

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 044**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2005 E 05740319 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1750733**

54 Título: **Procedimiento de administración de fVIII sin dominio B porcino**

30 Prioridad:

03.05.2004 US 568015 P

07.05.2004 US 569000 P

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

18.03.2014

73 Titular/es:

EMORY UNIVERSITY (33.3%)

1599 Clifton Road, NE 4th Floor

Atlanta, GA 30322, US;

BAXTER INTERNATIONAL INC. (33.3%) y

BAXTER HEALTHCARE SA (33.3%)

72 Inventor/es:

LOLLAR, JOHN S. y

BERGMAN, GARRETTE E.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 449 044 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

Procedimiento de administración de fVIII sin dominio B porcino

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La hemofilia A es una enfermedad caracterizada por un defecto en la coagulación de la sangre que produce una variedad de síntomas clínicos y es por último lugar potencialmente mortal. El tratamiento convencional de la enfermedad es la administración del factor de coagulación VIII (fVIII), una proteína plasmática de 300 kDa ausente o deficiente en pacientes con hemofilia A. La terapia no cura la enfermedad subyacente, pero mejora los síntomas. Por tanto, los pacientes deben recibir dosis repetidas de fVIII durante toda su vida. Aunque la administración de fVIII humano a pacientes con hemofilia A es un tratamiento eficaz, la terapia a largo plazo produce eficacia reducida para una proporción significativa de la población de pacientes. Aproximadamente el 20-35 % de los pacientes con hemofilia A desarrollan anticuerpos inhibidores para fVIII humano, independientemente de si el fVIII humano se deriva o no de plasma o se prepara por tecnología recombinante. Los pacientes que desarrollan anticuerpos inhibidores para fVIII humano experimentan eficacia reducida del tratamiento, y episodios hemorrágicos prolongados. Tales pacientes se han tratado satisfactoriamente con fVIII porcino, que es una proteína sustancialmente homóloga. El fVIII porcino es frecuentemente significativamente menos reactivo para los anticuerpos anti-fVIII humano encontrados en los pacientes inhibidores. HYATE:C, un fVIII porcino natural parcialmente purificado de plasma porcino reunido, había estado comercialmente disponible desde hace tiempo. Tanto fVIII humano como porcino purificado de plasma poseen posibles riesgos de contaminación de virus o partículas de priones. Tales riesgos son de especial preocupación para hemofílicos, que recibirán dosis repetidas durante una duración de la terapia. El fVIII humano recombinante y, más recientemente, fVIII porcino recombinante, se han desarrollado para sus indicaciones respectivas. Más específicamente, se ha producido un fVIII porcino recombinante que carece de la mayoría del dominio B y actualmente está siendo probado para aplicación clínica como sustituto de fVIII porcino purificado de plasma porcino reunido [patente de EE.UU. n° 6.458.563]. Los términos aplicados a estos productos son HYATE:C (fVIII porcino natural parcialmente purificado de plasma porcino reunido; OBI-1 (para fVIII porcino sin dominio B recombinante). OBI-1 también se llama POL-1212 en la patente de EE.UU. n° 6.458.563. Ambos nombres, OBI-1 y POL 1212, se refieren a la misma sustancia, fVIII porcino que tiene el dominio B deleciónado, excepto 12 aminoácidos en la parte del extremo N del dominio B y 12 aminoácidos en la parte del extremo C del dominio B. Estudios previos [Doering, C.B. y col. (2002) J. Biol. Chem. 277:39345-38349] han documentado que el dominio B de fVIII porcino puede delecionarse sin pérdida de actividad.

Hay varios informes de diversos procedimientos para proporcionar fVIII estable en una composición farmacéutica o formulación. La albúmina se ha usado frecuentemente para estabilizar estas formulaciones. Sin embargo, debido al coste y riesgo asociado a usar albúmina como estabilizador, hay varias composiciones farmacéuticas libres de albúmina que contienen fVIII en la materia. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.565.427 describe composiciones de fVIII que contienen un aminoácido o sus sales y un detergente tal como polisorbato o TWEEN 80, o un polímero orgánico tal como PEG; la patente de EE.UU. n° 5.605.884 desvela una composición de fVIII en un medio de alta fuerza iónica que consiste en cloruro sódico, cloruro de calcio e histidina; las patentes de EE.UU. n° 5.763.401 y 5.874.408 desvelan una composición de fVIII recombinante que contiene glicina, histidina, sacarosa, cloruro sódico y cloruro de calcio. Hay otros ejemplos de composiciones de fVIII que tienen diversas sales, tensioactivos no iónicos y antioxidantes (patente de EE.UU. n° 5.962.650, patente de EE.UU. n° 5.972.885, documento WO 89/09784 y documento WO 94/07510). El documento WO 03/080108 describe una composición farmacéutica sólida estable que carece de aminoácidos que contienen fVIII, un tensioactivo, cloruro de calcio, sacarosa, cloruro sódico, citrato de trisodio y un tampón, y tiene un pH de 6-8 antes de la liofilización y después de la reconstitución en agua para inyección.

Los documentos WO 01/68109 y US 6458563 se refieren a una forma sin dominio B modificada de factor VIII porcino, a un ADN que codifica el mismo y al uso del mismo para el tratamiento de hemofilia.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a los sorprendentes hallazgos experimentales de que OBI-1 tiene una biodisponibilidad 2-6 veces mayor en comparación con HYATE:C. La biodisponibilidad se refiere a los niveles en sangre alcanzados y mantenidos después de administrar una dosis dada. La biodisponibilidad puede evaluarse calculando el área bajo la curva (ABC) de los niveles en sangre representados en función del tiempo después de la administración de una dosis dada. Por consiguiente, en comparación con HYATE:C, OBI-1 puede administrarse a una dosis sustancialmente menor, expresada en unidades/kg de peso corporal, para proporcionar protección equivalente contra episodios hemorrágicos graves o en la prevención de episodios hemorrágicos para pacientes hemofílicos que están en estado no hemorrágico. Alternativamente, OBI-1 puede proporcionarse a la misma dosis que, o una dosis similar a, HYATE:C, pero a una frecuencia reducida de administración en comparación con HYATE:C, produciendo un control más rápido de la hemorragia y reduciendo la inconveniencia asociada a múltiples administraciones. Acoplado con el hecho de que OBI-1 está disponible a una mayor concentración en unidades/ml que HYATE:C, los hallazgos proporcionan un nuevo procedimiento de administración que es altamente ventajoso para el bienestar de pacientes y la calidad de vida. Los presentes tratamientos con HYATE:C (100 unidades/kg de

peso corporal) normalmente requieren infusión intravenosa de 280 ml de disolución de HYATE:C, a una tasa de 2-5 ml por minuto repetida cada 6-8 h. Tales tratamientos son tediosos, pueden durar 2 horas o más, y limitan gravemente la movilidad y calidad de vida del paciente. Por el contrario, bajo la presente invención, OBI-1 puede administrarse como una única inyección intravenosa de aproximadamente 10-100 unidades/kg de peso corporal, por ejemplo, 14 ml, requiriendo solo 5-15 minutos de administración y puede requerirse solo una vez, con el fin de detener una hemorragia, a diferencia de HYATE:C, que necesita una mediana de ocho administraciones separadas durante un periodo de dos días para detener un único episodio hemorrágico, según su prospecto. Cuando un paciente con hemofilia en necesidad de tal tratamiento tiene anticuerpos inhibidores preexistentes para fVIII humano que reaccionan significativamente de forma cruzada con OBI-1, requeriría más OBI-1 más allá de la dosificación administrada en el presente documento para neutralizar los anticuerpos. Usando OBI-1 se facilita un control más rápido de la hemorragia debido a que pueden lograrse más rápidamente mayores niveles de fVIII. Como se tratará más adelante, la dosis actual administrada a un individuo depende de varios factores individuales que incluyen peso corporal, volumen del plasma y título de anticuerpos residual para OBI-1. Los procedimientos para calcular la dosificación individual se han establecido bien a partir de estudios con HYATE:C. Los procedimientos para calcular la dosificación de OBI-1 requerirán, además, tener en cuenta la mayor eficacia *in vivo* recientemente descubierta y la biodisponibilidad de OBI-1.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que contienen OBI-1 para su uso en el tratamiento de un paciente en necesidad de fVIII en un modo más rápido y eficaz.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es una gráfica de recuperaciones de actividad de fVIII (Ejemplo 1), corregida para fVIII inicial después de una única inyección de tanto HYATE:C como OBI-1 en monos cinomolgos a la dosis indicada como se describe en el Ejemplo 1.

La Fig. 2 es una gráfica de resultados obtenida del experimento descrito en el Ejemplo 5. Los plasmas de pacientes individuales están dispuestos a lo largo del eje horizontal. El eje vertical indica U/ml de actividad de fVIII recuperada de los plasmas individuales después de la adición de fVIII como se describe en el Ejemplo 5. Los datos para plasmas de King George Biomedical se designan "buenos" o "malos" basándose en el comportamiento anómalo del último plasma (véase el Ejemplo 5).

