

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 503 570**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2011** **E 11719041 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014** **EP 2563403**

54 Título: **Conjugado del factor de coagulación sanguíneo VIIA y PEG**

30 Prioridad:

30.04.2010 GB 201007356

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2014

73 Titular/es:

**CANTAB BIOPHARMACEUTICALS PATENTS
LIMITED (50.0%)**

**Palazzo Pietro Stiges, 103 Strait Street
Valletta VLT 1436, MT y**

POLYTHERICS LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

HENRY, WILLIAM

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 503 570 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

Conjugado del factor de coagulación sanguíneo VIIA y PEG

La presente invención se refiere a formas conjugadas del factor de coagulación sanguíneo humano VIIa.

El factor de coagulación sanguíneo VII (denominado en la presente FVII) es un zimógeno monocatenario, dependiente de la vitamina K, glucosilado de 53 000 dalton (Da), que contiene 12 enlaces disulfuro naturales (O'Hara *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:5158-5162 (1987)). La proteína se produce predominantemente en el hígado. FVII participa en la cascada de coagulación sanguínea extrínseca (Figura 1). La proteína está organizada en cuatro dominios discretos: un dominio γ -carboxiglutamato (Gla) en el extremo N, dos dominios de tipo factor de crecimiento epidérmico y un dominio serín proteasa en el extremo C. El zimógeno circulante muestra muy poca actividad proteasa en ausencia de su cofactor, el factor tisular (TF), que se encuentra en el subendotelio vascular. Tras el daño vascular, FVII se une a TF con una gran afinidad y se convierte en la enzima FVIIa bicatenaria y activa por escisión específica del enlace peptídico entre la arginina 152 y la isoleucina 153. La cadena ligera de FVIIa está compuesta por el Gla del extremo N y los dominios de tipo EGF y la cadena pesada está compuesta por el dominio serín proteasa. Las cadenas pesada y ligera se mantienen juntas por un enlace disulfuro único entre la cisteína 135 y la cisteína 262. Una vez activado, FVIIa cataliza rápidamente la conversión de FX en FXa y FIX en FIXa. A continuación, FXa forma un complejo con FVa para escindir la protrombina, lo que da como resultado la generación de pequeñas cantidades de trombina (Aitken, M. G. *EMA*, 16: 446-455 (2004)). Esta generación de trombina activa los trombocitos y los cofactores V, VIII y XI en la superficie de los trombocitos. La activación conduce a la formación rápida y en gran cantidad de trombina que provoca la polimerización de fibrina y la formación de un coágulo hemostático.

Novo Nordisk ha desarrollado y comercializado FVIIa recombinante humano como NovoSeven® (eptacog alfa [activado], código ATC B02BD08). NovoSeven®, autorizado para el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A o B que han desarrollado anticuerpos inhibidores contra FVIII o IX, respectivamente (Jurlander *et al.*, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 27: 373-383 (2001); Roberts *et al.*, *Blood*, 15: 3858-3864 (2004)). El tratamiento ha demostrado ser seguro y eficaz desde su lanzamiento en 1996. Sin embargo, debido a la semivida relativamente corta *in vivo* de las proteínas (2.3 horas; condiciones de aprobación de NovoSeven®, número de referencia de la FDA 96-0597) se requieren múltiples infusiones de dosis elevadas del producto (90 $\mu\text{g kg}^{-1}$) a lo largo del tiempo durante un episodio hemorrágico único con el fin de lograr la homeostasis. La semivida corta del producto y la dosis elevada requerida para obtener el efecto terapéutico deseado excluyen el uso habitual de NovoSeven® para el tratamiento profiláctico de los hemofílicos con inhibidores. Por lo tanto, claramente se necesitan desarrollar moléculas de FVIIa que tengan una semivida mayor, que produzcan mejoras en la farmacocinética (PK, por sus siglas en inglés) y farmacodinámica (PD, por sus siglas en inglés).

La conjugación de compuestos biofarmacéuticos con polímeros biocompatibles se ha utilizado previamente con éxito para mejorar las características fisicoquímicas de los productos. Las características de las proteínas terapéuticas que se han mejorado mediante la conjugación incluyen la PK, PD y la inmunogenicidad. La unión de un resto químico a una proteína puede incrementar significativamente su semivida de circulación (Jevsevar *et al.*, *Biotechnol. J.*, 5: 113-128 (2010)). Para las especies moleculares con pesos moleculares por debajo del límite de filtración glomerular la conjugación de un resto con un peso molecular elevado previene el aclaramiento renal del producto. Asimismo, la adición de restos químicos a productos farmacéuticos puede prevenir la eliminación mediada por el receptor de la molécula mediante el impedimento estérico.

Un ejemplo de un polímero biocompatible que se ha utilizado en varios productos biofarmacéuticos comercializados es el polietilenglicol (denominado en la presente PEG). El proceso de unión covalente de una molécula de PEG a otra molécula se denomina PEGilación. Hasta la fecha, nueve productos PEGilados han recibido la aprobación de comercialización de la FDA, donde cuatro son medicamentos supervalentes: PegIntron® (Schering-Plough), Pegasys® (Hoffman-La Roche), Neulasta® (Amgen) y Micera® (Hoffman-La Roche). Se han utilizado varias químicas diferentes para conjugar compuestos terapéuticos proteicos con moléculas de PEG activadas. La PEGilación aleatoria se ha utilizado con éxito para unir de manera covalente restos de PEG a proteínas a través de los grupos amino de las proteínas. Los sitios de unión han sido con frecuencia, pero no de manera exclusiva, el grupo amino ϵ de las cadenas laterales de los residuos de lisina. Tales reacciones aleatorias pueden producir mezclas muy complejas de conjugados con variaciones en el número y sitio de unión del resto de PEG. Incluso tras la purificación de reacciones de conjugación aleatorias, pueden estar presentes isómeros de posición que muestran características fisicoquímicas y farmacéuticas muy diferentes. Se han desarrollado varias técnicas de PEGilación específica respecto al sitio que se están aprovechando en la actualidad para producir compuestos biofarmacéuticos mejor definidos. Las estrategias que se adoptan para conseguir una PEGilación específica respecto al sitio incluyen la PEGilación dirigida al extremo N, cisteína, glicanos, disulfuros y polihistidina.

El estado de la técnica de la PEGilación de FVIIa recombinante está documentado en diferentes patentes y solicitudes de patentes:

El documento WO 98/32466 sugiere que FVII puede PEGilarse pero no contiene información adicional sobre el asunto.

El documento US 2008/0200651 sugiere que los polipéptidos de FVII con una actividad natural, o incrementada, que tienen una molécula de PEG conjugada mediante un residuo de cisteína introducido de manera artificial mostraron una semivida *in vivo* mayor.

El documento US 2008/0221032 describe la producción de un conjugado FVIIa-ácido polisialico que dio como resultado la molécula que mostró una semivida *in vivo* significativamente mayor.

El documento US 2009/0176967 menciona que las enzimas se pueden utilizar para introducir grupos funcionales específicos en el extremo C del polipéptido de FVII al cual se pueden acoplar polímeros biocompatibles tales como PEG.

