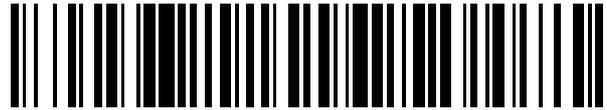


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 224**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2001 E 01929336 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1280548**

54 Título: **Administración subcutánea del Factor de coagulación VII**

30 Prioridad:

03.05.2000 DK 200000734

13.09.2000 DK 200001360

13.09.2000 DK 200001361

22.03.2001 DK 200100477

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

18.03.2014

73 Titular/es:

NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)

Thurgauerstrasse 36/38

8050 Zürich , CH

72 Inventor/es:

JOHANNESSEN, MARIE;

NORDFANG, OLE, JUUL y

JANSEN, JENS, AAS

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 449 224 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

Administración subcutánea del Factor de coagulación VII

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere al uso de Factor VIIa humano recombinante para la producción de un medicamento para el tratamiento de trastornos de sangrado por administración subcutánea. La invención además se refiere al Factor VIIa humano recombinante para el uso, mediante administración subcutánea, en el tratamiento de trastornos de sangrado.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La coagulación sanguínea es un proceso que consiste en una interacción compleja de varios componentes sanguíneos, o Factores, que finalmente da lugar a un coágulo de fibrina. Generalmente, los componentes sanguíneos que participan en lo que ha sido denominado "cascada" de coagulación son proenzimas o zimógenos, proteínas enzimáticamente inactivas que se convierten en enzimas proteolíticas por la acción de un activador, él mismo un Factor de coagulación activada. Los Factores de coagulación que han sufrido tal conversión son generalmente denominados "Factores activos", y se designan por la adición de una "a" minúscula como sufijo (p. ej., Factor VIIa).

15

[0003] El Factor X activado ("Xa") se requiere para convertir protrombina en trombina, que luego convierte fibrinógeno en fibrina como fase final en la formación de un coágulo de fibrina. Hay dos sistemas, o vías, que promueven la activación del Factor X. La "vía intrínseca" se refiere a las reacciones que llevan a la formación de trombina a través de la utilización de Factores presentes sólo en el plasma. Una serie de activaciones mediadas por proteasa en última instancia genera Factor IXa que, conjuntamente con Factor VIIIa, corta el Factor X en Xa. Una proteólisis idéntica se afecta por Factor VIIa y su cofactor, Factor tisular, en la "vía extrínseca" de coagulación sanguínea. El Factor tisular es una proteína ligada a membrana y normalmente no circula en el plasma. Cuando hay alteración de vaso, no obstante, este puede complejar con el Factor VIIa para catalizar la activación del Factor X o la activación del Factor IX en presencia de Ca^{++} y fosfolípido. Mientras la importancia relativa de las dos vías de coagulación en la hemostasis no está clara, en los últimos años se ha encontrado que el Factor VII y el Factor tisular juegan un papel esencial en la regulación de la coagulación sanguínea.

20

25

30

[0004] El Factor VII es una glicoproteína traza del plasma que circula en la sangre como un zimógeno monocatenario. El zimógeno es catalíticamente inactivo. El Factor VII monocatenario se puede convertir en Factor VIIa bicatenario por Factor Xa, Factor XIIa, Factor IXa o trombina in vitro. Se cree que el Factor Xa es el principal el activador fisiológico del Factor VII. Como otras diferentes proteínas plasmáticas implicadas en la hemostasis, el Factor VII depende de vitamina K para su actividad, que se requiere para la γ -carboxilación de residuos de ácido glutámico múltiples que se reagrupan en el amino terminal de la proteína. Estos ácidos glutámicos γ -carboxilados se requieren para la interacción asociada a metal del Factor VII con fosfolípidos.

35

[0005] La conversión del Factor VII de zimógeno en la molécula bicatenaria activada ocurre por escisión de un enlace peptídico interno localizado aproximadamente en medio de la molécula. En el Factor VII humano, el sitio de escisión de activación está en Arg₁₅₂-Ile₁₅₃. En presencia de Factor tisular, fosfolípidos e iones de calcio, el Factor VIIa bicatenario activa rápidamente el Factor X o Factor IX por proteólisis limitada.

40

[0006] Los Factores de Coagulación son proteínas grandes que son normalmente suministradas por vía intravenosa para hacer que el medicamento esté directamente disponible en el flujo sanguíneo. No obstante sería ventajoso si un medicamento pudiera ser suministrado subcutáneamente, intramuscularmente o intradérmicamente ya que estas formas de administración son mucho más fáciles de manejar para el paciente, especialmente si el medicamento debe ser tomado regularmente durante la vida entera y se debe iniciar el tratamiento pronto, por ejemplo cuando el paciente es un niño. No obstante, un medicamento con una molécula lábil y muy grande normalmente tiene una biodisponibilidad baja si se suministra subcutáneamente, intramuscularmente o intradérmicamente, ya que la comprensión es baja y la degradación es severa. Además, tales proteínas grandes pueden ser inmunogénicas cuando se administran subcutáneamente.

50

[0007] El Factor VIIa humano recombinante (rFVIIa) es un Factor de coagulación activada que es útil en el tratamiento de pacientes hemofílicos que generan anticuerpos de neutralización contra el Factor VIII o Factor IX. El Factor VIII y el Factor IX causan la severa formación de anticuerpos en aproximadamente 10 % de los pacientes de hemofilia. La acción del rFVIIa (activación del sistema de coagulación a través del Factor X) se aplica en el compartimento vascular del cuerpo. La forma de administración de rFVIIa ha sido hasta ahora por vía intravenosa. Como resultado de la vida media relativamente corta, la administración normalmente tiene que ser repetida cada 2,5 a 3 horas. Una forma alternativa de administración que resultaría en una biodisponibilidad razonable y una fase de absorción de larga duración permitiría un aumento en los intervalos de dosificación y al mismo tiempo haría posible la auto administración, aumentando así la conveniencia para el paciente.

55

60

[0008] El Factor VIIa es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Es por lo tanto una molécula suficientemente grande para apuntar a la necesidad de la introducción directa en el flujo sanguíneo, ya que una biodisponibilidad muy baja, si la hay, sería prevista. Además dosis bastante grandes se pueden requerir para un

65

adulto, por ejemplo durante cirugía. En consecuencia, el Factor VIIa ha sido entregado de forma convencional por vía intravenosa a pacientes de hemofilia A o B, bien profilácticamente o en respuesta a episodios de sangrado. Tal uso repetido de inyecciones intravenosas, a la vez que son necesarios para controlar la enfermedad, puede tener efectos secundarios. Inyecciones repetidas pueden hacer que la vena en el sitio de inyección se vuelva fibrosa u ocluida, un problema especialmente agudo en el tratamiento de personas mayores. También, cuando las venas son pequeñas, como en bebés, puede ser difícil para el médico insertar una aguja en la vena para inyectar la dosis terapéutica requerida.

[0009] Las únicas proteínas de Factor de coagulación que han sido administradas por inyección subcutánea son los Factores VIII (170 - 300 kDa) y IX (60 kDa). Estos Factores de coagulación se administran en forma de zimógenos monocatenarios, que todavía no han sido activados. Estas formas no activadas son más estables que las formas activadas (divididas), que se degradan mucho más rápido. La inyección subcutánea de estas dos proteínas significativamente no cambia sus propiedades farmacocinéticas (p. ej., vida media).