La Fig. 3 es una gráfica que muestra las concentraciones en plasma de fVIII en seis pacientes humanos después de la administración intravenosa de OBI-1 o HYATE:C. El eje Y indica U/ml de actividad de fVIII recuperadas de los plasmas individuales como se mide por el ensayo de actividad de una etapa.

La Fig. 4 es una gráfica que muestra las concentraciones en plasma de fVIII en seis pacientes humanos después de la administración intravenosa de OBI-1 o HYATE:C. El eje Y indica U/ml de actividad de fVIII recuperadas de los plasmas individuales como se mide por el ensayo cromogénico como se describe en el presente documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En general, los términos y frases usados en el presente documento tienen su significado reconocido en la materia, que puede encontrarse por referencia a textos convencionales, referencias de revistas y contextos conocidos para aquellos expertos en la materia. Las siguientes definiciones se proporcionan para aclarar su uso específico en el contexto de la invención.

El término "vehículo fisiológicamente aceptable", como se usa en el presente documento, es una composición orgánica o inorgánica que sirve de vehículo/estabilizador del principio activo de la presente invención, OBI-1, en una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene deficiencia de factor VIII. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina tamponada con fosfato, solución salina, disolventes acuosos, en el que el agua se mezcla con alcanoles inferiores, aceites vegetales, polialquilenglicoles, gelatina basada en petróleo, etilcelulosa, oleato de etilo, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidina, miristato de isopropilo. Vehículos fisiológicamente aceptables incluyen adicionalmente albúmina, un aminoácido (por ejemplo, glicina, histidina, o sus sales), un detergente (iónico y no iónico) tal como polisorbato o TWEEN 80, un medio de alta fuerza iónica que consiste en sales de sodio, sales de calcio y/o histidina, mono-, di- o polisacáridos (por ejemplo, sacarosa) o alcoholes de azúcar, y otros diluyentes, aditivos o vehículos conocidos en la técnica. Para descripción detallada de diversos vehículos y aditivos véase la patente de EE.UU. n° 5.925.739; patente de EE.UU. n° 5.733.873; patente de EE.UU. n° 5.605.884; patente de EE.UU. n° 5.565.427; patente de EE.UU. n° 5.763.401; patente de EE.UU. n° 5.874.408; patente de EE.UU. n° 5.962.650; patente de EE.UU. n° 5.972.885; documentos WO 89/09784 y WO 94/07510.

Una composición farmacéutica que comprende OBI-1 para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene deficiencia de factor VIII es preferentemente una composición sólida obtenible por liofilización de una disolución que carece de aminoácidos que comprenden OBI-1, un tensioactivo o detergente, cloruro de calcio, sacarosa, cloruro sódico, citrato de trisodio y un tampón. La disolución tiene un pH de 6-8 antes de la liofilización y después de la

reconstitución en agua para inyección. El tensioactivo es preferentemente un tensioactivo no iónico tal como polisorbatos y copolímeros de bloque como poloxámeros (es decir, copolímeros de polietileno y propilenglicol). Un tensioactivo más preferido es un polisorbato que tiene un grado de polimerización medio de 20 a 100 unidades de monómero (preferentemente aproximadamente 80). El tensioactivo más preferido es polisorbato 80 derivado de una planta. El tampón es preferentemente tris(hidroximetil)metilamina, comúnmente conocida como "tris". Normalmente, la composición farmacéutica sólida se prepara por liofilización de la disolución que contiene OBI-1 a una concentración de 50 a 10.000 unidades/ml, un tensioactivo a una concentración que oscila de la anterior concentración micelar crítica al 1 % en v/v, cloruro de calcio a 0,5-10 mM, sacarosa a 5-50 mM, cloruro sódico a 0,15-50 mM, citrato de trisodio a 1-50 mM y un tampón a 1-50 mM. El pH de la composición farmacéutica antes de la liofilización y después de la reconstitución en agua para inyección es preferentemente aproximadamente 6,5-7,5, más preferentemente aproximadamente 7,0. La composición farmacéutica sólida que contiene OBI-1 puede diluirse con agua estéril que contiene opcionalmente cloruro sódico antes de administrarla a un paciente en necesidad de fVIII. La administración de tal composición se lleva a cabo normalmente intravenosamente. La dosis óptima de composición que va a administrarse se determinará por el médico práctico basándose en la gravedad de la enfermedad para cada paciente. El documento WO 03/080108 desvela la descripción detallada de un procedimiento de preparación de las composiciones farmacéuticas sólidas que comprenden OBI-1 descritas en el presente documento.

El término "aproximadamente" se refiere a un intervalo alrededor del valor considerado. Como se usa en la presente solicitud, "aproximadamente X" significa un intervalo de X menos el 10 % de X a X más el 10 % de X, y preferentemente un intervalo de X menos el 5 % de X a X más el 5 % de X.

El término "reducir el tiempo de coagulación de la sangre" como se usa en el presente documento se refiere a la longitud reducida de tiempo para que la coagulación de la sangre se produzca en un paciente dado que tiene deficiencia de fVIII cuando OBI-1 se administra en comparación con cuando HYATE:C se administra, es decir, la diferencia en la longitud de tiempo para que la coagulación de la sangre se produzca en pacientes tratados con OBI-1 y aquellos tratados con administración de HYATE:C.

El término "nivel terapéuticamente eficaz o concentración de factor VIII" como se usa en el presente documento significa el nivel de fVIII en el plasma de un paciente que tiene deficiencia de fVIII, que ha recibido una composición farmacéutica de OBI-1, que es suficiente para presentar una mejora medible o efecto protector en el paciente (por ejemplo, para detener la hemorragia). Los pacientes que tienen deficiencia de fVIII son normalmente pacientes con hemofilia A, pero también incluyen aquellos sujetos diagnosticados con "hemofilia adquirida", una afección en la que aquellos que no son hemofílicos congénitos desarrollan espontáneamente anticuerpos inhibidores para su fVIII, creando una grave deficiencia de fVIII. En general, el nivel terapéuticamente eficaz se estima que es aproximadamente el 1 %, preferentemente aproximadamente el 10 %, lo más preferentemente aproximadamente el 25-35 % y por encima del nivel de fVIII en un sujeto sin hemofilia A normal. El intervalo de concentración de fVIII en seres humanos sin hemofilia A normales se define como del 50 % al 200 % de la actividad de fVIII encontrada en un conjunto de plasma de muestra derivado de al menos 20 donantes normales. El nivel de fVIII en seres humanos normales fluctúa a través de este intervalo normal en respuesta a diversos estímulos fisiológicos y no fisiológicos (véase Bithell, TC, "The Diagnostic Approach to the Bleeding Disorders", página 1302, Capítulo 48 en Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW y Lukens JN (eds), Wintrobe's Clinical Hematology, novena edición, 1993, Lea & Febiger, Malvern, PA).

El término "dosis neutralizante de anticuerpo de OBI-1" se usa para indicar la cantidad de OBI-1 que se necesita administrar para neutralizar los anticuerpos preexistentes del paciente dirigidos contra OBI-1. El nivel de anticuerpo de un paciente con hemofilia A para fVIII porcino es diferente para cada individuo. La cantidad de anticuerpo anti-OBI-1 presente puede calcularse fácilmente midiendo el título de anticuerpos, usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica, y a partir de este valor, puede estimarse la cantidad de OBI-1 requerida para neutralizar el anticuerpo. Debido a la unión individualmente diferente y las características inactivantes de cada anticuerpo inhibidor de un paciente, la cantidad precisa de OBI-1 requerida solo puede estimarse, y la cantidad exacta a administrarse debe determinarse empíricamente (o "valorarse").

La deficiencia de fVIII humano puede estudiarse en mamíferos deficientes en fVIII debido a que las etapas de formación de coágulos de sangre están compartidas entre todos los vertebrados, y las proteínas fVIII de varias especies son conocidas por tener un alto grado de homología de secuencias. La biodisponibilidad también puede evaluarse en monos no hemofílicos. Después de tener en cuenta variaciones de especies en el volumen de sangre, niveles de fVIII basales y similares, los resultados de los estudios en animales son generalmente predictivos de resultados en seres humanos. La presente invención se desarrolló a partir de los resultados de experimentos, descritos en detalle más adelante. Se realizaron estudios de cuatro tipos: estudios de biodisponibilidad en monos y perros hemofílicos, estudios de eficacia en perros hemofílicos y ratones hemofílicos, un estudio de recuperación de actividad *in vitro* en plasma humano y un estudio de biodisponibilidad *in vivo* en seis sujetos humanos.

