiene una concentración inicial de FVII<sub>mc</sub> de aproximadamente 1 mg/ml a 4 mg/ml, y la mezcla de activación comprende adicionalmente un potenciador de la activación.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el potenciador de la activación es polietilenglicol, glicerol o etilenglicol.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el potenciador de la activación es PEG4000, PEG8000 o glicerol.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el periodo de tiempo suficiente para convertir al menos un 90% de FVII<sub>mc</sub> en FVIIa es entre aproximadamente 4 horas y 24 horas.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la mezcla de activación tiene una concentración inicial de FVII<sub>mc</sub> de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, el compuesto de amina es Tris o lisina a una concentración final de aproximadamente 0,1 M, la concentración de Ca<sup>2+</sup> es de 10 mM a 30 mM, el pH de la mezcla de activación es aproximadamente pH 8 y la solución se incuba a aproximadamente 4°C durante 8-24 horas.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el FVII es una variante de FVII que difiere en 1-15 residuos aminoacídicos de la secuencia aminoacídica de FVII humano (SEQ ID NO:1).
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la variante de FVII comprende las sustituciones P10Q y K32E.

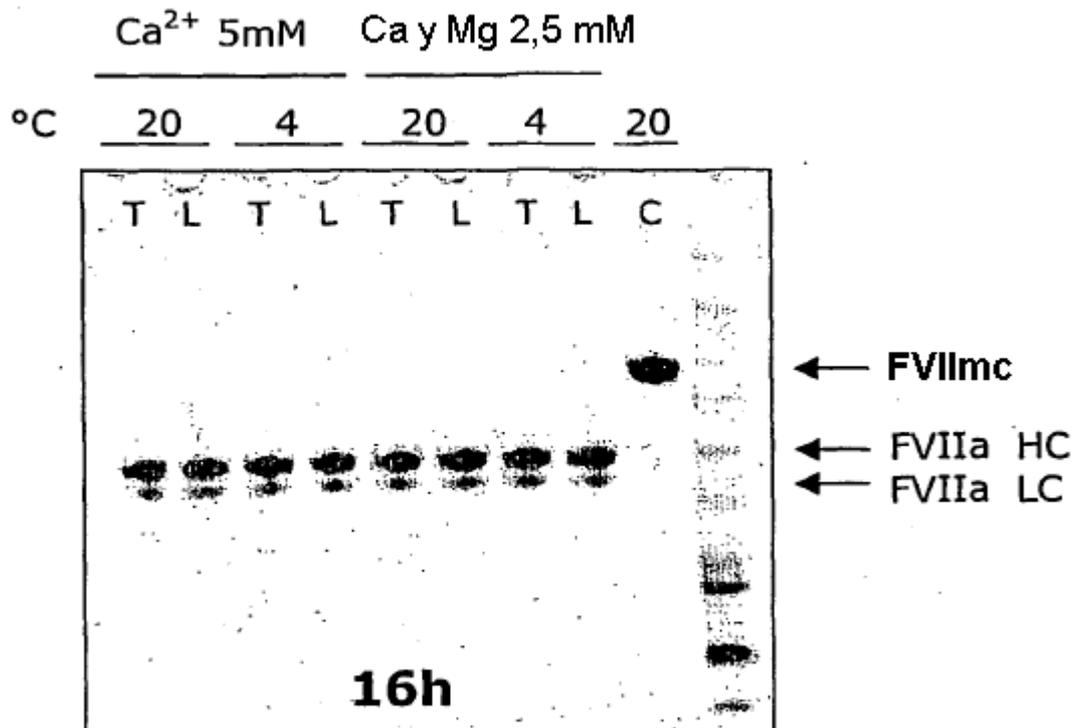


**Fig. 1**

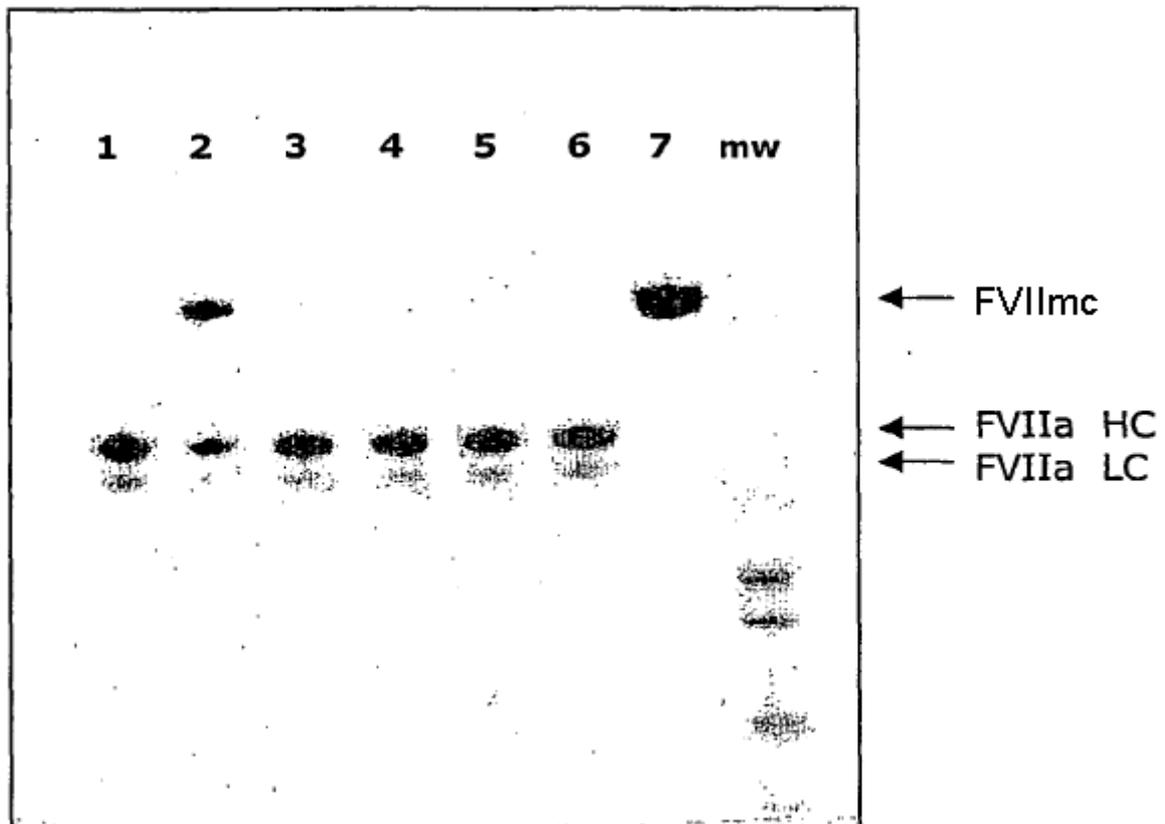
FVII<sub>mc</sub> 8 mg/ml, Tris 0,1 M (T) o lisina 0,1 M (L), pH 8



**Fig. 2A**



**Fig. 2B**



FVIIc 4 mg/ml  
 incubado durante 16 horas  
 con CaCl<sub>2</sub> 5 mM más lo siguiente:

- |    |              |        |        |
|----|--------------|--------|--------|
| 1. | Tris 0,1 M   | pH 8   | a 4°C  |
| 2. | Tris 0,1 M   | pH 7,2 | a 4°C  |
| 3. | Lys 0,1 M    | pH 8   | a 4°C  |
| 4. | Tris 0,1 M   | pH 8   | a 20°C |
| 5. | Tris 0,1 M   | pH 7,2 | a 20°C |
| 6. | Lys 0,1 M    | pH 8   | a 20°C |
| 7. | Control pH 6 |        | a 20°C |