[0010] Se acaba de descubrir que la forma activada, dividida y por lo tanto más lábil del Factor VIIa de coagulación se puede entregar por inyección subcutánea con suficientemente transporte en el flujo sanguíneo en forma biológicamente activa y en concentraciones adecuadas. Se ha encontrado también que FVIIa muestra propiedades favorables farmacocinéticas (especialmente vida media) cuando se inyectan subcutáneamente.

[0011] Factor VIIa es útil para la administración a mamíferos, particularmente seres humanos, para controlar trastornos de sangrado, particularmente trastornos de sangrado que se provocan por deficiencias de Factor de coagulación (hemofilia A y B), o Inhibidores de Factor de coagulación o trastornos de sangrado en pacientes que no padecen hemofilia A o B, por ejemplo, en pacientes que sufren enfermedad de von Willebrand. Pacientes con enfermedad de von Willebrand tienen una hemostasis primaria defectuosa porque carecen o tienen una proteína de Factor von Willebrand anormal. Los trastornos de sangrado son también vistos en pacientes con un funcionamiento normal de la cascada de coagulación sanguínea y se pueden provocar por una función de plaqueta defectuosa, trombocitopenia, o incluso por cuestiones desconocidas. Además, FVIIa se puede utilizar para evitar o tratar sangrados excesivos en pacientes donde el sistema hemostático que incluye la cascada de coagulación y plaquetas están funcionamiento normalmente. Tales sangrados excesivos son, por ejemplo, sangrados asociados a daño de tejido, por ejemplo cirugía o traumatismo, especialmente en tejidos ricos en el Factor tisular (TF). FVIIa se puede utilizar en tales situaciones al igual que cuando el sangrado es difuso y responde pobremente a las técnicas hemostáticas actuales y terapias (p. ej. gastritis hemorrágica y sangrado uterino profuso). FVIIa también puede ser adecuada para el tratamiento de sangrados que ocurren en órganos con limitada posibilidad de hemostasis mecánica tal como cerebro, región de oído interno, ojos al igual que en asociación con el proceso de tomar biopsias de varios órganos y en la cirugía laparoscópica.

Estado de la técnica

[0012] Solicitud de patente internacional n.º WO 93/07890 se refiere al tratamiento de hemofilia con FIX por inyección subcutánea.

[0013] Solicitud de patente internacional n.º WO 95/26750 se refiere a una formulación de FVIII o FIX adecuada para inyección subcutánea para el tratamiento de hemofilia A o B.

[0014] WO 96/12800 se refiere a un Factor VIIa modificado que muestra propiedades anticoagulantes y que se puede administrar subcutáneamente.

[0015] Solicitud de patente internacional n.º WO 95/28954 se refiere a preparaciones concentradas de FIX adecuadas para almacenamiento e inyección subcutánea.

[0016] Dunn et al. (1999) Biodrugs 12: 71-77 se refiere al control de eventos de sangrado durante o después de cirugía en pacientes con hemofilia con FVIIa por inyección intravenosa.

LISTA DE LAS FIGURAS

[0017]

Fig. 1a-d muestra los Perfiles Individuales de Concentración en Plasma de rFVIIa Después de la Administración Intravenosa (i.v.) y Subcutánea (s.c.) de 0,2 mg/kg a cerdos pigmeos n.º a-d;

Fig. 2a-d muestra los Perfiles Individuales de Actividad en Plasma de rFVIIa Después de la Administración Intravenosa (i.v.) y Subcutánea (s.c.) de 0,2 mg/kg a cerdos pigmeos n.º a-d;

Fig 3 muestra la secuencia del residuo de aminoácidos de Factor VII de tipo salvaje.

LISTA DE TABLAS

[0018] Tabla 1 muestra los Resultados PK del ensayo de ELISA después de administrar una dosis de 0,2 mg/kg (0,33 ml/kg) de rFVII i.v. y s.c. a cerdos pigmeos que pesan 11,4-13,4 kg.

[0019] Tabla 2 muestra los Resultados PK del Ensayo de Coagulación después de administrar una dosis de 0,2 mg/kg (0,33 ml/kg) de rFVII i.v. y s.c. a cerdos pigmeos 11,4-13,4 kg.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0020] Se acaba de descubrir que el Factor VIIa de coagulación activado, (Factor VIIa o FVIIa), que es una proteína muy sensible, se puede administrar subcutáneamente mostrando una absorción aceptable y un nivel alto de proteína de Factor VIIa activo en la sangre. Además, la vida media en plasma tanto del antígeno FVII como de la actividad FVII se aumenta significativamente por la administración anterior y el t(máx) se retarda por diferentes horas.

[0021] Así, en un aspecto, la invención proporciona el uso de Factor VIIa humano recombinante para la producción de un medicamento para el tratamiento de trastornos de sangrado por administración subcutánea.

[0022] En otro aspecto, la invención proporciona Factor VIIa humano recombinante para el uso, mediante administración subcutánea, en el tratamiento de trastornos de sangrado.

[0023] En una forma de realización, el medicamento está en forma de una solución acuosa preparada para el uso. En otra forma de realización, el medicamento está en forma de una composición liofilizada que antes de la administración ha sido reconstituida en un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para inyección.

[0024] En una forma de realización, la condición afectable por el Factor VIIa es el sangrado provocado por falta o defecto en los Factores de coagulación VIII, IX o VII, o por inhibidores contra los Factores de coagulación VIII, IX o VII. En otra forma de realización, la condición es sangrado provocado por una función de plaqueta defectuosa. En otra forma de realización, la condición es sangrado asociado a daño de tejido o traumatismo excesivos.

[0025] El sujeto que padece una condición afectable por Factor VIIa puede ser cualquier animal, en particular un mamífero - en una forma de realización preferida, el mamífero es un ser humano.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

[0026] Según la presente invención Factor VIIa, o FVIIa, se produce por medios recombinantes.

[0027] Como se utiliza en este caso "Factor VIIa" se refiere a Factor VII de tipo salvaje (es decir, un polipéptido con la secuencia de aminoácidos descrita en la patente EE. UU. n.º 4,784,950). El término "Factor VIIa" se destina a abarcar polipéptidos de Factor VII que han sido proteolíticamente procesados para producir sus formas bioactivas respectivas. Típicamente, el Factor VII es dividido entre los residuos 152 y 153 para producir Factor VIIa.

[0028] La actividad biológica del Factor VIIa en la coagulación sanguínea deriva de su capacidad para (i) enlazar con el Factor tisular (TF) y (ii) catalizar la escisión proteolítica del Factor IX o Factor X para producir el Factor activado IX o X (Factor IXa o Xa, respectivamente). Para fines de la invención, la actividad biológica del Factor VIIa se puede cuantificar por medición de la capacidad de una preparación para promover la coagulación sanguínea utilizando plasma deficiente en Factor VII y tromboplastina, como se describe, por ejemplo, en la patente EE. UU. n.º 5,997,864. En este ensayo, la actividad biológica se expresa como la reducción en el tiempo de coagulación con respecto a una muestra de control y se convierte a "unidades Factor VII" por comparación con un estándar de suero de humano acumulado que contiene 1 unidad/ml de actividad de Factor VII. Alternativamente, la actividad biológica del Factor VIIa se puede cuantificar por (i) medición de la capacidad del Factor VIIa para producir Factor Xa en un sistema que comprende TF introducido en una membrana lipídica y Factor X (Persson et al., J. Biol. Chem. 272:19919-19924,1997); (ii) medición de la hidrólisis del Factor X en un sistema acuoso; (iii) medición de su unión física a TF utilizando un instrumento basado en resonancia de plasmón de superficie (Persson, FEBS Letts. 413:359-363, 1997) y (iv) medición de la hidrólisis de un sustrato sintético.