La biodisponibilidad se evaluó midiendo la recuperación de actividad en un momento especificado después de administrar una dosis dada. La eficacia se evaluó midiendo el efecto de una dosis dada sobre el tiempo de sangrado de la cutícula (TSC) en perros hemofílicos y por mortalidad en un modelo de sangrado por corte transversal de la

cola de ratones hemofílicos. Las recuperaciones de OBI-1 y HYATE:C también se midieron *in vitro* añadiendo cada sustancia a muestras de plasma de hemofílicos humanos y muestras de plasma de inhibidores de hemofílicos humanos. La biodisponibilidad se evaluó adicionalmente en seis sujetos humanos midiendo la recuperación de actividad en un momento especificado después de administrar una dosis convencional de 100 U/kg.

En estudios iniciales de recuperación de actividad (biodisponibilidad), a monos no hemofílicos se administraron OBI-1 o HYATE:C intravenosamente para elevar los niveles de fVIII en su sangre. Se tomaron muestras de sangre periódicamente para determinar la actividad de fVIII y la persistencia del producto en la circulación sanguínea del animal con el tiempo. Se encontró que la biodisponibilidad de OBI-1 era varias veces superior a HYATE:C (véanse las Tablas 1 y 2, y la Fig. 1). Se observaron diferencias similares entre HYATE:C y OBI-1 en estudios de biodisponibilidad en perros hemofílicos como se muestra en las Tablas 3 y 4.

En un estudio de eficacia, perros hemofílicos se probaron para tiempos de sangrado después de un corte en la cutícula de la uña de la pata usando un intervalo de dosis de OBI-1 o HYATE:C. Los tiempos de sangrado de la cutícula (TSC) se midieron para evaluar la eficacia de los productos de fVIII. Tanto OBI-1 como HYATE:C redujeron el TSC hacia el intervalo normal observado en perros no hemofílicos, aunque los resultados fueron variables. De acuerdo con los estudios en ratón como se describen más adelante, OBI-1, en una base unitaria comparable, pareció ser más eficaz en reducir el TSC que HYATE:C.

Los estudios de eficacia se llevaron a cabo adicionalmente con una cepa de ratones "silenciados" en fVIII: ratones en los que el gen que codifica fVIII se inactivó. Tales ratones son altamente susceptibles a hemorragia tras lesión insignificativa uniforme. El corte transversal de 2 cm distales de la cola conducirá a hemorragia letal en el plazo de 24 h para la mayoría de los ratones hemofílicos. Administrando un intervalo de dosis de OBI-1 o HYATE:C a los ratones hemofílicos 15 minutos antes del corte transversal de la cola fue posible estimar una dosis que protege el 50 % de los ratones de la mortalidad (DE₅₀). En estos estudios en los que OBI-1 y HYATE:C se probaron por separado, la DE₅₀ (unidades kg) de OBI-1 pareció ser aproximadamente un cuarto de la de HYATE:C como puede apreciarse en las Tablas 6 y 7.

En experimentos usando ratones y perros hemofílicos, dosis comparables de OBI-1 y HYATE:C produjeron mayor recuperación de OBI-1 que HYATE:C basándose en un ensayo de coagulación de fVIII convencional.

Los resultados acumulados indican que OBI-1 puede administrarse a una dosis eficaz significativamente menor que HYATE:C, en la que el nivel de actividad de cada una se ha medido por un ensayo de fVIII convencional. Se entenderá por aquellos expertos en la materia que la dosis eficaz puede calibrarse según requisitos individuales del paciente, que incluyen niveles residuales de fVIII existentes en el plasma del paciente y el nivel de anticuerpos inhibidores en el plasma del paciente que deben neutralizarse.

Las recuperaciones de OBI-1 e HYATE:C también se midieron *in vitro* después de añadir cada una a una concentración nominal de 1 U/ml a muestras de plasma humano de pacientes con hemofilia con inhibidores. Las recuperaciones de tanto OBI-1 como HYATE:C fueron inferiores a la concentración nominal, que fue debida en parte a anticuerpos inhibidores reactivos de forma cruzada. Sin embargo, en 25 de las 35 muestras, la actividad de OBI-1 recuperada fue superior a la actividad de HYATE:C recuperada, y en 18 de las 35 muestras la actividad de OBI-1 recuperada fue más de 2 veces superior a la actividad de HYATE:C recuperada.

Se llevaron a cabo adicionalmente estudios de biodisponibilidad en seis sujetos humanos, con anticuerpos inhibidores ausentes o mínimos para OBI-1, en un modo aleatorizado, de doble ciego, con doble simulación, de grupos paralelos cegado como se describe en el Ejemplo 6. Como se muestra en la Tabla 8 y las Fig. 3 y 4, la biodisponibilidad de OBI-1 fue mucho mayor que en HYATE:C cuando ambos se administraron a 100 U/kg.

La recuperación y biodisponibilidad de OBI-1 sustancialmente mayor en comparación con HYATE:C es sorprendente y no puede ni predecirse ni explicarse por el hecho de que OBI-1 sea un producto recombinante y HYATE:C sea un producto derivado de plasma. En realidad, con factor IX humano (usado en el tratamiento de hemofilia B), el producto derivado de plasma mostró en realidad recuperaciones aproximadamente dos veces superiores al producto derivado recombinante (1,71 +/- 0,73 UI por dl por UI por kg en comparación con 0,86 +/- 0,313 UI por dl por UI por kg [véase Ewenstein BM y col. Transfusion (2002), 42:190]. Igualmente importante, cuando la biodisponibilidad de un producto de fVIII humano recombinante delecionado en el dominio B se comparó con la de un producto de fVIII humano derivado de plasma, se encontró que los dos productos eran bioequivalentes [véase Kessler, CM y col. Hemophilia (2005), 11:84.]

Los resultados clínicos para OBI-1 y HYATE:C están de acuerdo con los datos farmacocinéticos obtenidos usando monos, perros hemofílicos y ratones hemofílicos. Estos resultados indican adicionalmente que OBI-1 puede administrarse a una menor dosis o igualmente importante puede administrarse a una frecuencia de administración enormemente reducida en comparación con HYATE:C, dando efectos terapéuticos equivalentes en pacientes que tienen deficiencia de fVIII. Los datos también muestran que OBI-1 alcanza niveles pico y terapéuticos mucho más rápidamente que dosis equivalentes de HYATE:C, permitiendo un control más rápido del sangrado.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

5 **Estudio de biodisponibilidad en monos**

Se usaron monos cinomolgos no hemofílicos para comparar la biodisponibilidad de OBI-1 y HYATE:C. A grupos de 4 monos se administró una dosis de tanto HYATE:C 100 U/kg como OBI-1 a dosis de tanto 49 como 77 U/kg. Después se extrajeron muestras de sangre en momentos de tiempo especificados, y los niveles de fVIII obtenidos se usaron para calcular parámetros farmacocinéticos, que incluyen los niveles de actividad integrados con el tiempo. El valor integrado se denomina el área bajo la curva durante el periodo de tiempo especificado ($ABC_{0 \rightarrow t}$).

Los análisis farmacocinéticos se calcularon usando procedimientos no compartimentales, corregidos para el nivel inicial (nivel de fVIII endógeno en el animal de prueba). La concentración máxima en plasma, $C_{m\acute{a}x}$, y el tiempo hasta la máxima concentración en plasma, $T_{m\acute{a}x}$, se tomaron directamente de los datos. El área bajo la curva desde el tiempo cero hasta la muestra final ($ABC_{0 \rightarrow t}$) se calculó usando el procedimiento trapezoidal lineal. Los resultados se muestran en la Fig. 1.

Hubo un aumento de dosis proporcional en $C_{m\acute{a}x}$ y $ABC_{0 \rightarrow t}$ entre las dos dosis de OBI-1. Los niveles de fVIII en plasma medios para monos que recibieron HYATE:C 100 U/kg fueron inferiores a los niveles de fVIII de monos que recibieron OBI-1, a tanto 49,5 como 77 U/kg, en cada momento de tiempo excepto uno. La disponibilidad biológica (ABC) de HYATE:C 100 U/kg (299 ± 191 h·U/dl) fue solo aproximadamente 1/3 de la de OBI-1 administrado a una dosis de 49,5 U/kg (900 ± 311 h·U/dl) y un cuarto de la de OBI-1 administrado a una dosis de 77 U/kg (1178 ± 669 h·U/dl). En un punto de tiempo, 0,66 horas, los niveles de fVIII medidos fueron falsos para varios animales, probablemente debido a la manipulación errónea de los especímenes de plasma. El cálculo de los valores farmacocinéticos excluyendo los valores de fVIII a 0,66 horas para el análisis produjo solo cambios muy menores al $ABC_{0 \rightarrow 24}$.

La Tabla 1 expone parámetros farmacocinéticos para niveles de fVIII corregidos al nivel inicial después de la administración iv de HYATE:C y OBI-1 en monos.