El documento US 2009/0227504 describe preparaciones de FVIIa (o moléculas similares a FVIIa) donde una o más cadenas oligosacáridicas unidas a serina y/o a asparagina están modificadas covalentemente con al menos un grupo polimérico que muestra una semivida sérica mejorada.

El documento US 2010/0028939 describe cómo se puede modificar glucoproteínas naturales utilizando la enzima galactosa-oxidasa para producir funcionalidades aldehído reactivas en el extremo polisacárido. La reactividad de los aldehídos se puede utilizar a continuación para conjugar restos poliméricos a la proteína y generar un producto con características farmacológicas mejoradas.

El documento US 2010/0056428 sugiere que en FVIIa se pueden conseguir características farmacocinéticas mejoradas derivatizando la glucoproteína por una oxima de un resto polimérico tal como PEG en un grupo glucosílico.

El documento US 2010/0093934 menciona que la conjugación de restos poliméricos en factores de coagulación sanguíneos se puede conseguir más o menos uniendo en primer lugar el factor de coagulación a un anticuerpo, o anticuerpos, monoclonal que tenga afinidad por la proteína antes de hacerlo reaccionar con un polímero activado.

El documento US 2010/0099616 describe cómo los factores sanguíneos, incluido el FVIIa, se pueden producir con números pequeños (1-9) de polímeros hidrosolubles conjugados con ellos. Sin embargo, los autores no ejemplifican las características farmacológicas del FVIIa-PEGilado producido por este método.

Polytherics ha desarrollado otra estrategia para la PEGilación de proteínas y se conoce como TheraPEG™ en la cual se une un polímero de PEG a la proteína de interés mediante un enlace disulfuro reducido de un par de residuos de cisteína en la proteína (WO 2005/007197). La técnica se ha utilizado para preparar una versión PEGilada del factor IX exento de contaminación procedente del factor FIXa (WO 2009/130602).

Sin embargo, respecto a la utilización de esta misma tecnología para la PEGilación de FVIIa, no se ha considerado que sea sencilla o rutinaria.

Pese a que las proteínas en el sistema de coagulación sanguíneo pueden compartir un propósito común por lo que se refiere a la homeostasis, todas actúan de manera muy diferente hasta el punto de que no sería razonable asumir que la tecnología TheraPEG™ podría proporcionar una ruta obvia para mejorar la semivida y perfil inmunogénico de todas ellas. Las diferencias se resumen de este modo:

Desde el punto de vista de la actividad de FVIIa con respecto a FIX, existen ciertas diferencias cruciales que se traducen en que la conjugación de la proteína con un polímero biocompatible no es un paso directo a tomar.

Por ejemplo, aunque FIX y FIXa participan en la cascada de coagulación intrínseca, FVIIa participa principalmente en la cascada extrínseca. FIX una vez activado solamente necesita asociarse con su cofactor, FVIII, para participar en la cascada de coagulación. Por el contrario, FVIIa únicamente provocará coagulación en presencia del factor tisular (Tf), así que para que FVIIa sea activo en la coagulación debe tener la capacidad de unirse a Tf y también tener su sitio activo disponible para llevar a cabo la escisión peptídica. Se pensó que la PEGilación teórica de FVIIa utilizando TheraPEG™ era probable que afectara a la capacidad de la proteína para unirse a Tf e impedir estéricamente el sitio activo. Otras diferencias por lo que se refiere a su actividad biológica son que FIXa es intrínsecamente inmunogénico pero FVIIa no lo es.

FVIIa también puede provocar coagulación interaccionando directamente con trombocitos activados. Este proceso concreto se comprende peor pero podría conllevar una asociación adicional con el sitio del receptor. A este efecto, FVIIa podría requerir en principio tres sitios de interacción con sus ligandos diana, todo lo cual puede verse alterado por la PEGilación. Por lo tanto, la PEGilación del factor VIIa presenta varios desafíos únicos y diferentes que son evidentes y diferentes de los de FIX.

Sin embargo, se siguen necesitando moléculas de FVIIa mejoradas que tengan polímeros biocompatibles conjugados con el polipéptido de modo específico respecto al sitio para prolongar la semivida de FVIIa *in vivo*, a la vez que mantengan la actividad funcional, en comparación con el FVIIa no modificado u otros compuestos terapéuticos de FVIIa conocidos en la técnica.

- 5 Se ha descubierto que las propiedades farmacológicas del FVIIa recombinante se pueden potenciar conjugando FVIIa con uno o más polímeros biocompatibles. Las propiedades farmacológicas potenciadas incluyen un aumento de la semivida de circulación *in vivo* cuando se compara con el FVIIa no conjugado.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un polímero biocompatible conjugado con FVIIa mediante uno o más residuos de cisteína.

- 10 El polímero biocompatible se selecciona a partir del grupo constituido por polietilenglicol (PEG). El polímero biocompatible puede tener una estructura lineal o ramificada.

Si se desea, se pueden conjugar uno o más polímeros biocompatibles a cada molécula de FVIIa mediante uno o más residuos de cisteína de la manera definida en la reivindicación 1. Un residuo de cisteína libre es el resultado de reducir un enlace disulfuro de cistina. El polímero biocompatible de la invención se conjuga con FVIIa por medio de un grupo conector que hace de puente entre los residuos de azufre de dos residuos de cisteína que formaban un enlace disulfuro en FVIIa. El enlace disulfuro puede, por lo tanto, ser un enlace disulfuro natural o un enlace disulfuro introducido recombinantemente.

- 15 El polímero biocompatible es una molécula de PEG de cualquier peso molecular adecuado, por ejemplo, de 5 a 100 kDa, de 10 a 500 kDa, convenientemente de 5 a 30 kDa o de 10 a 30 kDa. Algunos pesos moleculares adecuados incluyen 10, 20 o 30 kDa.

Existen varios tipos diferentes de polímeros de polietilenglicol que formarán conjugados con FVIIa. Existen polímeros de PEG lineales que contienen una única cadena de polietilenglicol y existen polímeros de PEG ramificados o con varios brazos. El polietilenglicol ramificado contiene 2 o más cadenas de PEG lineales separadas unidas entre sí mediante un grupo unificante. Por ejemplo, dos polímeros de PEG se pueden unir entre sí por un residuo de lisina. Una cadena de PEG lineal se une al grupo amino α , mientras que la otra cadena de PEG se une al grupo amino ϵ . El grupo carboxilo restante del núcleo de lisina se deja disponible para la unión covalente a una proteína. Tanto los polímeros de polietilenglicol lineales como los ramificados se comercializan en un intervalo de pesos moleculares.

- 25 En un aspecto de la invención, un conjugado FVIIa-PEG contiene uno o más polímeros de polietilenglicol lineales unidos a FVIIa, donde cada PEG tiene un peso molecular comprendido entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa. En otro aspecto de la invención, un conjugado FVIIa-PEG contiene uno o más polímeros de polietilenglicol lineales unidos a FVIIa, donde cada PEG lineal tiene un peso molecular comprendido entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 40 kDa. En ciertas realizaciones, cada PEG lineal tiene un peso molecular comprendido entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 30 kDa. En ciertas realizaciones, cada PEG lineal tiene un peso molecular que es aproximadamente 20 kDa. En ciertas realizaciones, cada PEG lineal tiene un peso molecular que es menos de aproximadamente 10 kDa. En realizaciones particulares, donde el conjugado FVIIa-PEG contiene más de un polímero de PEG lineal unido a FVIIa, por ejemplo, dos, tres o hasta ocho polímeros de PEG lineales unidos a FVIIa. En algunas realizaciones, los conjugados FVIIa-PEG contienen múltiples polímeros de PEG lineales, donde cada PEG lineal tiene un peso molecular de aproximadamente 10-30 kDa.