[0029] En este contexto, el término "una unidad FVIIa" se define por calibración frente a un patrón secundario del primer estándar internacional 89/688 establecido en 1993. 50 unidades internacionales (UI) de FVIIa humano de tipo salvaje corresponden a aproximadamente 1 µg proteína.

[0030] En este contexto, el término "tratamiento" se designa para incluir tratamiento profiláctico de un trastorno de sangrado por FVIIa.

Abreviaturas

[0031]

5 TF Factor tisular

FVII Factor VII en su forma monocatenaria inactivada

FVIIa Factor VII en su forma activada rFVIIa Factor VII recombinante en su forma activada

10

FVIII Factor VIII en su forma inactivada

FIX Factor IX en su forma inactivada

15 UI Unidades internacionales

Preparación de compuesto

20 [0032] El Factor VIIa humano purificado adecuado para uso en la presente invención es preferiblemente hecho por tecnología recombinante de ADN, por ejemplo como se describe por Hagen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2412-2416, 1986 o como se describe en la patente europea n.º 200.421 (ZymoGenetics).

25 [0033] Las variantes del Factor VII descritas aquí se pueden producir mediante técnicas de ácido nucleico recombinante. En general, una secuencia de ácidos nucleicos de Factor VII de tipo salvaje clonado se modifica para codificar la proteína deseada. Esta secuencia modificada es luego insertada en un vector de expresión, que es sucesivamente transformado o modificado en células huésped. Células eucarióticas más altas, en particular células mamíferas cultivadas, son preferidas como células huésped. El nucleótido completo y secuencias de aminoácidos para Factor VII humano son conocidos (véase U.S. 4,784,950, donde la clonación y expresión del Factor VII humano recombinante está descrita). La secuencia del Factor VII bovino está descrita en Takeya et al., J. Biol. Chem. 263:14868-14872 (1988).

30

35 [0034] Las alteraciones de secuencia de aminoácidos se pueden realizar por una variedad de técnicas. Modificación de la secuencia de ácidos nucleicos puede ser por mutagénesis de sitio específico. Técnicas para mutagénesis de sitio específico se conocen bien en la técnica y están descritas en, por ejemplo, Zoller and Smith (DNA 3:479-488, 1984) o "Splicing by extension overlap", Horton et al., Gene 77, 1989, pp. 61-68. Así, utilizando las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de Factor VII, uno puede introducir la(s) alteración(s) de elección. Asimismo, procedimientos para preparar un constructo de ADN utilizando la reacción en cadena de polimerasa utilizando cebadores son conocidos para personas expertas en la técnica (véase PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, USA).

40 [0035] Factor VII también se puede producir por los métodos descritos por Broze y Majerus, J.Biol.Chem. 255 (4): 1242-1247, 1980 y Hedner y Kisiel, J.Clin.Invest. 71: 1836-1841, 1983. Estos métodos producen Factor VII sin cantidades detectables de otros Factores de coagulación sanguínea. Una preparación de Factor VII incluso más purificada se puede obtener mediante la inclusión de una filtración en gel adicional como paso de purificación final. El Factor VII es luego convertido en FVIIa activado por medios conocidos, por ejemplo por diferentes proteínas plasmáticas, tal como Factor XIIa, IX a o Xa. Alternativamente, como está descrito por Bjoern et al. (Research Disclosure, 269 September 1986, pp. 564-565), Factor VII se puede activar haciéndolo pasar a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, tal como Mono Q® (Pharmacia fine Chemicals) o similar.

45

Administración farmacéutica

50 [0036] El régimen para cualquier paciente que debe ser tratado con FVIIa tal y como se menciona aquí debería ser determinado por aquellos expertos en la técnica. La dosis que debe ser administrada en la terapia se puede determinar por un médico y dependerá de la forma de administración (subcutánea, intramuscular o intradérmica) y del peso y la condición del paciente.

55 [0037] Donde FVIIa inyectado por vía intravenosa normalmente tiene que ser administrado cada 2.5-3 horas, FVIIa, inyectado subcutáneamente intradérmico o intramuscularmente deberían ser administrados con un intervalo de 12-48 horas, preferiblemente 24 horas. FVIIa es preferiblemente administrado por inyecciones subcutáneas y en una cantidad de aproximadamente 100 - 100 000 unidades por kg peso corporal, y preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 250 - 25 000 unidades por kg peso corporal correspondiente a aproximadamente 5 - 500 µg/kg.

60

Formulación de medicamento

[0038] Una inyección intravenosa es normalmente preferido que una inyección proporcionada subcutáneamente esté entre 0,05 a 1 ml. La concentración de FVIIa debe por lo tanto ser alta en tal medicamento.

65

[0039] El volumen proporcionado puede ser más de 0,01 ml, adecuado 0,1-2 ml, preferiblemente 0,25-1,5 ml y más

preferible 0,5-1 ml.

5 [0040] Los aditivos que aumentan la biodisponibilidad de FVIIa son compuestos adecuadamente orgánicos per se, sales derivadas, emulsiones o dispersiones que contienen compuestos orgánicos per se o sales derivadas, por ejemplo dispersiones de lípidos polares, o cualquier combinación o secuencia de adición de estos. Compuestos orgánicos útiles en la invención son por ejemplo aminoácidos, péptidos, proteínas, y polisacáridos. Péptidos incluyen dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, tal como colágeno y gelatina. El colágeno y gelatina están preferiblemente hidrolizados. Polisacáridos incluyen por ejemplo quitosanos, ciclodextrinas, almidón, ácidos hialurónicos, dextranos, celulosa, y cualquier derivado, combinación y/o secuencia de adición de estos. El almidón está preferiblemente hidrolizado. Las emulsiones incluyen emulsiones de aceite en agua con aceite como fase dispersa y dispersiones de agua en aceite con aceite como la fase continua. El aceite puede ser de origen vegetal o animal o sintéticamente producido. Adecuadamente, el aceite vegetal de las emulsiones es aceite de soja o aceite de alazor, o cualquier combinación de estos. Adecuadamente los lípidos polares son uno o más fosfolípidos o glicolípidos o cualquier combinación de estos. Los aditivos que aumentan la biodisponibilidad de FVIIa podrían ser añadidos a la formulación antes del secado o en la reconstitución, o estos podrían ser añadidos a una solución estable o dispersión que contiene FVIIa.

20 [0041] Antes de la administración, una o más soluciones acuosas o dispersiones podrían ser adicionadas, en cualquier mezcla o secuencia, al medicamento de la presente invención, que está en forma de solución acuosa estable, dispersión o seca.

[0042] El medicamento podría estar en forma seca, preferiblemente liofilizado. Antes de la administración, el producto seco o composición se puede reconstituir con una solución acuosa o una dispersión por ejemplo una suspensión, una formulación liposómica o una emulsión.

25 [0043] El medicamento puede también ser una solución acuosa estable preparada para administración. Esto puede también ser una dispersión, por ejemplo una suspensión, una formulación liposómica o una emulsión. El medicamento es preferiblemente suministrado subcutáneamente. La actividad de FVIIa en la formulación es preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, más preferido de aproximadamente 0,3 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, más preferido de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, más preferido de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, más preferido de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, e incluso más preferido de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml.

35 [0044] El medicamento también puede comprender sal con el objetivo de dar una solución isotónica, por ejemplo NaCl, KCl, y/o este puede comprender uno o más de otros compuestos que establecen isotonicidad, preferiblemente en una cantidad superior a 1,0 mg/ml.