TABLA 1

Parámetro ¹	OBI-1 49.5 U/kg	OBI-1 77 U/kg	HYATE:C 100 U/kg
C_{max} (U/dL)	107 ± 22.6	169 ± 32.2	78.7 ± 20.4
T_{mas} (h)	2.00	1.98	2.22
AUC_{0-24} (h·U/dL)	900 ± 311	1,178 ± 669	299 ± 191
¹ Media aritmética ± desviación estándar, excepto para $T_{m\acute{a}x}$ para el que se informa la mediana.			

En conclusión, OBI-1 administrado a monos cinomolgos en una dosis de 49,5 U/kg o 77 U/kg produjo un área mucho mayor bajo la curva de tiempo-concentración que una dosis de HYATE:C a 100 U/kg. Este fortuito hallazgo revela una diferencia impredecible entre OBI-1 y HYATE:C, específicamente que OBI-1 muestra una actividad *in vivo* potenciada cuando se administra a monos, en comparación con HYATE:C. Cuando los datos de la Tabla 1 se comparan en una base de U/kg equivalente puede observarse que una dosis de 49,5 U/kg de OBI-1 proporcionó aproximadamente 6 veces mayor $ABC_{0 \rightarrow 24}$ que una dosis de 100 U/kg de HYATE:C. Una dosis de 77 U/kg de OBI-1 proporcionó aproximadamente 5 veces mayor $ABC_{0 \rightarrow 24}$ que 100 U/kg de HYATE:C. Se obtuvieron resultados similares en un estudio separado usando cinco monos que recibieron 40 U/kg de OBI-1, 5 monos que recibieron 100 U/kg de OBI-1 y 6 monos que recibieron 100 U/kg de HYATE:C (Tabla 2).

TABLA 2

Parámetros farmacocinéticos para factor VIII corregidos al nivel inicial después de la administración i.v. de OBI-1 y HYATE:C en monos			
Parámetro ¹	OBI-1 40 U/kg	OBI-1 100 U/kg	HYATE:C 100 U/kg
Dia 1			
C_{max} (U/dL)	73.4 ± 9.24	230 ± 66.5	101 ± 28.0
T_{mas} (h)	0.50	0.50	0.50
AUC_{0-24} (h·U/dL)	323 ± 120	1,604 ± 857	607 ± 304

Parámetro ¹	OBI-1 40 U/kg	OBI-1 100 U/kg	HYATE:C 100 U/kg
Día 4			
C _{max} (U/dL)	71.2 ± 62.3	153 ± 20.1	89.3 ± 24.7
T _{mas} (h)	0.50	0.53	0.50
AUC ₀₋₂₄ (h•U/dL)	323 ± 538	542 ± 256	193 ± 185

¹ Media aritmética ± desviación estándar, excepto para T_{máx} para el que se informa la mediana.

EJEMPLO 2

Biodisponibilidad en perros hemofílicos

Descubierto originalmente como una mutación espontánea, los perros con hemofilia A se han mantenido en una colonia protegida durante más de veinte años. La colonia alojada en la Universidad de Queens en Kingston, Ontario, está en su décima generación. No tienen actividad de fVIII circulante o proteína y su cuadro fenotípico es análogo a hemofilia A grave en seres humanos, con hemorragia de tejido blando y articulaciones espontáneo grave recurrente y deformaciones de las articulaciones crónicas. Requieren frecuentes inyecciones de plasma derivado de canino o crioprecipitado para controlar su hemorragia.

A ocho perros sanos de 6 meses o mayores, que pesaban al menos 6 kg y que carecía del anticuerpo anti-fVIII porcino, se administró a cada uno una dosis única de tanto HYATE:C como OBI-1. Dos animales recibieron cada uno 3 U/kg, 25 U/kg o 100 U/kg de cada producto. Se tomaron muestras de sangre en el nivel inicial y en los momentos de tiempos posteriores después de la inyección de los productos: 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas. Los niveles de fVIII se determinaron por tanto procedimientos de ensayo de coagulación en una etapa como de ensayo cromogénico.

Los niveles de fVIII se determinaron contra un patrón de fVIII porcino designado HY98P. Aunque estos perros hemofílicos no tienen actividad de fVIII canino medible, y no tienen antígeno de fVIII presente en su sangre, se encontró que tenían actividad de fVIII medible en el nivel de referencia (0,1 a 0,3 U/ml) cuando se probaron contra un patrón de fVIII porcino. Este patrón porcino se hizo añadiendo cantidades variables del producto de prueba actual HYATE:C o OBI-1 (en 1 % de albúmina de suero bovino/tampón imidazol) a plasma de hemofílicos humanos deficientes en factor VIII. Por tanto, para los fines de determinar los parámetros farmacocinéticos, la actividad del nivel inicial medida se restó de la actividad medida en cada momento de tiempo y la diferencia en actividad de fVIII se entró para todos los cálculos. Para ambos productos probados hubo variabilidad sustancial en los valores farmacocinéticos obtenidos de los perros probados a cada nivel de dosis.

Los valores medios para parámetros farmacocinéticos seleccionados se muestran en la Tabla 3 (ensayo cromogénico) y la Tabla 4 (ensayo de coagulación en una etapa).

TABLA 3

Biodisponibilidad en perros hemofílicos: Ensayo cromogénico									
DOSIS (U/kg)			Recuperación	AUC	C _{max}		Recuperación	AUC	C _{max}
100 U/kg		OBI-1				HYATE:C			
		Media	4.73	22.21	4.73		1.80	9.31	1.80
		Desv. Std.	0.68	8.20	0.68		0.32	1.94	0.32
25 U/kg									
		Media	4.97	35.15	1.24		1.46	2.63	0.37
		Desv. Std.	0.88	39.26	0.23		0.28	1.24	0.06
3 U/kg									
		Media	6.65	1.14	0.20		2.38	0.35	0.08
		Desv. Std.	0.40	0.01	0.01		0.21	0.34	0.01

TABLA 4

Biodisponibilidad en perros hemofílicos: ensayo de coagulación en una etapa									
DOSIS (U/kg)			Recuperación	AUC	C _{max}		Recuperación	AUC	C _{max}
100 U/kg		OBI-1				HYATE:C			
		Media	4.24	30.89	4.41		1.95	14.11	1.95
		Desv. Std.	1.45	15.00	1.41		0.28	5.81	0.29
25 U/kg									
		Media	3.21	11.92	0.86		1.72	4.75	0.43
		Desv. Std.	0.79	2.40	0.22		0.68	2.08	0.17
3 U/kg									
		Media	3.74	1.80	0.12		3.00	2.27	0.09
		Desv. Std.	1.41	1.03	0.05		1.67	1.52	0.05

Los resultados del ensayo de coagulación y del ensayo cromogénico fueron similares. La concentración máxima (C_{máx}) en sangre para OBI-1 fue superior a para HYATE:C a todas las dosis. El tiempo medio hasta la concentración máxima (T_{máx}) fue más corto para OBI-1 que para HYATE:C a dosis de 3 y 25 U/kg, pero lo opuesto se observó a una dosis de 100 U/kg. El porcentaje de recuperación medio fue superior para OBI-1 que para HYATE:C a todas las dosis: a 25 y 100 U/kg, los valores de recuperación para OBI-1 fueron aproximadamente 2-5 veces los de HYATE:C. Para el área bajo la curva, independientemente del grupo de tratamiento, la media geométrica del ABC aumentó a medida que aumentó la dosis. En general, los valores farmacocinéticos como se miden por los dos procedimientos de ensayo, los ensayos de coagulación en una etapa y cromogénico, siguieron las mismas tendencias a través de la mayoría de los parámetros.

EJEMPLO 3

Eficacia en perros hemofílicos

El TSC, el tiempo que tarda en detenerse la hemorragia después de que se corte cutícula de la uña de la pata del perro, es una medida útil de la eficacia en perros con hemofilia. En el perro sin tratar con hemofilia, la cutícula normalmente deja de sangrar en aproximadamente 2 minutos, no sangra durante un breve tiempo y luego vuelve a sangrar continuamente durante al menos 12 minutos o hasta que la lesión se cauteriza. El TSC normal se define como 5 minutos o menos de sangrado y no necesita cauterización. El TSC en perros con hemofilia congénita se ha usado ampliamente como una medida de la eficacia de productos de fVIII en investigación.

El diseño experimental fue el descrito en el Ejemplo 2.

La Tabla 5 demuestra los cambios individuales en los resultados de TSC para cada perro para cada inyección.

Tabla 5

Efecto de productos de fVIII porcino sobre los tiempos de sangrado de la cutícula de perros							
Perro	Dosis U/kg	CBT después OBI-1 minutos			CBT después HYATE:C minutos		
		Pre inyección	Post inyección	Reducción	Pre inyección	Post inyección	Reducción
Becky	3	8.5	12	-3.5			
Hamish	3	11	4	7	8	10	-2
Zoey A	3	12	12	0	12	12	0
Mindy	25	9	3	6	8	6	2
Java	25	13	6	7	2	4	-2
Wendel	100	12	9.5	2.5	12	12	0
Arsenio A	100	12	2	10	4	5	-1
Arsenio B	100	11	1	10	6	2	4
Zoey B	100	12	8*	4	12	3	9
Reducción media, minutos				4.78	1.25		
S.D.				4.51	3.73		
* En Zoey-2 (segundo estudio) el sangrado de cutícula fue extremadamente lento después del punto de 2 min con solo 1-2 gotas/min hasta 8 min cuando el sangrado se detuvo completamente.							