**Fig. 3**

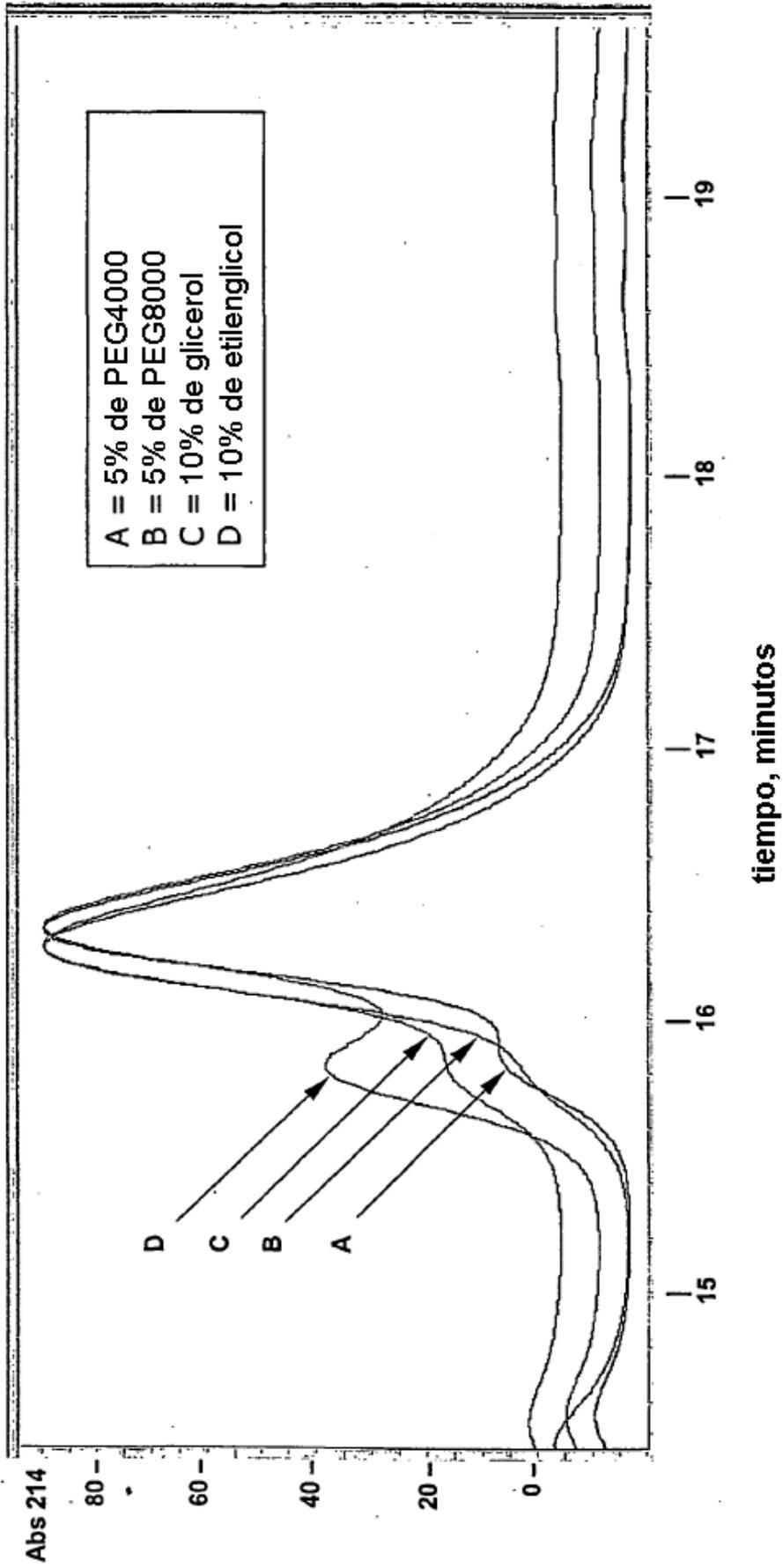


Fig. 4