- 30 Un conjugado FVIIa-PEG de esta invención puede contener uno o más polímeros de PEG ramificados unidos a FVIIa, donde cada PEG ramificado tiene un peso molecular comprendido entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa. En otro aspecto de la invención, un conjugado FVIIa-PEG contiene uno o más polímeros de polietilenglicol ramificados unidos a FVIIa, donde cada PEG ramificado tiene un peso molecular comprendido entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 40 kDa. En ciertas realizaciones, cada PEG ramificado tiene un peso molecular comprendido entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 30 kDa. En ciertas realizaciones, cada PEG ramificado tiene un peso molecular que es aproximadamente 20 kDa. En ciertas realizaciones, cada PEG ramificado tiene un peso molecular que es menos de aproximadamente 10 kDa. En realizaciones particulares, donde el conjugado FVIIa-PEG contiene más de un polímero de PEG ramificado unido a FVIIa, por ejemplo, dos, tres o hasta ocho polímeros de PEG ramificados unidos a FVIIa. En algunas realizaciones, los conjugados FVIIa-PEG contienen hasta ocho polímeros de PEG ramificados, donde cada PEG ramificado tiene un peso molecular de aproximadamente 10-30 kDa.

Los conjugados FVIIa-PEG se pueden purificar por métodos cromatográficos conocidos en la técnica, incluidas la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, precipitación y separaciones con membrana.

- 55 De manera conveniente, el resto polimérico biocompatible del conjugado FVIIa se puede unir a dos residuos de cisteína, que forman un enlace disulfuro en FVIIa. Por lo tanto, el conector que contiene PEG hace de puente en el enlace disulfuro. Algunos ejemplos de tales procedimientos de conjugación se describen en WO 2005/007197, WO

2009/047500, WO 2010/010324 y WO 2011/007148, así como en *Bioconjugate Chemistry* 2007, 18, 61-76 de Balan *et al.*

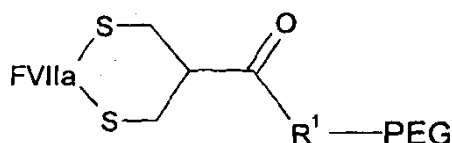
En una realización de la invención, se puede conjugar un polímero biocompatible con FVIIa de acuerdo con el esquema expuesto en la Figura 2. En la Figura 2, se muestra un grupo R1 entre el polímero biocompatible y el grupo conector que espacia los átomos de azufre del enlace disulfuro de la molécula FVIIa.

R1 representa un sustituyente que puede ser un enlace directo, un grupo alquileo (preferentemente un grupo alquileo C₁₋₁₀) o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; donde los grupos arilo incluyen grupos fenilo, benzoilo y naftilo; donde los grupos heteroarilo adecuados incluyen piridina, pirrol, furano, pirano, imidazol, pirazol, oxazol, piridazina, pirimidina y purina; donde la unión al polímero puede ser por medio de un enlace hidrolíticamente lábil o por un enlace no lábil.

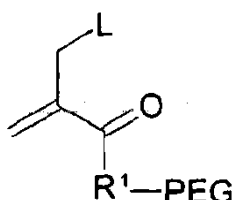
Los sustituyentes concretos que pueden estar presentes en el grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido incluyen, por ejemplo, uno o más de los mismos o diferentes sustituyentes seleccionados entre -CN, -NO₂, -CO₂R, -COH, -CH₂OH, -COR, -OR, -OCOR, -OCO₂R, -SR, -SOR, -SO₂R, -NHCOR, -NRCOR, -NHCO₂R, -NR'CO₂R, -NO, -NHOH, -NR'OH, -C=N-NHCOR, -C=N-NR'COR, -N⁺R₃, -N⁺H₃, -N⁺HR₂, -N⁺H₂R, halógeno, por ejemplo, flúor o cloro, -C≡CR, -C=CR₂ y ¹³C=CHR, donde cada R o R' representa independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (preferentemente C₁₋₆) o arilo (preferentemente fenilo). Se prefiere especialmente la presencia de sustituyentes atractores de electrones. En una realización el grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido en R1 incluye grupos arilo o heteroarilo sustituidos con un grupo amida (NHCO) que conecta la unidad R1 al polímero biocompatible.

El grupo conector entre los dos átomos de azufre del enlace disulfuro original entre los residuos de cisteína de FVIIa puede, por lo tanto, comprender un puente de 3 carbonos. En una realización, el grupo conector entre los dos átomos de azufre del enlace disulfuro original entre los residuos de cisteína de FVIIa es (CH₂)₂CHC(O)-.

En una realización, el polímero biocompatible puede conjugarse tal como se ha descrito anteriormente y el FVIIa conjugado con un polímero biocompatible tiene la siguiente estructura:



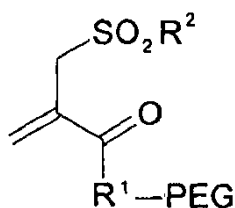
En el sentido más amplio de la invención, el reactivo puede representarse como:



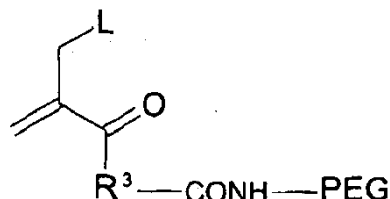
Donde R1 es tal como se ha definido anteriormente y L es un grupo saliente.

L puede representar -SR, -SO₂R, -OSO₂R, -N⁺R₃, -N⁺H₂, -N⁺H₂R, halógeno (por ejemplo, flúor o cloro) o -OW, donde cada R representa independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (por ejemplo, alquilo C₁-C₆) o arilo (por ejemplo, fenilo) y W representa un grupo arilo sustituido (por ejemplo, fenilo) que contiene al menos un sustituyente atractor de electrones, por ejemplo, uno o más de los mismos o diferentes sustituyentes seleccionados entre -CN, -NO₂, -CO₂R, -COH, -CH₂OH, -COR, -OR, -OCOR, -OCO₂R, -SR, -SOR, -SO₂R, -NHCOR, -NRCOR, -NHCO₂R, -NR'CO₂R, -NO, -NHOH, -NR'OH, -C=N-NHCOR, -C=N-NR'COR, -N⁺R₃, -N⁺H₃, -N⁺HR₂, -N⁺H₂R, halógeno, por ejemplo, flúor o cloro, -C=CR, -C=CR₂ y ¹³C=CHR, donde cada R o R' representa independientemente un átomo de hidrógeno o un alquilo (preferentemente C₁₋₆).