40 [0045] Calcio, u otros iones metálicos bivalentes, por ejemplo zinc, es necesario para el mantenimiento de la actividad de actividad FVIIa. Se puede adicionar como, por ejemplo, cloruro de calcio, pero otras sales tales como gluconato de calcio, gluconato de calcio o gluceptato de calcio también se puede usar. El medicamento preferible comprende cloruro de calcio en una cantidad superior a 0,15 mg/ml.

45 [0046] Un aminoácido es preferiblemente usado para tamponar el sistema y este también protege la proteína si la formulación está liofilizada. Un tampón adecuado podría ser glicina, lisina, arginina, histidina o glicilglicina, preferido es glicilglicina.

50 [0047] Un tensioactivo no iónico también puede estar presente en el medicamento. El tensioactivo es preferible elegido de copolímeros en bloque, tal como un poloxámero, por ejemplo poloxámero 188, o un éster de ácido graso de sorbitan de polioxietileno, tal como polioxietileno-(20)-sorbitan monolaurato o polioxietileno-(20)-sorbitan monooleato. Preferido es polioxietileno-(20)-sorbitan monooleato (Tween 20). Tween 20 es preferiblemente usado en una concentración de al menos 0,01 mg/ml. El tensioactivo no iónico, en caso de ser usado, debería preferiblemente estar presente en una cantidad sobre la concentración micelar crítica (CMC). Véase Wan and Lee, Journal of Pharm Sci, 63, p. 136, 1974.

55 [0048] Mono- o disacáridos (p. ej. sacarosa), polisacáridos tales como dextrinas de bajo peso molecular, o polialcoholes (p. ej. sorbitol, glicerol o manitol) pueden ser adicionados. El medicamento también puede comprender antioxidantes tal como bisulfito, glutatión ascorbato, acetilcisteína, tocoferol, metionina, EDTA, ácido cítrico, butil hidroxil tolueno y/o butil hidroxil anisol. Agentes complejantes, tal como EDTA y ácido cítrico pueden también estar presentes en concentraciones pequeñas la estabilización de las moléculas de FVIIa, si ellos muestran una afinidad más fuerte por iones metálicos desestabilizadores que por calcio u otros iones metálicos bivalentes, por ejemplo Zn^{2+} . Además, conservantes tales como alcohol benzílico, fenol, ácido sórbico, parabens, y clorocresol pueden ser adicionados.

60 [0049] Los adyuvantes están generalmente presentes en una concentración de 0,001 a 4 % p/v. El producto farmacéutico también puede contener inhibidores de proteasa, por ejemplo aprotinina o ácido tranexámico.

65 [0050] El pH de la preparación se ajusta preferiblemente a un valor en el intervalo de 2 - 9. Preparaciones con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5 son preferidas, más preferidas son preparaciones con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, más preferidas son preparaciones con un pH aproximadamente 5,5.

[0051] Preferiblemente, el FVIIa usado es altamente purificado, es decir tiene una actividad específica superior a 40 UI/μg.

En una forma de realización, el medicamento consiste en

rFVIIa	0,6 mg/ml (30,000 UI/ml)
Cloruro sódico	2,92 mg/ml
Glicilglicina	1,32 mg/ml
Polisorbato 80	0,07 mg/ml
Cloruro de calcio, 2H ₂ O	1,47 mg/ml
Manitol	30, 00 mg/ml
pH 5,5	
<hr/>	
(reconstituido con agua esterilizada a 1 ml)	

5

[0052] Técnicas convencionales para preparar composiciones farmacéuticas, que se pueden usar según la presente invención, están, por ejemplo, descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed., 1995.

10

[0053] Los medicamentos se pueden esterilizar por, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, por incorporación de agentes de esterilización en los medicamentos, por irradiación de los medicamentos, o por calentamiento de los medicamentos. Ellos pueden también ser fabricados en forma de medicamentos sólidos estériles que pueden ser disueltos en la agua esterilizada, o algún otro medio inyectable estéril antes o inmediatamente antes del uso.

15

[0054] La presente invención es posteriormente ilustrada por los siguientes ejemplos. Los ejemplos presentados son entendidos como una ilustración de la invención, no como una limitación.

EJEMPLOS

20

Materiales y métodos

[0055] La producción de Factor VIIa recombinante (rFVIIa) fue esencialmente realizada como se describe en la Patente Europea n.º 200,421.

25

[0056] La actividad FVIIa y la concentración fueron ajustadas por dilución con agua para inyección y excipientes fueron adicionados en cantidades adecuadas. La solución fue luego filtrada y liofilizada de forma estéril.

Polvo liofilizado de rFVIIa:

30

[0057]

rFVIIa	0,6 mg/ml
Cloruro sódico	2,92 mg/ml
Glicilglicina	7,32 mg/ml
Polisorbato 80	0,07 mg/ml
Cloruro de calcio, 2H ₂ O	1,47 mg/ml
Manitol	30, 00 mg/ml
pH 5,5	

[0058] Antes del uso, la composición liofilizada fue reconstituida en el agua a un volumen total de 1,0 ml.

35

Ejemplo 1

Animales

40

[0059] El estudio fue realizado en 4 cerdos pigmeos Göttingen hembra de Ellegaard Göttingen Minipigs ApS, Sorø Landevej 302; DK-4261, Dalmoose, Dinamarca. Al inicio del periodo de aclimatación los animales tenían de 7 a 8 meses de edad y el peso corporal estaba en el rango de 11,2 a 13 kg. Un periodo de pre-dosificación de una semana (incluyendo un periodo de aclimatación de 5 días) fue permitido antes de la dosificación.

45

[0060] Dos veces diarias se ofreció a los animales agua y alimento (175 g Altromin 9023 durante los 2 primeros días, luego 200 g).

[0061] El estudio fue realizado en una cámara termostata a 21±3°C.

50

Fármacos y productos químicos

[0062] rFVIIa fue usado para dosificación. La sustancia fue disuelta en H₂O estéril para dar 0,6 mg/ml. Todos los otros

productos químicos fueron obtenidos de fuentes comerciales y fueron de calidad analítica.

Diseño experimental

5 [0063] A los animales se les suministró dosis una vez por vía intravenosa (i.v.) y una vez subcutáneamente (s.c.) separadas por un periodo de lavado de una semana de la siguiente manera:

Animal n.º	Vía de dosificación	
	Primera dosificación	Segunda dosificación
1	s.c.	i.v.
2	s.c.	i.v.
3	i.v.	s.c.
4	i.v.	s.c.

10 [0064] La dosis fue 0,2 mg/kg de peso corporal correspondiente a 0,33 ml/kg de peso corporal. La dosis i.v. fue suministrada a través de una aguja o un catéter corto en una vena de la oreja. Inmediatamente después de la dosificación la aguja/catéter fue enjuagada con 2-5 ml, agua estéril isotónica. La dosis s.c. fue suministrada detrás del pabellón auditivo. El área de dosificación fue marcada con una etiqueta de color.

Sangre y muestreo de tejido

15 [0065] Muestras de sangre fueron recogidas a través de punción de aguja de la vena yugular/tronco yugular. En relación con la dosificación i.v. las muestras fueron recogidas antes, y 6, 15, 30, 60 y 90 minutos y 2, 3, 4, 6 y 8 horas después de la dosificación. Después de las dosificaciones s.c. las muestras fueron recogidas a 30, 60 minutos y 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 14 y 24 horas al igual que antes de la dosificación.

20 [0066] Todas las muestras de sangre fueron tomadas en un plazo de 1 minuto de tiempo estipulado salvo dos muestras (animal n.º 4, 14 y 24 horas después de dosificación s.c.) que fueron tomadas 2 minutos después del tiempo programado.