Aunque hubo variación sustancial entre perros individuales, los datos sugieren mayor eficacia *in vivo* en perros administrados con OBI-1. La reducción media en el TSC durante todas las dosis en perros con OBI-1 en HYATE:C fue 4,78 min y 1,25 min, respectivamente. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa, pero hubo una tendencia hacia la significancia ($p=0,10$, prueba de la t). La diferencia entre la eficacia de OBI-1 y HYATE:C fue más pronunciada a las menores dosis de 3 U/kg y 25 U/kg, a las que OBI-1 redujo el TSC en algunos perros, pero no HYATE:C.

EJEMPLO 4

Estudio de eficacia en ratones

Se han creado ratones con hemofilia A por alteración dirigida del exón 16 del gen fVIII. Los ratones E16 tienen actividad de fVIII indetectable, sangrado espontáneo ocasional y sangrado prolongado y elevada mortalidad después del corte transversal de la cola o laceración de la vena de la cola. Se ha desarrollado un modelo de eficacia en el que se evalúa la capacidad de fVIII para reducir la mortalidad en ratones E16 tras el corte transversal de 2 cm distales de la cola.

Se preparó OBI-1 de calidad investigación para expresar el ADNc de OBI-1 en una línea celular de riñón de hámster bebé y purificación de medio de expresión sin suero usando un procedimiento de cromatografía de dos etapas como se describe en Doering y col. (2002) J. Biol. Chem. 277:38345-9. El siguiente experimento se diseñó para probar la eficacia de OBI-1 en el modelo de corte transversal de la cola.

Ratones con hemofilia A macho o hembra, de 9 a 10 semanas de edad, se inyectaron por la vena de la cola con diversas concentraciones de OBI-1 o tampón de control. Los ratones se anestesiaron y, 15 min después de la inyección, los 2 cm distales de la cola se cortaron transversalmente y se dejaron sangrar libremente. Esta lesión es supuestamente mortal en el plazo de 24 h en la mayoría de los ratones con hemofilia A E16.

La supervivencia a las 24 h se determinó con los siguientes resultados:

TABLA 6

Eficacia de OBI-1 en ratones con hemofilia A: Modelo transección de cola		
Supervivencia		
Dosis (U/Kg)	(Vivos/Total)	Supervivencia (%)
0.0	6/38	16
0.015	2/8	25
0.044	5/7	71
0.130	4/7	57
0.400	7/7	100
1.200	7/7	100
>1.200	14/14	100

Los datos están de acuerdo con la declaración de que una dosis de fVIII de 1,2 unidades/kg es eficaz en prevenir la muerte en este modelo. Combinando los datos a 0,4 y 1,2 unidades/kg hay 14/14 supervivientes en comparación con 6/38 supervivientes en el grupo de control (sin tratar). Una dosis estimada que confiere el 50 % de supervivencia (DE_{50}) fue 0,044 U/kg. Además, sobrevivió cada ratón que recibió al menos 0,4 U/kg.

Eficacia de HYATE:C en ratones con hemofilia

Antes de las inyecciones en la vena de la cola de HYATE:C (0 a 100 unidades de fVIII/kg), o placebo (solución salina), los ratones se calentaron bajo una lámpara de 60 vatios durante 2 minutos para dilatar las venas de la cola. Quince minutos después de la inyección, los ratones se anestesiaron con Metofane y se amputaron los 2 cm distales de la cola. Los ratones se colocaron en jaulas limpias con toallas de papel en lugar de arena y se observaron durante 24 horas para determinar la supervivencia. Se colocó comida bien humedecida dentro de cada jaula, además de la botella de agua usual y pellas secas. Los sobrevivientes se terminaron después de 24 horas usando Metofane seguido de dislocación cervical.

Hubo un aumento dependiente de la dosis en la supervivencia en ambos grupos tratados tras la inyección de producto (Tabla 7).

TABLA 7

Eficacia de HYATE:C en ratones con hemofilia A		
Supervivencia		
Dosis (U/Kg)	(Vivos/Total)	Supervivencia (%)
0.0	2/17	11
0.3	4/8	50
0.1	5/17	30
0.2	5/10	50
0.5	16/20	80
1.0	7/10	70
2.0	14/18	78
5.0	9/10	90
8.0	8/8	100
10.0	10/10	100
25.0	2/2	100
50.0	2/2	100
75.0	1/1	100
100.0	2/2	100

La CE_{50} estimada para HYATE:C fue 0,2 U/kg, 4-5 veces superior a la estimada para OBI-1, prediciendo mayor

eficacia de OBI-1. En general, la eficacia comparativa de HYATE:C y OBI-1 no se ha estudiado rigurosamente en ratones con hemofilia A.

EJEMPLO 5

5

Recuperación de plasma humano

Materiales

10 Se compraron plasma humano normal reunido citrado (FACT, producto nº 0020-0) y plasma deficiente en fVIII (plasma de hemofilia A humano, producto nº 0800) de George King Bio-medical, Inc. Se almacenaron a -70 °C. El reactivo tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) (producto nº 35513) se compró de Organon Teknika Corp. Se almacenó en un estado liofilizado a 4 °C. Vehículo de OBI-1, lote nº 214-02-001, se reconstituyó con 1 ml de agua para inyección por vial (60 viales totales). Cuatro viales de OBI-1, lote nº 214-01-001, se reconstituyeron cada uno con 1 ml de agua para inyección, dando una concentración esperada de 550 U/ml según la etiqueta del fabricante. OBI-1 se diluyó 15,9 veces adicionalmente mediante la adición de 59,6 ml de vehículo de OBI-1 reconstituido, dando una concentración predicha de 34,6 U/ml. Tres viales de HYATE:C, lote nº 656, se reconstituyeron con 20 ml de agua para inyección, dando una concentración esperada de 34,6 U/ml, según la etiqueta del fabricante. HYATE:C se sub-dividió en 120 alícuotas de 0,5 ml cada una y se congeló a -70 °C. OBI-1 se sub-dividió en 127 alícuotas de 0,5 ml cada una y se congeló a -70 °C.

Los plasmas citrados de pacientes con anticuerpos inhibidores para fVIII se transportaron sobre nieve carbónica a la Universidad de Emory de varios centros de tratamiento de hemofilia. Las muestras se congelaron a -70 °C hasta que se usaron. De 58 plasmas que se obtuvieron, 25 se seleccionaron aleatoriamente para el estudio.

25

Ensayos de fVIII

Se realizaron ensayos de coagulación en una etapa de fVIII usando un instrumento de coagulación Diagnostica Stago, ST art 4. El reactivo aPTT liofilizado se solubilizó en 3 ml de H₂O según las instrucciones del fabricante y se mantuvo a temperatura ambiente hasta que se usó. FACT y plasma deficiente en fVIII se almacenaron sobre hielo después de la rápida descongelación en un baño de agua de 37 °C. Se añadió plasma deficiente en fVIII (50 µl) a cubetas de muestra y se dejó calentar durante 30-45 segundos antes de la adición de los restantes reactivos. Se añadieron diluciones del patrón de fVIII o muestra (5 µl), seguido de la adición de 50 µl de reactivo aPTT y la incubación durante 250 segundos. La coagulación se inició mediante la adición de 50 µl de disolución de CaCl₂ precalentada usando una pipeta cableada. La adición activa un cronómetro interno y graba el tiempo de coagulación en segundos. Se preparó una curva patrón usando cuatro diluciones de FACT en solución salina tamponada de Hank: sin diluir, 1/3, 1/11 y 1/21. La concentración de fVIII de FACT sin diluir es aproximadamente 1 U/ml y osciló de 1,04 a 1,09 U/ml según el fabricante. El tiempo de coagulación se representó frente al logaritmo de la concentración de fVIII y la curva patrón se calculó por regresión lineal. La concentración de fVIII de muestras se midió por interpolación sobre la curva patrón, excepto en el caso del análisis de disoluciones madres de OBI-1 y HYATE:C, para el que se hacen mediciones más amplias, como se describe en Resultados.