En una realización, el grupo saliente L es SO₂R², en el cual cada R2 representa independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (por ejemplo, alquilo C₁-C₆) o arilo (por ejemplo, fenilo) y R1 es tal como se ha definido anteriormente, donde el reactivo de conjugación puede tener la siguiente fórmula:



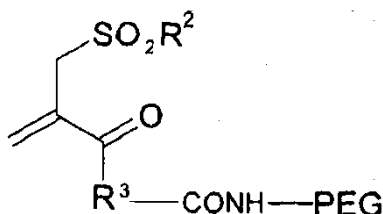
En otra realización de la invención, el reactivo de conjugación se puede formar a partir de una disposición específica en la cual el polímero biocompatible se conecta mediante un resto amida (CONH), donde L es un grupo saliente tal como se ha definido anteriormente. Dicho de otro modo, R1 es R3-CONH y el reactivo tiene la siguiente fórmula:



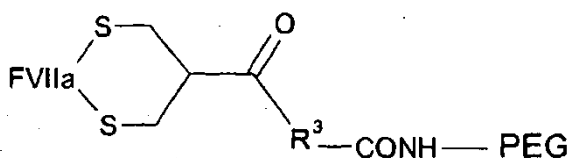
R3 representa un sustituyente que puede ser un enlace directo, un grupo alquileo (preferentemente un grupo alquileo C₁₋₁₀) o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; donde los grupos arilo incluyen grupos fenilo, benzoilo y naftilo; donde los grupos heteroarilo adecuados incluyen piridina, pirrol, furano, pirano, imidazol, pirazol, oxazol, piridazina, pirimidina y purina; donde la unión al polímero puede ser por medio de un enlace hidrolíticamente lábil o por un enlace no lábil.

Los sustituyentes concretos que pueden estar presentes en el grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido incluyen, por ejemplo, uno o más de los mismos o diferentes sustituyentes seleccionados entre -CN, -NO₂, -CO₂R, -COH, -CH₂OH, -COR, -OR, -OCOR, -OCO₂R, -SR, -SOR, -SO₂R, -NHCOR, -NRCOR, -NHCO₂R, -NR'CO₂R, -NO, -NHOH, -NR'OH, -C=N-NHCOR, -C=N-NR'COR, -N⁺R₃, -N⁺H₃, -N⁺HR₂, -N⁺H₂R, halógeno, por ejemplo, flúor o cloro, -C≡CR, -C=CR₂ y ¹³C=CHR, donde cada R o R' representa independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (preferentemente C₁₋₆) o arilo (preferentemente fenilo). Se prefiere especialmente la presencia de sustituyentes atractores de electrones.

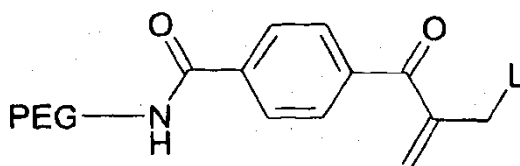
En las realizaciones donde el resto CONH está presente, R2 y R3 son tal como se han definido anteriormente, y cuando el grupo saliente L es -SO₂R² el reactivo es tal como sigue:



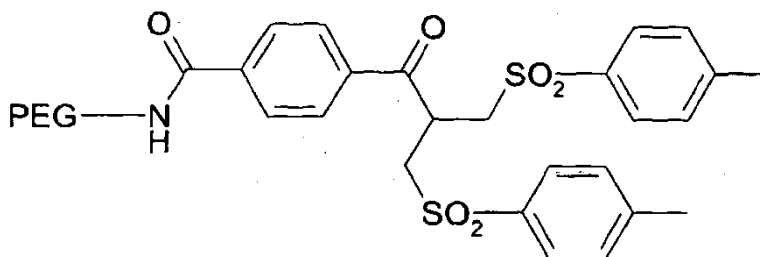
En este tipo de realizaciones donde el grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido en R1, tal como se ha definido anteriormente, del reactivo de conjugación incluye grupos arilo o heteroarilo sustituidos con un grupo amida (NHCO), la estructura de la proteína conjugada, donde R3 es tal como se ha definido anteriormente, puede ser tal como sigue:



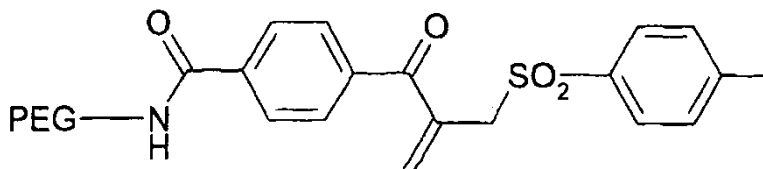
El reactivo de conjugación en esta realización de la invención, donde L es un grupo saliente, tal como se ha definido anteriormente, es tal como sigue:



Cuando las condiciones de reacción son neutras o ligeramente básicas entonces se puede utilizar el siguiente reactivo:



- 5 En condiciones más ácidas, el reactivo anterior puede formar la siguiente molécula que se muestra a continuación, PEG monosulfona, que también es adecuada para su uso en reacciones de conjugación tal como se describe en la presente.



- 10 Tal como se emplean en la presente, las expresiones “factor VIIa conjugado” o “FVIIa conjugado” se refieren al factor VIIa que se ha modificado para incluir un resto polimérico biocompatible que da como resultado un perfil farmacocinético mejorado en comparación con el factor VIIa no modificado. La mejora en el perfil farmacocinético se puede observar como una mejora en uno o más de los siguientes parámetros: actividad, estabilidad, área bajo la curva y semivida de circulación.

- 15 El factor VIIa puede proceder de cualquier fuente adecuada. Se puede producir utilizando tecnología de ADN recombinante o se puede purificar a partir de plasma sanguíneo. Incluye cualquier muteína o fragmento activo de este.

- 20 Tal como se emplea en la presente, el término “muteínas” se refiere a análogos de una proteína de FVIIa, en los cuales uno o más de los residuos aminoácidos de los componentes presentes de manera natural en FVIIa se reemplazan con residuos aminoácidos diferentes, o se eliminan, o se añaden uno o más residuos aminoácidos a la secuencia original de FVIIa, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con el FVIIa original. Estas muteínas se preparan mediante técnicas de mutagénesis dirigida y/o síntesis conocidas, o cualquier otra técnica adecuada.

- 25 Las muteínas de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida con ADN o ARN, que codifica un FVIIa, de acuerdo con la presente invención, en condiciones rigurosas. La expresión “condiciones rigurosas” se refiere a las condiciones de hibridación y lavado posterior, a las que los expertos en la técnica se refieren convencionalmente como “rigurosidad” (Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Interscience, N.Y., secciones 63 y 6.4 (1987, 1992); Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y (1989)).

- 30 Los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado 12-20 °C por debajo de la T_m calculada del híbrido que se está estudiando en, p. ej., 2xSSC y un 0.5% de SDS durante 5 minutos, 2xSSC y un 0.1% de SDS durante 15 minutos; 0.1.veces.SSC y un 0.5% de SDS a 37°C durante 30-60 minutos y a continuación, 0.1xSSC y un 0.5% de SDS a 68°C durante 30-60 minutos. Los expertos en la técnica sobreentenderán que las condiciones de rigurosidad también dependerán de la longitud de las secuencias de ADN, sondas oligonucleotídicas (tales como de 10-40 bases) o sondas oligonucleotídicas mixtas. Si se utilizan sondas mixtas, es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC.