25 [0067] Las muestras de sangre (3 ml) fueron recogidas en Vacutainers que contienen citrato para la estabilización y almacenadas en hielo-agua hasta el centrifugado (10 min, +4°C, aproximadamente 1268xG). Dos alícuotas cada una de 150 µl fueron tomadas de cada muestra. Para una de las alícuotas 1350 µl del tampón usado para ensayo de ELISA fueron adicionados y la mezcla dividida entre dos criotubos Nunc marcados con "ELISA" además de la identificación y almacenadas a aproximadamente -20°C pendiente de transferencia al departamento de inmunoquímica para ensayo. A la otra alícuota 1350 µl del tampón usado para ensayo de coagulación fueron adicionados y la mezcla dividida entre dos criotubos Nunc. Los tubos fueron marcados con "CLOT" aparte de la identificación y almacenados a -80°C pendiente de transferencia al departamento de inmunoquímica, Novo Nordisk, para ensayo. Se añadió tampón a las muestras en un plazo de 0,5 h después del muestreo y las muestras fueron congeladas en un plazo de 1 h después del muestreo.

35 [0068] El día después de la segunda dosificación todos los animales fueron anestesiados con una inyección i.p. de mebumal y matados por desangramiento. Los sitios de inyección subcutánea fueron localizados, muestras representativas y examinadas de forma macroscópica fueron quitadas y fijadas en 4 % formaldehído neutro tamponado con fosfato y transferidas al departamento de patología, Novo Nordisk, para examen histopatológico.

Métodos analíticos

40 [0069] La concentración de rFVIIa fue determinada por una ELISA y la actividad de rFVIIa por un ensayo de coagulación.

ELISA

45 [0070] El ensayo de ELISA fue FVII:Ag ELISA realizado como se describe en el inserto de equipo no. 1994.09/db versión 1.0 (versión danesa). El ensayo ha sido validado previamente para plasma humano y de rata. Una validación preliminar no mostró ninguna indicación de problemas usando el ensayo para análisis en el plasma de cerdo.

50 [0071] El ensayo es un ensayo inmunoenzimático monoclonal de dos sitios que utiliza peroxidasa como enzima marcador. Los pocillos de microtitulación son precubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-Factor VII específico. Luego tanto el anticuerpo marcado como muestra y enzima se agregan al pocillo. Durante el siguiente paso, se forma un "sándwich" entre el anticuerpo de fase sólida, la molécula de Factor VII y el anticuerpo monoclonal de Factor VII específico marcado de enzima. Después de un paso de lavado, donde el anticuerpo marcado con enzima no unido es eliminado, la actividad de la peroxidasa ligada se mide por la capacidad de la enzima para transformar un sustrato incoloro en un producto coloreado. El desarrollo del color se detiene por adición de ácido sulfúrico y se mide a 492 nm. Como estándar se usa rFVIIa entregado con el ensayo. La calibración del estándar se basa en la medición de la absorbancia a 280 nm.

Ensayo de coagulación

[0072] El ensayo de coagulación fue FVIIa:Clot (Stago) realizado según el equipo inserto. El ensayo ha sido validado previamente para plasma humano y de rata. Una validación preliminar no mostraba ninguna indicación de problemas usando el ensayo para análisis en el plasma de cerdo.

[0073] El Factor tisular soluble recombinante (rsTF) posee una función de coFactor específico para FVIIa. En consecuencia el FVII presente en el plasma de prueba no interfiere en el ensayo. El rsTF en presencia de FVIIa, fosfolípidos y Ca⁺⁺ produce coagulación de plasma. El tiempo de coagulación observado muestra una relación inversa con el nivel FVIIa inicialmente presente en el plasma. Como estándar se usa rFVIIa entregado con el ensayo. La calibración del estándar se basa en una comparación con el estándar de FVIIa internacional.

Análisis de datos

[0074] Los resultados de ELISA al igual que del ensayo de coagulación fueron sometidos a análisis farmacocinético no compartimental utilizando el software a base de PC WinNonlin (Scientific Consulting Inc.).

Resultados y discusión

[0075] Los resultados del ELISA y ensayos de coagulación se dan en el Apéndice A. Los perfiles de concentración de plasma individuales se dan en las figuras 1 y 2 mientras que los parámetros farmacocinéticos individuales se dan en Tablas 1 y 2.

[0076] Ninguna de las muestras de predosis presentaban concentraciones o actividades medibles indicando un suficiente lavado entre los dos periodos de dosificación.

[0077] Los perfiles de concentración de plasma y actividad (Fig. 1-2) muestran una fase de absorción extendida después de la administración s.c. dando como resultado un t_{máx} medio de 6,5 (rango de 5-8 horas) y 4,0 (rango 1,0-10,0) para concentración y actividad, respectivamente.

Tabla 1.

Resultados PK del ensayo ELISA después de la dosificación de 0,2 mg/kg (0,33 ml/kg) rFVII i.v. y s.c. a cerdos pígmicos que pesan 11,4-13,4 kg

Animal n.º	C _{máx} (ng/ml)		t _{máx} (h)	AUC _{0-∞} (ng·h/ml)		Extrapol. AUC (%)		f (%)	Vida media (h)	
	i.v.	s.c.	s.c.	i.v.	s.c.	i.v.	s.c.	s.c.	i.v.	s.c.
1	2130	86,3	8,0	4980	1711	11,2	14,7	34,4	2,7	7,7
2	2447	245,0	8,0	6960	4195	14,7	12,1	60,0	3,3	6,5
3	2134	142,6	5,0	6414	1849	13,0	12,7	28,8	2,9	7,2
4	2200	233,8	5,0	6659	2903	16,4	5,4	43,6	3,5	4,8
Medio	2228	176,9	6,5	6261	2665	13,8	11,2	41,7	3,5 ^a	6,4 ^a
SD	150	75,9	1,7	886	1151	2,3	4,0	13,6		

^a: media armónica

Tabla 2.

Resultados PK del ensayo de coagulación después de la dosificación de 0.2 mg/kg (0.33 ml/kg) de rFVII i.v. y s.c. a cerdos pígmicos que pesan 11.4-13.4 kg

Animal n.º	C _{máx} (mUI/ml)		t _{máx} (h)	AUC _{0-∞} (mUI·h/ml)		Extrapol. AUC (%)		f (%)	Vida media (h)	
	i.v.	s.c.	s.c.	i.v.	s.c.	i.v.	s.c.	s.c.	i.v.	s.c.
1	161454	4609	2,0	201887	67038	7,0	11,4	33,2	2,6	6,9
2	183766	9155	10,0	274157	126227	4,9	5,0	46,0	2,3	4,7
3	156908	5415	3,0	240033	63730	6,7	12,0	26,6	2,6	7,0
4	149559	13355	1,0	249408	135294	12,4	8,1	54,2	3,6	6,4
Medio	162922	8134	4,0	241371	98073	7,8	9,1	40,0	2,7 ^a	6,1 ^a
SD	14735	4005	4,1	30001	37950	3,2	3,2	12,4		

^a: media armónica

[0078] En consecuencia, los valores C_{máx} fueron inmensamente reducidos en comparación con aquellos de después de la administración i.v. (tablas 1 y 2). Los AUC después de la administración s.c. fueron reducidos en comparación con aquellos de después de la administración i.v. (tablas 1 y 2). No obstante, la extensión de biodisponibilidad fue razonablemente buena ya que la f media fue 41,7 % (rango 28,8-60,0 %) y 40,0 % (rango 26,6-54,2 %) como se estima a partir de los resultados de ELISA y de ensayo de coagulación, respectivamente.