La reconstitución de actividad de fVIII a partir de plasmas enriquecidos con OBI-1 o HYATE:C se midió en 33 de las muestras de plasma inhibitoras disponibles (Fig. 2). En todos los casos, los plasmas se enriquecieron a una actividad de fVIII predicha de 0,9 U/ml. Adicionalmente se incluyeron dos plasmas con hemofilia A obtenidos de George King, y se muestran en el extremo derecho en la figura. Plasma "bueno" se corresponde con plasma de reactivo comercialmente disponible en el que la recuperación de fVIII en HYATE:C y OBI-1 se había encontrado previamente que estaba en el intervalo esperado. Plasma "malo" se corresponde con plasma en el que la recuperación de fVIII en HYATE:C se había encontrado previamente que era inferior al 10 % del esperado en Ipsen. Los resultados confirman que la recuperación esperada de OBI-1 se obtiene en el plasma "bueno" y que la recuperación de HYATE:C está próxima al intervalo esperado. Sin embargo, se observó de nuevo que la recuperación de actividad del plasma "malo" enriquecido con HYATE:C era bastante pobre. La recuperación de OBI-1 de este plasma fue considerablemente mayor, pero menor de la esperada.

La recuperación de actividad de fVIII en los plasmas de pacientes inhibidores fue muy baja, inferior a 0,1 U/ml en casi cada plasma enriquecido con HYATE:C individual. La recuperación fue significativamente mayor cuando estos mismos plasmas se enriquecieron con OBI-1, pero fue menor de la esperada (debido a la presencia de anticuerpos inhibidores). Se ensayaron varios de los plasmas que se habían ensayado previamente como negativos para anticuerpos inhibidores para HYATE:C y se muestran en la Figura 2. La recuperación de HYATE:C fue mala en la mayoría de estas muestras. Esto elevó la posibilidad de que un mayor tiempo de incubación de HYATE:C con plasma de hemofilia A, tal como se produce durante la incubación de 2 horas en el ensayo de Bethesda, pudiera conducir a aumentar la recuperación de actividad de HYATE:C. Sin embargo, cuando HYATE:C se añadió a una de las muestras de paciente negativas inhibitoras de HYATE:C no hubo aumento de actividad durante 2 horas.

65 En conclusión, cuando OBI-1 se introduce en plasma humano, tanto si contiene como si no un anticuerpo inhibidor para fVIII humano, la recuperación *in vitro* es mayor que la de HYATE:C La implicación de este hallazgo es que

puede conseguirse el mismo nivel circulante de fVIII en un paciente administrando una dosis mucho menor de OBI-1 que de HYATE:C.

EJEMPLO 6

5

Farmacocinética de OBI-1 frente a HYATE:C en sujetos humanos

10

15

20

25

Para evaluar diversos parámetros farmacocinéticos de OBI-1 frente a HYATE:C en sujetos humanos se llevó a cabo el siguiente estudio de comparación cegado de grupos paralelos aleatorizado con nueve pacientes humanos. De estos 9 pacientes, cinco no tuvieron inhibidor anti-porcino detectable en el nivel inicial (es decir, menos de 0,8 unidades de Bethesda) y uno (asignado al grupo de OBI-1) tuvo un inhibidor muy bajo de 1,0 unidad de Bethesda. De los seis pacientes con tanto inhibidor no preexistente como inhibidor muy bajo para fVIII porcino, tres recibieron HYATE:C y tres recibieron OBI-1. Los tres pacientes con niveles significativamente mayores de inhibidores se excluyeron de la evaluación de biodisponibilidad, ya que la presencia de tales inhibidores disminuye la biodisponibilidad, confundiendo así el análisis. Todos los pacientes tuvieron más de 12 años de edad, fueron clínicamente diagnosticados con hemofilia A y estaban actualmente en el estado no hemorrágico. OBI-1 se proporcionó en viales estériles que contenían 535 unidades de actividad de fVIII por vial. Cada vial se reconstituyó con 1,0 ml de agua estéril para inyección USP a una concentración final de 535 U/ml. HYATE:C se proporcionó en viales estériles que contenían 541 UI de fVIII por vial. Cada vial se reconstituyó con 20 ml de agua estéril para inyección USP a una concentración final de 27 IU/ml. La dosis de cada producto administrada fue 100 UI/kg independientemente del título de anticuerpos del sujeto. Los investigadores, pacientes y patrocinador se cegaron a qué paciente recibió qué producto activo, en un diseño con doble simulación de doble ciego. Los pacientes recibieron tanto 100 UI/kg de HYATE:C activo seguido de un placebo (tres pacientes) como un placebo seguido de 100 UI/kg de OBI-1 activo (tres pacientes), mientras que estaban en un estado no hemorrágico estable. Cada paciente recibió una infusión durante aproximadamente una hora del primer producto (HYATE:C o placebo del mismo volumen), seguido de una lenta infusión de empuje de una cubierta de jeringuilla durante 10 minutos del segundo producto (OBI-1 o placebo del mismo volumen).

30

35

Se tomaron muestras de sangre en los tiempos 0 (antes de la inyección), 20, 40, 60, 65, 75, 85, 105 y 125 minutos, y 3, 6, 9, 24, 27, 30 y 48 horas después de la primera infusión para la determinación de la actividad en plasma de los niveles de fVIII tanto por procedimientos de ensayo de coagulación en una etapa como cromogénico usando plasma reunido humano como patrón de fVIII. A partir de estos niveles se realizaron análisis farmacocinéticos convencionales y los resultados se muestran en la Tabla 8 y las Fig. 3 y 4. Los parámetros farmacocinéticos medidos en este estudio incluyen eliminación (CL, ml/h/kg), área bajo la curva (ABC, U/dl), concentración máxima (C_{máx}, U/ml), volumen de distribución (V_z), tiempo medio hasta la concentración máxima (T_{máx}, h) y semivida (T_{1/2}, h).

TABLA 8

40

Resumen de los parámetros farmacocinéticos para fVIII después de la administración intravenosa de OBI-1 o HYATE:C a pacientes humanos				
Parámetros ^{1,2}	Ensayo de actividad		Ensayo cromogénico	
	OBI-1	HYATE:C	OBI-1	HYATE:C
C _{mad} (U/dL)	176 ± 88.0	82.3 ± 19.2	151 ± 31.5	52.7 ± 13.8
T _{max} (h)	0.63	1.93	0.62	1.50
AUC(0→t) (h•U/dL)	2,083 ± 1,323	1,178 ± 469	1,817 ± 625	708 ± 420
AUC(inf) (h•U/dL)	2,189 ± 1,396	967 ± 355	1,897 ± 605	771 ± 480
T ^{1/2} (h)	10.3 ± 1.85	6.80 ± 2.19	10.5 ± 3.38	9.45 ± 5.14
CL	(mL/min)	9.11 ± 6.31	11.8 ± 1.44	8.00 ± 2.61
	(mL/min/kg)	0.12 ± 0.11	0.18 ± 0.07	0.10 ± 0.04
V _z	(L)	7.55 ± 4.04	6.83 ± 1.40	7.51 ± 3.95
	(Ukg)	0.10 ± 0.07	0.10 ± 0.00	0.09 ± 0.07

1 Media aritmética = desviación estándar, excepto para T_{máx} para el que se informa la mediana.
2 N = 3 para ambos productos.

65

Como puede apreciarse en la Tabla 8 y las Fig. 3 y 4, los valores del ABC para OBI-1 fueron aproximadamente 2-2,5 veces superiores a para HYATE:C. La diferencia en ABC entre OBI-1 y HYATE:C fue más pronunciada en el ensayo cromogénico que en el ensayo de actividad de una etapa. La concentración máxima (C_{máx}) en la sangre para OBI-1 fue aproximadamente 3 veces superior a para HYATE:C (151 frente a 53 por el ensayo cromogénico). El tiempo medio hasta la concentración máxima (T_{máx}) fue aproximadamente 2,5 a 3 veces más corto para OBI-1 que para HYATE:C. Estos resultados están de acuerdo con los datos farmacocinéticos previos obtenidos usando monos, perros hemofílicos y ratones hemofílicos, y adicionalmente demuestra que OBI-1 tiene mucha mayor biodisponibilidad en comparación con HYATE:C. Por tanto, OBI-1 puede administrarse a una menor dosis o administrarse a una frecuencia de administración reducida en comparación con HYATE:C, dando efectos terapéuticos equivalentes en pacientes deficientes en fVIII. Y OBI-1 a dosis equivalentes a HYATE:C puede controlar más rápido el sangrado.

EJEMPLO 7

Significancia clínica de las diferencias en valores de recuperación para OBI-1 y HYATE:C

Los estudios desvelados anteriormente demuestran que la recuperación de plasma humano, concentración máxima (C_{máx}) y el área bajo la curva (ABC) fueron mucho mayores para fVIII porcino recombinante de dominio B (OBI-1) que para fVIII porcino derivado de plasma (HYATE:C) después de la inyección de las mismas dosis.