Cualquier muteína de este tipo tiene preferentemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de

la de un FVIIa, tal como para tener una actividad sustancialmente similar, o incluso mejor, respecto a FVIIa.

Una actividad característica de FVIIa es su capacidad para participar en la cascada de coagulación sanguínea y en la presente se describen ensayos para detectar la actividad de FVIIa. Mientras la muteína tenga una actividad de FVIIa sustancial, se puede considerar que tiene una actividad sustancialmente similar a FVIIa. Por lo tanto, se puede

5 determinar si una muteína dada tiene al menos sustancialmente la misma actividad que FVIIa por medio de la experimentación habitual que comprende someter una muteína de este tipo a ensayos como los descritos en la presente.

En una realización preferida, cualquier muteína de este tipo tiene al menos un 40% de identidad y homología con la secuencia de aminoácidos de FVIIa. Más preferentemente, tiene al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un

10 70%, al menos un 80% o, más preferentemente, al menos un 90%, un 95% o un 99% de identidad u homología con ella.

La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas, o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinadas comparando las secuencias. En general, la identidad se refiere, respectivamente, a una correspondencia exacta de un nucleótido respecto a un nucleótido o de un aminoácido respecto a un

15 aminoácido de las dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas a lo largo de la longitud de las secuencias que se están comparando.

En el caso de las secuencias en las que no hay una correspondencia exacta, se puede determinar una "identidad porcentual". En general, las dos secuencias que se van a comparar se alinean para proporcionar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "huecos" en una o en ambas secuencias, para mejorar el

20 grado de alineamiento. Se puede determinar una "identidad porcentual" a lo largo de toda la longitud de cada una de las secuencias que se están comparando (la denominada alineación global) que es particularmente adecuada para secuencias de una longitud igual o muy similar, o a lo largo de longitudes definidas más cortas (la denominada alineación local), que es más adecuada para secuencias con una longitud diferente.

Los métodos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son muy conocidos en la técnica. Por lo tanto, por ejemplo, programas disponibles en el paquete de análisis de secuencias Wisconsin, versión 9.1 (Devereux, *et al.*, *Nucleic acids Research*, 12: 387 (1984)), por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP, se pueden

25 utilizar para determinar la identidad porcentual entre dos polinucleótidos y la identidad porcentual y la homología porcentual entre dos secuencias polipeptídicas. BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (*Advances in Applied Mathematics*, 2; 482-489 (1981)) y encuentra la mejor región única de similitud entre dos secuencias. También se conocen en la técnica otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias, por ejemplo, la familia BLAST de programas (Atschul *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 215: 403 (1990), al que se puede acceder mediante la página de inicio de NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R, *Methods in Enzymology*, 183: 63-98 (1990)).

Las muteínas de FVIIa, que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos de sustitución que se pueden obtener de manera

35 rutinaria por el experto en la técnica sin una experimentación excesiva, partiendo del contenido y guía que se proporcionan en la presente.

Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente invención son los que se conocen como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de FVIIa pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tengan unas propiedades fisicoquímicas lo suficientemente similares

40 de modo que la sustitución entre miembros del grupo conservará la función biológica de la molécula. Está claro que las inserciones y eliminaciones de aminoácidos también se pueden efectuar en las secuencias mencionadas anteriormente sin alterar su función, particularmente si las inserciones o eliminaciones implican únicamente a unos pocos aminoácidos, p. ej., menos de treinta, y preferentemente menos de diez, y no eliminan o desplazan

45 aminoácidos que son cruciales para una conformación funcional, p. ej., residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas generadas por este tipo de eliminaciones y/o inserciones están englobadas en el alcance de la presente invención.

Por lo tanto, los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina se pueden sustituir a menudo unos por otros (aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas). De estas sustituciones posibles se prefiere utilizar la glicina y alanina para sustituir la una por la otra (ya que tienen unas cadenas laterales relativamente cortas) y que la

50 valina, leucina e isoleucina se utilicen para sustituir las unas por las otras (ya que tienen cadenas laterales alifáticas más grandes que son hidrófobas). Otros aminoácidos que se pueden sustituir a menudo unos por otros incluyen: fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas); lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas); aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas); asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales con amida); y cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre). Las sustituciones de este tipo se denominan a menudo como sustituciones de aminoácidos "conservadoras" o "semiconservadoras".

Los cambios de aminoácidos respecto a la secuencia de la proteína de fusión de la invención se pueden realizar utilizando cualquier técnica adecuada, p. ej., utilizando mutagénesis dirigida.

Se entenderá que las sustituciones o inserciones de aminoácidos englobadas en el alcance de la presente invención se pueden realizar utilizando aminoácidos presentes de manera natural o no presentes de manera natural. Tanto si se utilizan aminoácidos sintéticos o naturales como si no, se prefiere que únicamente estén presentes los aminoácidos L.

Además, también se pueden utilizar proteínas de fusión que comprendan FVIIa y otro péptido o fragmento de proteína siempre que la proteína de fusión retenga la actividad de FVIIa. La expresión "proteína de fusión" en este texto se refiere, en términos generales, a una o más proteínas unidas entre sí por medios químicos que incluyen puentes de hidrógeno o puentes salinos, o por enlaces peptídicos mediante síntesis de proteínas o ambos.

Los "derivados funcionales" tales como se emplean en la presente abarcan derivados de FVIIa y sus muteínas, que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales que están presentes como cadenas laterales de los residuos o que son adiciones a los grupos de los extremos N o C, por medios conocidos en la técnica y que se incluyen en la invención siempre que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de FVIIa y no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contengan.

Estos derivados, por ejemplo, pueden incluir ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxílicos por reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acilo de grupos amino libres de los residuos aminoácídicos formados con restos acilo (p. ej., grupos alcanóilo o aroilcarboxílicos) o derivados O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de los residuos serilo o treonilo) formados con restos acilo, incluidos, por ejemplo, la glucosilación de residuos hidroxilo disponibles.

Un "fragmento activo de FVIIa" de acuerdo con la presente invención puede ser un fragmento de FVIIa o una muteína tal como se han definido en la presente. El término fragmento se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, es decir, un péptido más corto que retiene la actividad biológica deseada. Los fragmentos se pueden preparar fácilmente eliminando aminoácidos de cualquier extremo de la molécula FVIIa y estudiando el fragmento resultante para determinar sus propiedades tal como se ha descrito en la presente. Se conocen proteasas para eliminar un aminoácido de cada vez tanto del extremo N como del extremo C de un polipéptido y, por lo tanto, la determinación de fragmentos que retienen la actividad biológica deseada conlleva únicamente la experimentación habitual.

Como fracciones activas de un FVIIa, muteínas y fragmentos activos de este, la presente invención además abarca cualquier fragmento o precursores de la cadena polipeptídica de la molécula proteica sola o junto con moléculas asociadas o residuos unidos a ella, p. ej., residuos de fosfato o azúcar, o agregados de la molécula proteica o los residuos de azúcar por si solos, siempre que dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a FVIIa.