[0079] La vida media después de la administración s.c. fue para todos los animales y para concentración al igual que para los resultados de actividad aumentada en comparación con después de la administración i.v. (Tabla 1 y 2). La razón para esto es muy probablemente el así llamado "flip-flop" que significa que el índice de absorción es más lento que el índice de eliminación. La vida media después de la administración s.c. es por lo tanto una medida del índice de absorción más que del índice de eliminación.

Conclusión

[0080] La biodisponibilidad de rFVIIa después de la administración subcutánea a cerdos pigmeos fue suficientemente alta para hacer que esta forma de administración sea interesante en el hombre. La fase de absorción después de la administración s.c. fue prolongada a una extensión que puede permitir intervalos de dosificación significativamente aumentados en seres humanos en comparación con aquellos necesitados en relación a la administración i.v.

Tabla 3.

15 Concentración de rFVII en plasma y datos de actividad

Adm. i.v. Tiempo (h)	Resultados de ELISA (ng/ml)				Resultados de ensayo de coagulación (mUI/ml)			
	Cerdo 1	Cerdo 2	Cerdo 3	Cerdo 4	Cerdo 1	Cerdo 2	Cerdo 3	Cerdo 4
0	< ^a	< ^a	< ^a	< ^a	< ^b	< ^b	< ^b	< ^b
0,1	2129,9	2447,2	2134,1	2200	131950	169150	130260	125680
0,25	1713,9	2058,5	1921,7	1810,2	97488	149376	98528	96816
0,5	1389,5	1801,4	1699,7	1639,3	72332	106160	93384	81248
1	1151,5	1285,2	1336,5	1291,7	50155	67885	55860	50855
1,5	869,1	1157,9	1134,5	1167,8	36960	60625	59352	49193
2	669,4	1306,5	1023,2	1019,9	25011	36475	29230	33830
3	586,7	731,5	718,9	717,5	16349	29708	26200	26675
				(continuación)				
4	410,2	515,7	524,7	472,1	11149	13514	12923	12913
6	217,2	319,9	290,4	338,7	8641	7484	7812	9019
8	144,8	219,8	200,7	215,1	3813	4062	4364	5969
Adm s.c. tiempo (h)								
0	< ^a	< ^a	< ^a	< ^a	< ^b	< ^b	< ^b	< ^b
0,5	< ^a	45,9	< ^a	68,6	3263	3889	1118	5904
1	53,5	84	< ^a	171,7	3907	6293	1990	13355
2	74,2	159,1	54,3	185,1	4609	8568	3509	11943
3	79,2	156,8	97,5	202,6	4315	6744	5415	12707
4	77,1	184,1	104,2	178,6	3889	7020	4510	10743
5	67,3	192,3	142,6	233,8	3108	n.s.	3589	7720
6	71,6	224	< ^{a,c}	178,6	2740	6663	1642	6591
8	86,3	245	109,8	122,7	2884	6927	3585	7000
10	79,8	225,8	91,9	140,4	3867	9155	3310	5630
12	58,4	193,3	69,9	118,6	2542	4983	2555	4700
14	75,6	161,9	60,5	106,6	2066	4543	1977	2970
24	22,5	54,4	22,5	22,5	764	929	759	1180

^{a)} : debajo del límite de cuantificación (45 ng/ml)

^{b)} : debajo del límite de cuantificación (117,6 mIU/ml)

^{c)} : excluido como atípico

n.s. : sin muestra

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso del Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante para la producción de un medicamento para tratamiento de trastornos de sangrado por administración subcutánea.
2. Uso según la reivindicación 1, dicho medicamento es una solución acuosa estable lista para el uso.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1, dicho medicamento es una composición liofilizada que se reconstituye con un vehículo de inyección aceptable farmacéuticamente antes de la administración.
4. Uso según la reivindicación 1, donde los trastornos de sangrado están provocados por deficiencias de Factor de coagulación, o inhibidores de Factor de coagulación, o enfermedad de von Willebrand, o una función de plaquetas defectuosa, o trombocitopenia.
- 15 5. Uso según la reivindicación 4, donde el trastorno de sangrado está provocado por hemofilia A o hemofilia B.
6. Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante para uso, mediante administración subcutánea, en el tratamiento de trastornos de sangrado.
- 20 7. Factor VIIa según la reivindicación 6 para uso según la reivindicación 6, que se formula en forma de solución acuosa estable preparada para el uso.
8. Factor VIIa según la reivindicación 6 para uso según la reivindicación 6, que se formula en forma de composición liofilizada y se reconstituye con un vehículo de inyección aceptable farmacéuticamente antes de la administración.
- 25 9. Factor VIIa según la reivindicación 6 para uso según la reivindicación 6, donde los trastornos de sangrado están provocados por deficiencias de Factor de coagulación, o inhibidores de Factor de coagulación, o enfermedad de von Willebrand, o una función de plaquetas defectuosa, o trombocitopenia.
- 30 10. Factor VIIa según la reivindicación 6 para uso según la reivindicación 6, donde el trastorno de sangrado está provocado por hemofilia A o hemofilia B.

Figura 1. Perfiles de Concentración en Plasma Individuales de rFVIIa después de Administración Intravenosa (i.v.) y Subcutánea (s.c) de 0,2 mg/kg a cerdos pigmeos