La concentración de fVIII en sujetos sin hemofilia A normales es aproximadamente 100 unidades/dl. Es muy probable que se controle un episodio hemorrágico típico si el nivel de plasma de fVIII se alcanza en aproximadamente el 25 % y el 35 % del nivel normal y se mantiene durante varias horas (Roberts H y Hoffman M, "Hemophilia A and Hemophilia B," Capítulo 123 en Beutler E, Lichtman M, Coller B, Kipps T y Seligsohn U (Eds), Williams Hematology, 6ª edición (2001): páginas 1639-1657; McGraw-Hill, Nueva York). Usando los datos farmacocinéticos obtenidos de aquellos sujetos sin inhibidor o con bajo inhibidor para fVIII porcino (OBI-1, n=3; HYATE:C, n=3 como se describe en el Ejemplo 6), se realizaron cálculos adicionales para determinar los valores farmacocinéticos de la administración de OBI-1 y HYATE:C que se corresponden con los niveles terapéuticos de fVIII (es decir, 25-35 %). Los resultados se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9

Valores farmacocinéticos calculados correspondientes a niveles terapéuticos de fVIII con administración de OBI-1 y HYATE:C					
	>25%		>35%		
TRATAMIENTO	AUC	TIEMPO (hr)	AUC	TIEMPO (hr)	
OBI-1	1266.2 2219.3 210.4	25.6 27.2 7.5	709.2 1939.4 127.7	7.6 24.2 4.5	
media	1232.0	20.1	925.4	12.1	
Std. Desv.	1004.9	10.9	925.0	10.6	
HYATE:C	387.7 236.4 193.4	9 9 8.9	302.7 179.9 101.4	9 9 6	
media	272.5	9.0	194.7	8.0	
Std. Desv.	102.1	0.0	101.5	1.8	

como se muestra en las tablas anteriores: (1) el ABC por encima del 25 % y el 35 % es aproximadamente 5 veces mayor para OBI-1 que para HYATE:C (Tabla 9); (2) las concentraciones pico (C_{máx}) son 2-3 veces mayores para OBI-1 que para HYATE:C (Tabla 8); (3) OBI-1 alcanzará su concentración pico mucho más rápidamente que HYATE:C (véase T_{máx} en la Tabla 8, en la que la T_{máx} para OBI-1 fue aproximadamente 0,6 horas en comparación con 1,5-2,0 horas para HYATE:C); y (4) la duración de tiempo que fVIII estará en el intervalo terapéutico después de la administración de OBI-1 a 100 U/kg es mayor (1,5 a 2 veces) que para HYATE:C a 100 U/kg.

En resumen, los datos presentados en el presente documento indican que OBI-1, unidad por unidad, alcanzará un control mucho más rápido, eficaz y prolongado del sangrado que HYATE:C en pacientes que tienen deficiencia de

fVIII.

Resumen

5 Los datos combinados de los Ejemplos 1-6 demuestran el inesperado hallazgo de que OBI-1 se comporta de forma diferente de HYATE:C en plasma humano y animal. En particular, los estudios descritos en el Ejemplo 6 que emplean pacientes humanos establecen que fVIII porcino recombinante (OBI-1) tiene de hecho biodisponibilidad mucho mayor que fVIII porcino derivado de plasma (HYATE:C) en seres humanos. Este sorprendente resultado es precisamente el opuesto a lo que se observa con factor IX, en el que el concentrado derivado de plasma tenía recuperación y biodisponibilidad significativamente mayor que el producto de factor IX recombinante (Ewenstein y col., arriba). Además, la mayor biodisponibilidad de OBI-1 en comparación con HYATE:C también fue sorprendente, en vista del informe de Kessler y col. (Haemophilia (2005) 11:84-91), en el que se encontró que fVIII humano recombinante de dominio B delecionado (ReFacto[®]) era bioequivalente a fVIII humano derivado de plasma (Hemofil[®] M) en diversos parámetros farmacocinéticos medidos en un estudio cruzado de tres vías aleatorizado.

15 Los resultados de todos los estudios en animales y seres humanos tomados conjuntamente hacen posible idear nuevos protocolos para administración de OBI-1, que se diferencian sustancialmente de los procedimientos convencionales y la dosificación usada para HYATE:C. Un aspecto de la invención proporciona una nueva pauta de dosis para OBI-1, por lo que OBI-1 puede administrarse a un paciente a tan solo 1/6 de la dosis de actividad convencional en unidades/kg recomendadas para HYATE:C. La dosis recomendada para HYATE:C es 100 UI/kg de peso corporal superior a la dosis requerida para neutralizar cualquier anticuerpo de paciente para fVIII porcino. El nivel de anticuerpo para fVIII porcino de un paciente es diferente para cada individuo. La dosis de OBI-1 requerida para neutralizar los anticuerpos del paciente puede estimarse a partir de la medición del título de anticuerpos, usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Por consiguiente, para un paciente dado, puede administrarse OBI-1 en lugar de HYATE:C a una dosis de aproximadamente tan solo 10-20 U/kg de peso corporal superior a la dosis neutralizante. Si un paciente con hemofilia A tiene un anticuerpo inhibidor contra fVIII, requeriría más OBI para neutralizar los anticuerpos inhibidores. Una dosis eficaz de OBI-1 puede administrarse en una fracción del volumen de disolución requerida para administrar una dosis de HYATE:C, no solo debido a que OBI-1 puede prepararse en forma más concentrada, sino también debido a que una dosis más pequeña de OBI-1 puede dar una recuperación de actividad comparable a una dosis 2 a 6 veces mayor de HYATE:C. Alternativamente, si 100 U/kg de OBI-1 se emplean como una dosis, los pacientes pueden controlarse satisfactoriamente con muchas menos infusiones requeridas para detener una hemorragia o intervalos mucho mayores entre inyecciones de OBI-1. Por ejemplo, si HYATE:C requirió una mediana de ocho infusiones para detener un único episodio hemorrágico durante un periodo de dos días, OBI-1 puede requerir solo 1 de tales infusiones, un espectacular avance en el tratamiento de pacientes. Además, pueden tratarse episodios hemorrágicos agudos con menores dosis y más pequeñas de OBI-1, en comparación con 8 dosis durante 2 días, la mediana de dosificación de HYATE:C informada en su prospecto. La dosificación de OBI-1 pueden provocar un control más rápido de la hemorragia y, por tanto, es probable que sea tanto más eficaz como más seguro que HYATE:C. También es ventajoso para la comodidad del paciente y calidad de vida, además de proporcionar un riesgo reducido de infección y de efectos secundarios de contaminantes. Los niveles terapéuticos de fVIII pueden lograrse más rápidamente infundiendo el producto de OBI-1 concentrado. Otra pauta de dosificación descrita en el presente documento proporciona un protocolo terapéutico que incluye una etapa de medir la recuperación de OBI-1 como: parte del procedimiento para establecer una dosis óptima en un paciente individual. La recuperación de OBI-1 puede medirse esencialmente como se describe en el Ejemplo 5, añadiendo una cantidad medida de actividad de OBI-1 a una muestra de plasma de un paciente, luego midiendo la actividad recuperada de la muestra después de un corto intervalo de tiempo. Una serie de tales pruebas puede establecer una dosis de OBI-1 adecuada para cada paciente. Alternativamente, pueden medirse datos de recuperación individuales directamente en un paciente.

50 Siempre que se facilite un intervalo en la memoria descriptiva, por ejemplo, un intervalo de temperatura, un intervalo de tiempo o una composición o intervalo de concentración, en la divulgación pretenden incluirse todos los intervalos intermedios y sub-intervalos, además de todos los valores individuales incluidos en los intervalos facilitados.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de experiencia de aquellos expertos en la materia a la que se refiere la invención.

55 Como se usa en el presente documento, "que comprende" es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por" y es inclusivo o de extremos abiertos y no excluye elementos o etapas de procedimiento sin citar adicionales. Como se usa en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o componente no especificado en el elemento de reivindicación. Como se usa en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afecten materialmente las características básicas y novedosas de la reivindicación. En cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede sustituirse con cualquiera de los otros dos términos. La invención descrita ilustrativamente en el presente documento puede ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no sean específicamente desveladas en el presente documento.