El término "sales" en la presente se refiere tanto a las sales de grupos carboxilo como a las sales de adición con un ácido de grupos amino de la molécula de FVIIa. Las sales de un grupo carboxilo se puede formar por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, hierro o cinc y sales con bases orgánicas como aquellas formadas, por ejemplo, con aminas tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína. Las sales de adición con un ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de estas sales debe retener la actividad biológica de FVIIa tal como se ha descrito en la presente.

Los conjugados de FVIIa pueden proporcionar beneficios terapéuticos, por ejemplo, cuando se comparan con FVIIa no conjugado. Tales efectos terapéuticos incluyen un incremento en la semivida de circulación, reducción de la inmunogenicidad, mayor actividad, mejor estabilidad, incremento del área bajo la curva, menores requisitos de dosis y permite rutas alternativas de administración (p. ej., subcutánea).

En comparación con FVIIa no modificado, los conjugados de FVIIa de la invención pueden mostrar una mejora en uno o más parámetros del perfil farmacocinético, incluida el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés), $C_{\max}$, aclaramiento (CL), semivida, tiempo de residencia plasmático y biodisponibilidad en comparación con el FVIIa no modificado.

El "área bajo la curva" o "AUC", tal como se emplea en la presente en el contexto de la administración de un fármaco peptídico a un paciente, se define como el área total bajo la curva que describe la concentración de un fármaco en circulación sistémica en el paciente en función del tiempo desde cero hasta el infinito. Tal como se emplea en la presente, el término "aclaramiento" o "aclaramiento renal" se define como el volumen de plasma que contiene la cantidad de fármaco excretado por minuto.

Tal como se emplea en la presente, el término "semivida" o " $t_{1/2}$ " en el contexto de la administración de un fármaco

peptídico a un paciente se define como el tiempo requerido para que la concentración plasmática de un fármaco en un paciente se reduzca a la mitad. Puede haber más de una semivida asociada con el fármaco peptídico que dependa de múltiples mecanismos de aclaramiento, redistribución y otros mecanismos conocidos en la técnica. Normalmente, las semividas alfa y beta se definen de modo que la fase alfa se asocie con la redistribución y la fase beta se asocie con el aclaramiento. Sin embargo, con los fármacos proteicos que están, en su mayor parte, confinados en el torrente sanguíneo, puede haber al menos dos semividas de aclaramiento. El impacto preciso de la PEGilación sobre las semividas de la fase alfa y la fase beta variará dependiendo del tamaño y otros parámetros, como es bien sabido en la técnica. Una explicación adicional de la "semivida" se puede encontrar en Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin y RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Amsterdam, págs. 101-120).

Tal como se emplea en la presente, la expresión "tiempo de residencia" en el contexto de la administración de un fármaco peptídico a un paciente se define como el tiempo promedio que el fármaco permanece en el cuerpo del paciente tras la administración de la dosis.

Tal como se emplea en la presente, el término "inmunogenicidad" en el contexto de la administración de un fármaco peptídico a un paciente se define como la propensión de ese fármaco a suscitar una respuesta inmunitaria en el paciente tras la administración de la dosis o tras la administración repetida de la dosis.

De acuerdo con la presente invención, la conjugación de FVIIa con un polímero biocompatible mejora la utilidad de FVIIa en las composiciones farmacéuticas. Además, el resto biocompatible puede proteger FVIIa de la degradación y respuesta de anticuerpos. Los conjugados de FVIIa pueden tener una semivida de circulación prolongada, que da como resultado un efecto de ahorro del fármaco y una administración menos frecuente.

Tal como se ha discutido anteriormente, PolyTherics ha desarrollado una tecnología, conocida como TheraPEG™ que puede aprovechar la química selectiva de átomos de azufre presentes de forma natural en proteínas para la PEGilación específica respecto al sitio. La tecnología también se puede aplicar a proteínas y péptidos donde se han introducido grupos novedosos que contienen azufre por recombinación u otros medios. PolyTherics ha mostrado que los enlaces disulfuro se pueden hacer más estables mediante la adición de un puente de carbono unido a PEG y que es posible realizar una modificación de este tipo en los enlaces disulfuro en proteínas a la vez que se retiene la estructura terciaria y se mantiene la función proteica. Esto ha hecho posible por primera vez aprovechar la selectividad del tiol de conjugación de los dos átomos de azufre que constituyen un enlace disulfuro para conjugar polímeros biocompatibles con una proteína de interés con especificidad respecto al sitio tanto en las proteínas naturales como las modificadas selectivamente. Un ejemplo de esta estrategia es utilizar la tecnología para añadir restos de PEG a una proteína de FVIIa (o "PEGilar" la proteína FVIIa).

El reactivo de conjugación que hace de puente en el disulfuro es un sistema con una conjugación cruzada latente capaz de experimentar reacciones interactivas de Michael y retro-Michael. Esto hace posible que los dos tioles libres generados por la reducción de un grupo disulfuro natural experimenten otra anelación a través de un puente de 3 carbonos que une los dos grupos de azufre del enlace disulfuro original (por ejemplo, remítase a la Figura 2 para una representación esquemática de la reacción de conjugación para añadir un resto de PEG). El reactivo de conjugación se puede describir como un reactivo de "PEGilación" cuando comprende PEG como el polímero biocompatible utilizado para PEGilar la proteína FVIIa.

Mecanicamente, se requiere un doble enlace conjugado en el reactivo de conjugación para iniciar una secuencia de reacciones de adición. Una vez que tiene lugar la adición del tiolato, se hace posible la eliminación del resto de ácido sulfínico restante. Esto genera otro doble enlace conjugado para la adición de un segundo anión tiolato y la formación de un puente de 3 carbonos entre los dos átomos de azufre. El final da como resultado dos enlaces de tipo tioéter muy estables en ambos lados del puente de carbono.

El hecho de que la PEGilación de FIX que emplea la tecnología TheraPEG™ fuera un éxito no constituye una indicación del éxito o no de la preparación de FVIIa PEGilado utilizando la misma estrategia ya que es una proteína estructural y funcionalmente diferente. Es muy sorprendente, por lo tanto, que el FVIIa PEGilado preparado utilizando la tecnología TheraPEG™ funcione tan bien en los experimentos *in vivo*.

Además, los ensayos de coagulación de punto final *in vitro* llevados a cabo sugieren que las preocupaciones anteriores relacionadas con los múltiples requisitos de asociación de FVIIa estaban bien fundados ya que la actividad fue baja. Sorprendentemente, fue únicamente mediante la utilización de un ensayo diferente en función de la velocidad que los presentes inventores obtuvieron la seguridad de que el ensayo de actividad de FVIIa "habitual" estaba subestimando la actividad y por lo tanto los estudios progresaron hasta los experimentos *in vivo*.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un polímero biocompatible conjugado con FVIIa tal como se define en la reivindicación 1.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender además un portador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptables.

- Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos; o como batidos o espumas comestibles; o como emulsiones). Los excipientes adecuados para los comprimidos o cápsulas de gelatina duras incluyen lactosa, almidón de maíz o derivados de estos, ácido esteárico o sales de este. Los excipientes adecuados para utilizar con cápsulas de gelatina blandas incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles líquidos o semisólidos, etc. Para la preparación de soluciones y jarabes, los excipientes que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, agua, polioles y azúcares. Para la preparación de suspensiones se pueden utilizar aceites (p. ej., aceites vegetales) para proporcionar suspensiones de aceite en agua o agua en aceite.
- Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración nasal donde el portador es un sólido incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula comprendido, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrones que se administra de la misma manera en la que se toma el rapé, es decir, mediante una inhalación rápida mediante el conducto nasal desde un recipiente del polvo que se mantiene cerca de la nariz. Las composiciones adecuadas en las que el portador es un líquido, para la administración como un spray nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración por inhalación incluyen nebulizados o polvos de partículas finas que se pueden generar por medios de diversos tipos de insufladores, nebulizadores o aerosoles presurizados con una dosis medida.
- Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen una solución para inyección estéril no acuosa y acuosa que puede contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que convierten la formulación en sustancialmente isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los excipientes que se pueden utilizar para las soluciones inyectables incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las composiciones pueden presentarse en envases multidosis o de dosis unitaria, por ejemplo, viales y ampollas sellados, y se pueden almacenar en un estado de criodesecación (liofilización) que requiera únicamente la adición del líquido estéril portador, por ejemplo, agua para inyecciones, justo antes de su uso. Las suspensiones y soluciones para inyección improvisadas se pueden preparar a partir de comprimidos, gránulos y polvos estériles.
- En general, las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes conservantes, agentes solubilizantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, endulzantes, colorantes, odorizantes, sales (las propias sustancias de la presente invención se pueden proporcionar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable), tampones, agentes de recubrimiento o antioxidantes. También pueden contener agentes terapéuticamente activos además de la sustancia de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden emplear combinadas con diluyentes, adyuvantes o portadores farmacéuticamente aceptables. Este tipo de excipientes pueden incluir solución salina, solución salina tamponada (tal como solución salina tamponada con fosfatos), dextrosa, liposomas, agua, glicerol, etanol y combinaciones de estos.
- Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de cualquier modo eficaz y conveniente que sea eficaz para tratar una enfermedad del paciente que incluye, por ejemplo, la administración por vía oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraósea, intranasal entre otras. En la terapia o como un agente preventivo, el agente activo se puede administrar a un individuo como una composición inyectable, por ejemplo, como una dispersión acuosa estéril, preferentemente isotónica.
- Para la administración a mamíferos, y en concreto seres humanos, se espera que la dosis diaria del agente activo esté comprendida entre 0.01 mg/kg de peso corporal, normalmente aproximadamente 1 mg/kg. En cualquier caso el médico determinará la dosis concreta que será más adecuada para un individuo que dependerá de factores que incluyen la edad, peso, sexo y respuesta del individuo. Las dosis anteriores son ilustrativas de un caso promedio. Puede haber casos, por supuesto, donde sean necesarias dosis más altas o más bajas, y estas están incluidas en el alcance de esta invención.
- Las dosis de la sustancia de la presente invención pueden variar entre límites amplios, dependiendo de la enfermedad o trastorno que se va a tratar, la edad y estado del individuo que se va a tratar, etc. y un médico determinará en última instancia la dosis apropiada que se va de utilizar.
- Esta dosis se puede repetir tan a menudo como sea necesario. Si se desarrollan efectos secundarios se puede reducir la cantidad y/o frecuencia de la dosis, de acuerdo con la práctica clínica normal. En una realización, la composición farmacéutica se puede administrar una vez cada 1-14 días.
- De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica del conjugado de la reivindicación 1 y otro agente farmacéuticamente activo. El otro agente farmacéuticamente activo puede estimular o potenciar la actividad de FVIIa, por ejemplo, otro factor de coagulación sanguíneo.
- La composición farmacéutica de la invención se puede emplear sola o junto con otros compuestos tales como moléculas o compuestos terapéuticos, p. ej., fármacos antiinflamatorios, analgésicos o antibióticos. Este tipo de administración con otros compuestos puede ser simultánea, por separado o secuencial. Los componentes se

pueden preparar en forma de un kit que puede comprender instrucciones según sea apropiado.

Preferentemente, la composición farmacéutica de la invención y el otro compuesto terapéutico se administran directamente a un paciente que lo necesite.

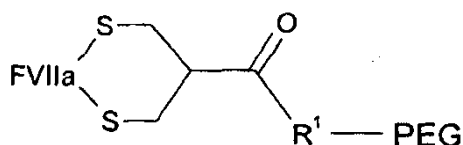
5 La invención también proporciona un kit de partes que comprenden una composición farmacéutica de la invención, y un vehículo de administración que incluye cápsulas para la administración oral, inhaladores para la administración pulmonar y soluciones inyectables para la administración intravenosa.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad de la coagulación sanguínea o traumatismo donde el método comprende la administración de una composición de dicho conjugado a un paciente que lo necesite. Por lo tanto, este aspecto de la invención también incluye composiciones de este tipo para su uso en dichos métodos.

Las enfermedades de la coagulación sanguínea se pueden caracterizar por una pérdida de la función de un factor de coagulación sanguíneo, o la generación de autoanticuerpos. Los ejemplos de enfermedades de la coagulación sanguínea incluyen la hemofilia A y la hemofilia B.

15 Tal como se emplea en la presente, el término "tratamiento" incluye cualquier pauta terapéutica que pueda beneficiar a un animal humano o no humano. El tratamiento de "animales no humanos" se extiende al tratamiento de animales domésticos, incluidos los caballos y animales de compañía (p. ej., gatos y perros) y animales de granja/agrícolas incluidos los miembros de las familias ovina, caprina, porcina, bovina y equina. El tratamiento puede estar en relación con cualquier afección o trastorno existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede ser de una enfermedad heredada o adquirida. El tratamiento puede ser de una afección aguda o crónica.

20 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un proceso para preparar el siguiente conjugado de un polímero biocompatible y FVIIa tal como se ha descrito anteriormente,

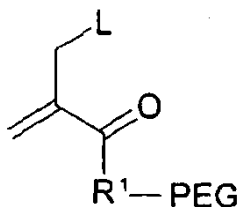


donde el proceso comprende:

- 25 (a) la reducción de un enlace disulfuro natural entre dos residuos de cisteína en FVIIa para generar dos grupos tiol libres;
- (b) una primera reacción de adición del tiolato entre un reactivo de conjugación que comprende un doble enlace conjugado y un grupo saliente;
- (c) la eliminación del grupo saliente, para generar un doble enlace conjugado; y
- 30 (d) una segunda reacción de adición del tiolato, para formar un puente de 3 carbonos entre los dos átomos de azufre

donde R1 es tal como se ha definido anteriormente.

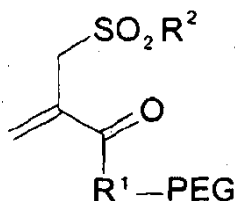
En un proceso de este tipo, el reactivo de conjugación puede tener la fórmula, tal como se ha descrito anteriormente, de:



35 donde R1 es tal como se ha definido anteriormente y L es un grupo saliente tal como se ha definido anteriormente.