Animal_No. = 1

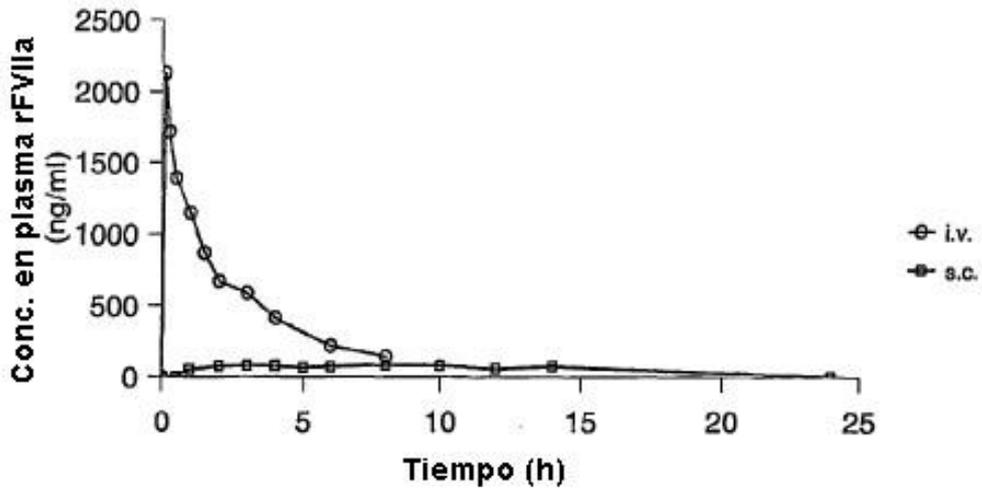


Fig. 1a

Animal_No. = 2

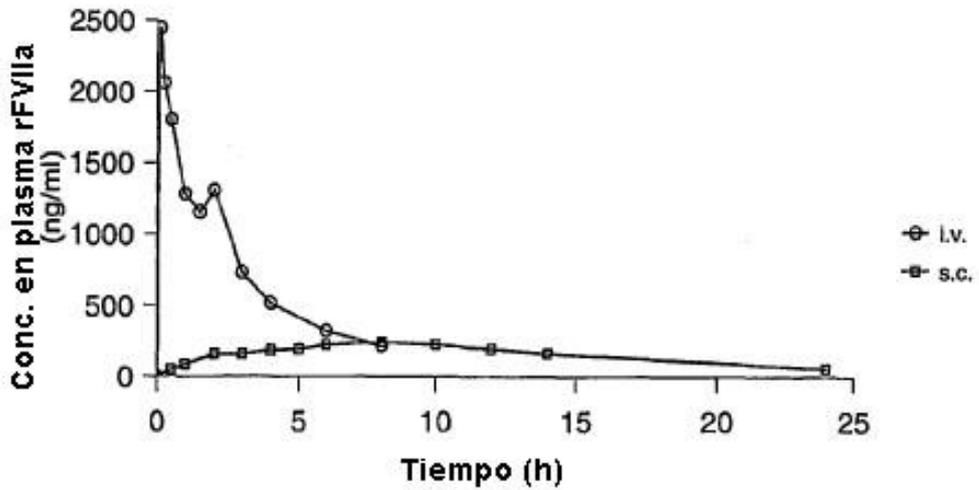


Fig. 1b

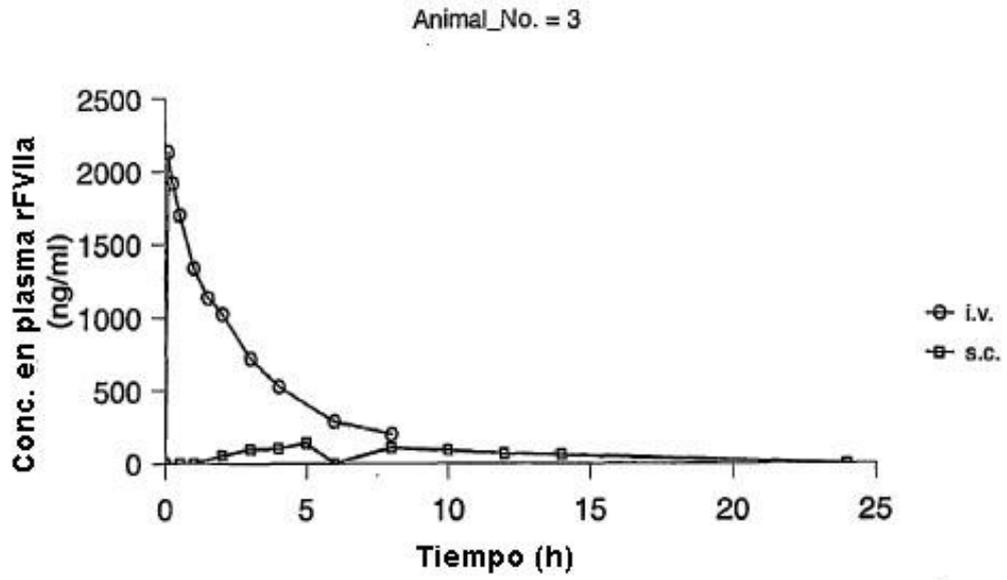


Fig. 1c

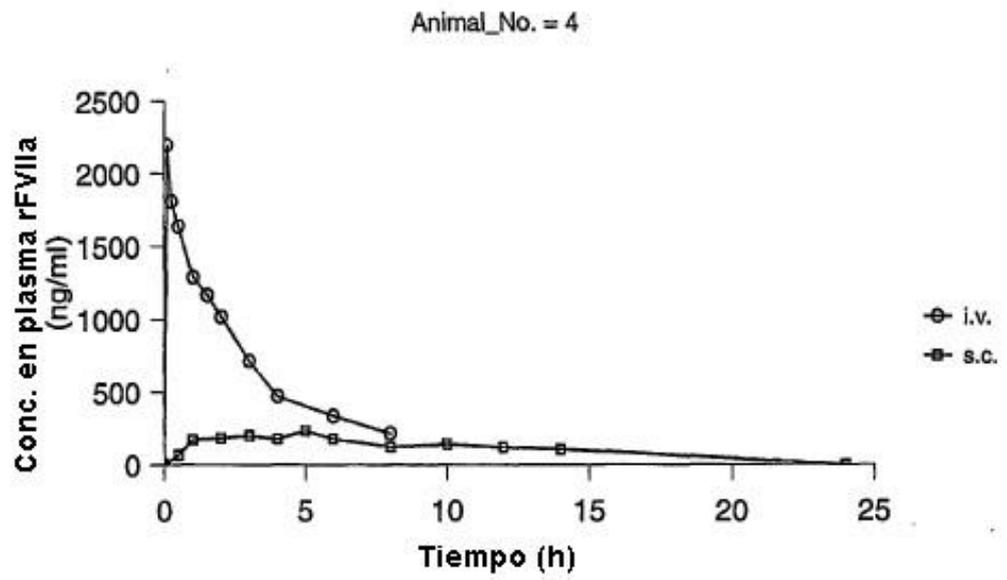


Fig. 1d

Figura 2. Perfiles de Actividad en Plasma Individuales de rFVIIa después de Administración Intravenosa (i.v.) y Subcutánea (s.c.) de 0,2 mg/kg a cerdos pigmeos