65

Un experto habitual en la materia apreciará que los materiales de partida, reactivos, sustratos sólidos, procedimientos sintéticos, procedimientos de purificación y procedimientos analíticos distintos de aquellos específicamente ejemplificados pueden emplearse en la práctica de la invención sin recurrir a excesiva experimentación. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención de excluir en el uso de tales términos y expresiones cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una combinación de factor VIII porcino que tiene el dominio B delecionado, excepto 12 aminoácidos en la parte del extremo N del dominio B y 12 aminoácidos en la parte del extremo C del dominio B (OBI-1), y un vehículo fisiológicamente aceptable para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene deficiencia de factor VIII, en la que el OBI-1 se administra una vez como una única inyección intravenosa de 10-100 unidades/kg de peso corporal ± 10 %, durante un periodo de 5-15 minutos, con el fin de detener una hemorragia.
- 10 2. La combinación para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene deficiencia de factor VIII de la reivindicación 1, en la que la dosis de OBI-1 es $10-50 \pm 10$ % de unidades/kg de peso corporal de dicho paciente.
- 15 3. La combinación para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene deficiencia de factor VIII de la reivindicación 2, en la que la dosis de OBI-1 es 15 ± 10 % de unidades/kg de peso corporal de dicho paciente.
- 15 4. La combinación para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene deficiencia de factor VIII como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el paciente está en el estado hemorrágico.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

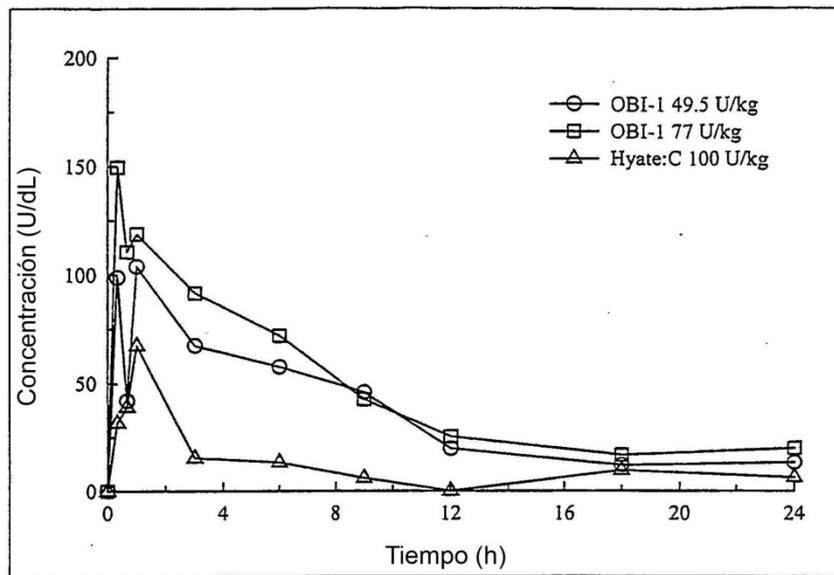


FIG. 1

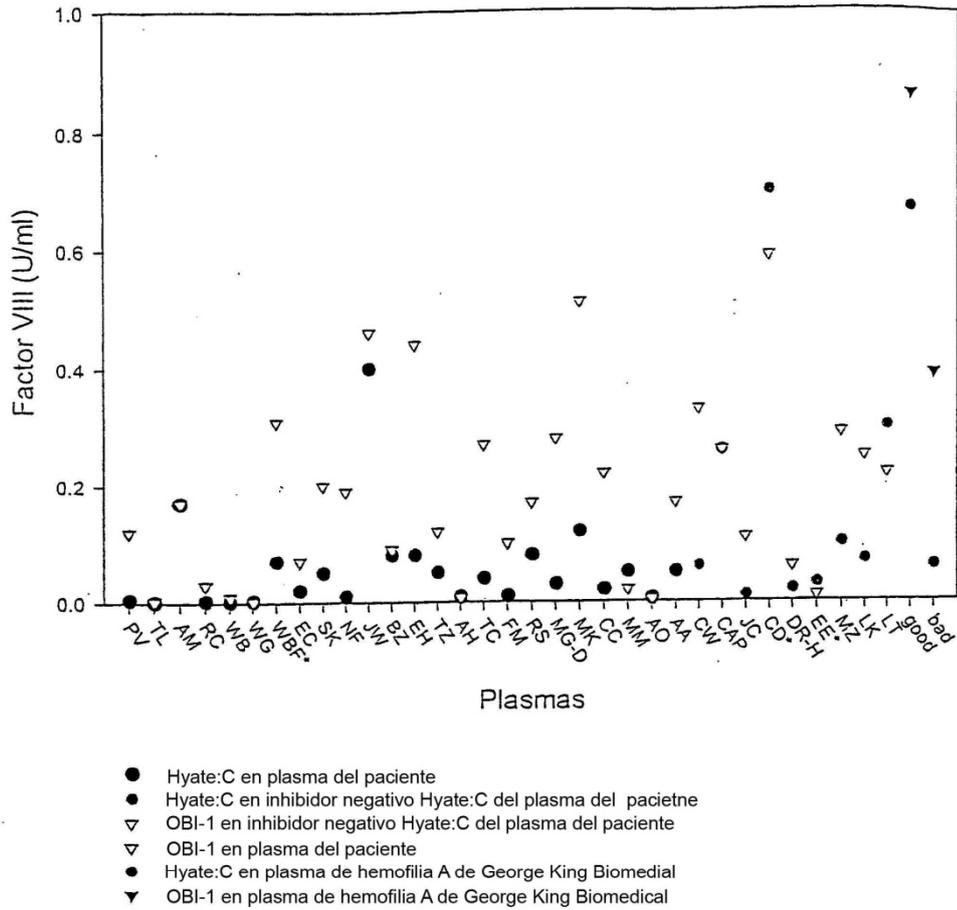


FIG. 2

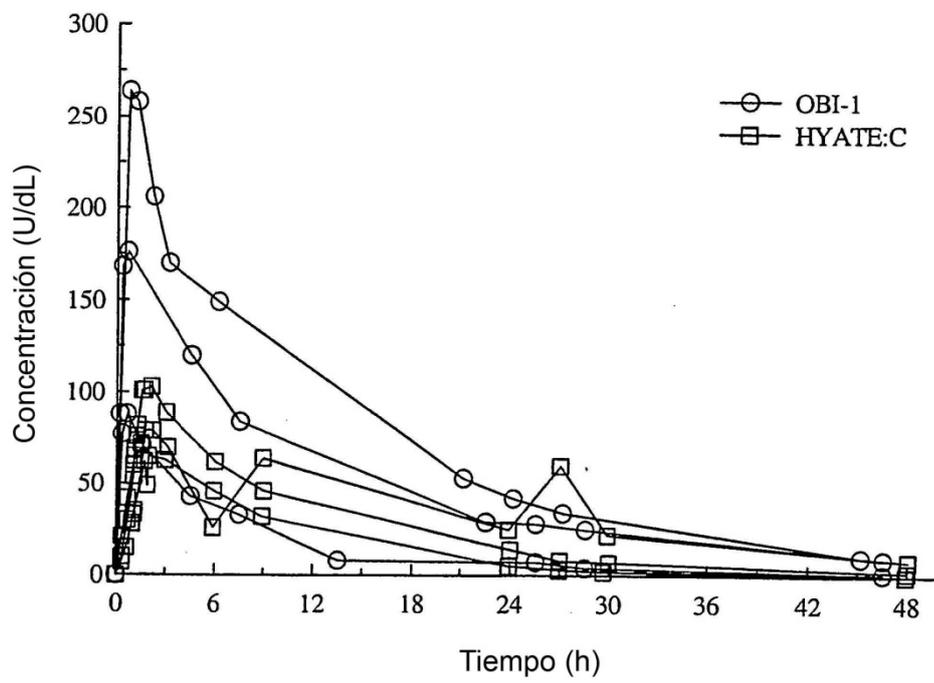


FIG. 3

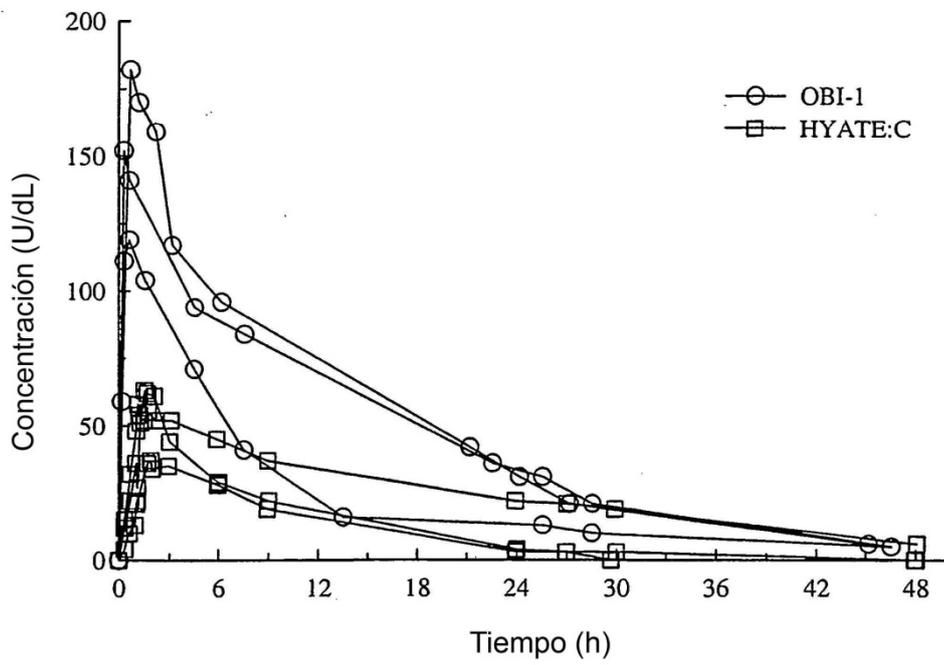


FIG. 4