Animal = 1

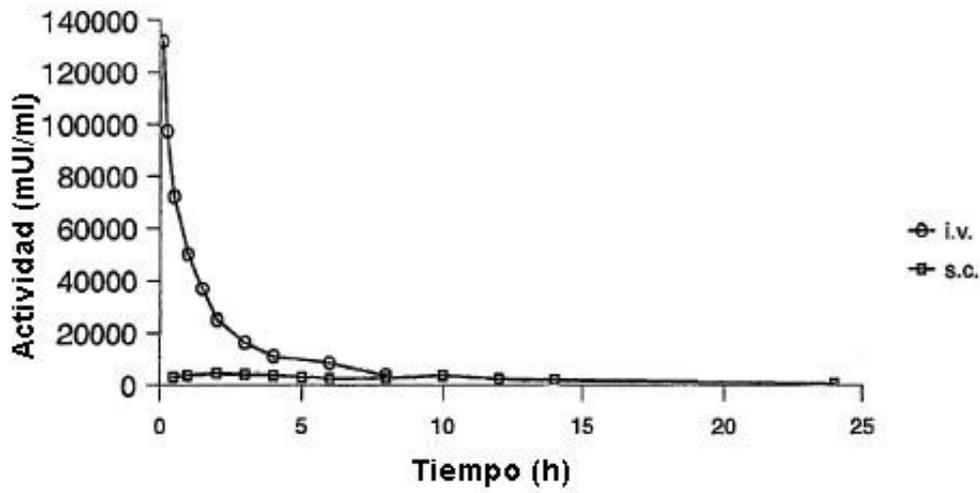


Fig. 2a

Animal = 2

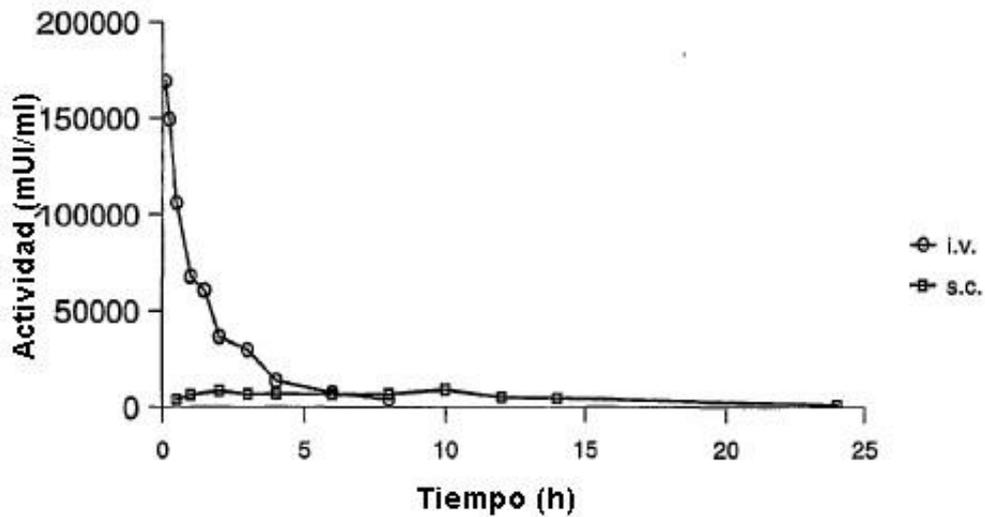


Fig. 2b

Animal = 3

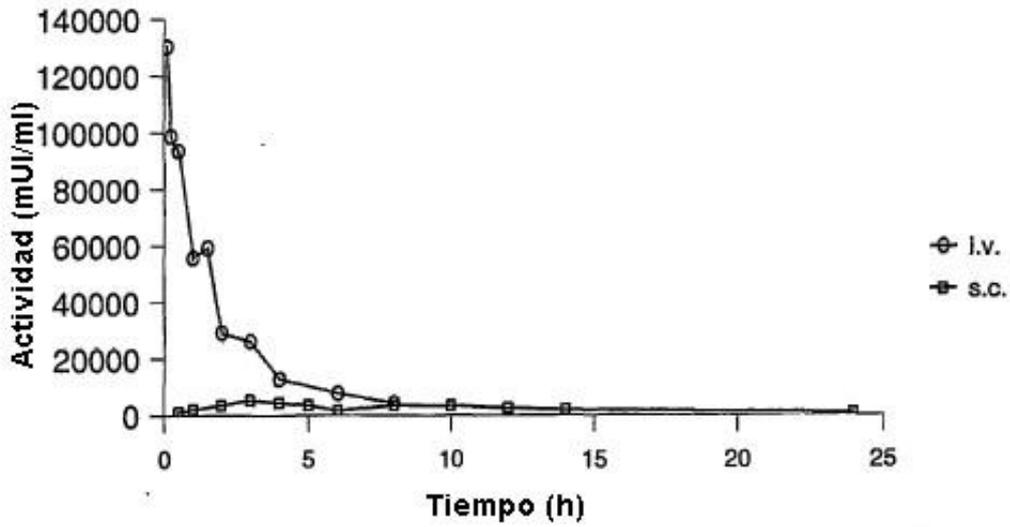


Fig. 2c

Animal = 4

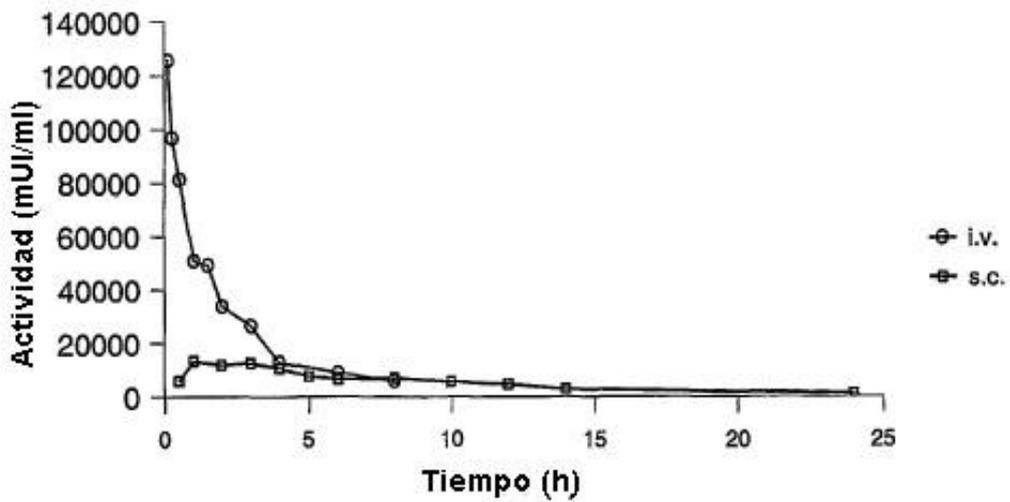


Fig. 2d

FIG. 3

La secuencia de aminoácidos del Factor VII de coagulación humano nativo (Factor VII de tipo salvaje):

Ala-Asn-Ala-Phe-Leu-GLA-GLA-Leu-Arg-Pro-Gly-Ser-Leu-GLA-Arg-GLA-Cys-Lys-
 5 10 15

GLA-GLA-Gln-Cys-Ser-Phe-GLA-GLA-Ala-Arg-GLA-Ile-Phe-Lys-Asp-Ala-GLA-Arg-
 20 25 30 35

Thr-Lys-Leu-Phe-Trp-Ile-Ser-Tyr-Ser-Asp-Gly-Asp-Gln-Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-
 40 45 50

Cys-Gln-Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Lys-Asp-Gln-Leu-Gln-Ser-Tyr-Ile-Cys-Phe-Cys-
 55 60 65 70

Leu-Pro-Ala-Phe-Glu-Gly-Arg-Asn-Cys-Glu-Thr-His-Lys-Asp-Asp-Gln-Leu-Ile-
 75 80 85 90

Cys-Val-Asn-Glu-Asn-Gly-Gly-Cys-Glu-Gln-Tyr-Cys-Ser-Asp-His-Thr-Gly-Thr-
 95 100 105

Lys-Arg-Ser-Cys-Arg-Cys-His-Glu-Gly-Tyr-Ser-Leu-Leu-Ala-Asp-Gly-Val-Ser-
 110 115 120 125

Cys-Thr-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-Lys-Gly-
 145 150 155 160

Glu-Cys-Pro-Trp-Gln-Val-Leu-Leu-Leu-Val-Asn-Gly-Ala-Gln-Leu-Cys-Gly-Gly-
 165 170 175 180

Thr-Leu-Ile-Asn-Thr-Ile-Trp-Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Asp-Lys-Ile-
 185 190 195

Lys-Asn-Trp-Arg-Asn-Leu-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-His-Asp-Leu-Ser-Glu-His-
 200 205 210 215

Asp-Gly-Asp-Glu-Gln-Ser-Arg-Arg-Val-Ala-Gln-Val-Ile-Ile-Pro-Ser-Thr-Tyr-
220 225 230

Val-Pro-Gly-Thr-Thr-Asn-His-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Arg-Leu-His-Gln-Pro-Val-
235 240 245 250

Val-Leu-Thr-Asp-His-Val-Val-Pro-Leu-Cys-Leu-Pro-Glu-Arg-Thr-Phe-Ser-Glu-
255 260 265 270

Arg-Thr-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-Leu-Met-
290 295 300 305

Thr-Gln-Asp-Cys-Leu-Gln-Gln-Ser-Arg-Lys-Val-Gly-Asp-Ser-Pro-Asn-Ile-Thr-
310 315 320

Glu-Tyr-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Ser-Asp-Gly-Ser-Lys-Asp-Ser-Cys-Lys-Gly-
325 330 335 340

Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-His-Ala-Thr-His-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Tyr-Leu-Thr-Gly-
345 350 355 360

Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Gln-Gly-Cys-Ala-Thr-Val-Gly-His-Phe-Gly-Val-Tyr-Thr-
365 370 375

Arg-Val-Ser-Gln-Tyr-Ile-Glu-Trp-Leu-Gln-Lys-Leu-Met-Arg-Ser-Glu-Pro-Arg-
380 385 390 395

Pro-Gly-Val-Leu-Leu-Arg-Ala-Pro-Phe-Pro
400 405 406