Los aspectos adicionales de esta realización de la invención son tal como se han descrito anteriormente en relación con las diversas estructuras del reactivo de conjugación.

Un ejemplo de un reactivo de conjugación que se puede utilizar, con sustituyentes R1 y R2 tal como se han definido anteriormente, es tal como sigue:



en el cual el grupo saliente es un grupo sulfinilo representado por SO_2R^2 , tal como se ha definido anteriormente.

La presente invención se describirá a continuación adicionalmente haciendo referencia a los siguientes Ejemplos.

En la presente descripción y Ejemplos también se hace referencia a varias Figuras, en las cuales:

- 5 La FIGURA 1 muestra la cascada de coagulación sanguínea. Abreviaturas: HMWK – kininógeno de alto peso molecular; PK – prekalikreína; PL – fosfolípido.
- La FIGURA 2 muestra los pasos implicados en la química de conjugación de un biopolímero específica respecto al disulfuro con la utilización de un reactivo de PEGilación como un ejemplo de un reactivo de conjugación (de Shaunak *et al.* en *Nat Chem Biol.* 2006; 2(6):312-313).
- 10 La FIGURA 3 muestra una SDS-PAGE que muestra FVIIa tras la reducción con DTT (recuadro A) o TCEP/SeCys (recuadro B).
- La FIGURA 4 muestra una SDS-PAGE teñida con Coomassie que muestra mezclas de la reacción de PEGilación de 10 kDa, 20 kDa y 30 kDa purificadas (carriles 3-5). En el carril 1 se muestra FVIIa y en el carril 2 se muestra FVIIa reducido.
- 15 La FIGURA 5 muestra una SDS-PAGE teñida con plata que muestra FVIIa mono-PEGilado de 10 kDa, 20 kDa y 30 kDa purificado.
- La FIGURA 6 muestra un diagrama esquemático de los pasos implicados en un ensayo de coagulación de PT. Las flechas indican eventos de amplificación mediados por trombina. Abreviaturas: HMWK – kininógeno de alto peso molecular; PK – prekalikreína; PL – fosfolípido.
- 20 La FIGURA 7 muestra una reducción dependiente de la concentración de los tiempos de coagulación de FVIIa PEGilado (a pequeña escala). Tampón (kit) coagulado a los 113 segundos.
- La FIGURA 8 muestra una reducción dependiente de la concentración de los tiempos de coagulación de FVIIa PEGilado (a gran escala). Tampón (kit) coagulado a los 115 segundos.
- 25 La FIGURA 9 muestra una reducción dependiente de la concentración de los tiempos de coagulación de FVIIa PEGilado (a gran escala, lote liofilizado). Tampón (kit) coagulado a 114 s.
- La FIGURA 10 muestra un diagrama esquemático de los pasos implicados en un ensayo cromogénico. Las flechas indican eventos de amplificación mediados por trombina e indican un efecto inhibitor.
- La FIGURA 11 muestra resultados representativos que muestran actividades dependientes de la dosis de FVIIa en tampón HEPES y FVIIa con benzamidina 20 mM.
- 30 La FIGURA 12 muestra un análisis por SDS-PAGE de la PEGilación TheraPEG™ de mezclas de reacción de FVIIa. Carril 1 marcadores de peso molecular Novex®; Carriles 2-5, mezclas de reacción de lotes PEG(20 kDa)-FVIIa 2 mg FVIIa, 3 mg FVIIa (2 mg de FVIIa y 3 mg de FVIIa respectivamente).
- La FIGURA 13 muestra un descenso dependiente de la concentración de los tiempos de coagulación de FVIIa PEGilado producido para un estudio de PK en ratas (4 lotes a-d).
- 35 La FIGURA 14 muestra los perfiles farmacocinéticos de FVIIa y PEGFVIIa según se miden *ex vivo* por ELISA en cuanto a la concentración de FVIIa humana ($\mu\text{g/mL}$) medido respecto al tiempo (horas).
- La FIGURA 15 muestra una comparación de la velocidad de la reacción de coagulación para FVIIa y FVIIa PEGilado.
- 40 La FIGURA 16 muestra dos estructuras esquemáticas alternativas de conjugados de la invención en los cuales FVIIa se representa mediante una línea curvada negra, (C) representa un residuo de cisteína de FVIIa y donde FVIIa se muestra conjugado por un conector a un polímero biocompatible tal como se describe en la presente.

La invención se describirá a continuación adicionalmente haciendo referencia a los siguientes Ejemplos que se presentan únicamente a efectos ilustrativos.

Ejemplo 1: PEGilación del disulfuro de FVIIa

5 La PEGilación del disulfuro del FVIIa humano recombinante (NoveSeven®) se llevó a cabo de acuerdo con una versión modificada del procedimiento descrito por Shaunak *et al.* en *Nat Chem Biol.* 2006; 2(6):312-313 y en Brocchini *et al.* en *Nature Protocols*, 2006; 1(5): 2241-2252.

Ejemplo 2: Reducción del enlace disulfuro

10 El proceso de PEGilación de TheraPEG™ requiere la reducción de enlaces disulfuro. Ya que FVIIa es un heterodímero formado por las cadenas ligera y pesada unidas por un disulfuro único, se llevó a cabo una investigación inicial de las condiciones de reducción para determinar si se podía llevar a cabo la reducción sin la escisión del disulfuro intercatenario. Se observó que la reducción con DTT en el intervalo 0.5-5 mM dio como resultado la reducción del disulfuro intercatenario para generar las cadenas pesada y ligera (Figura 3A). Sin embargo, la utilización de un ligero exceso molar del agente reductor tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), en presencia o ausencia de selenocistamina (SeCys), dio como resultado poca escisión, o ninguna en absoluto, del disulfuro intercatenario (Figura 3B). La presencia de disulfuros intracatenarios reducidos en estas condiciones se confirmó por la adición del reactivo PEG que reaccionó con los tioles de la cisteína para generar la especie PEGilada.

Ejemplo 3: PEGilación de FVIIa

20 La evaluación inicial del uso de TheraPEG™ para la PEGilación de FVIIa se llevó a cabo en reacciones a pequeña escala (10-20 µg de FVIIa). Esto permitió la identificación de las condiciones que se podían utilizar para preparar de manera reproducible FVIIa mono-PEGilado utilizando 2 equivalentes molares del reactivo PEG. El efecto de añadir benzamidina para prevenir la proteólisis se investigó en los primeros experimentos. Se observó que esto no tenía efecto sobre la PEGilación en función del análisis por SDS-PAGE y, por lo tanto, se añadió a todas las reacciones posteriores.

25 Las reacciones se aumentaron a escala (0.2-0.3 mg de FVIIa) para producir FVIIa PEGilado para una evaluación *in vitro* inicial. Se produjeron muestras de PEG(20kDa)-FVIIa y una muestra de PEG(10kDa)-FVIIa para el análisis *in vitro* (remítase a la Tabla 1). Se observó que el aumento de la temperatura de las reacciones de PEGilación aumentaba la conversión de FVIIa en PEG-FVIIa según se aproximó por la integración de los picos en el cromatograma de la purificación por afinidad con heparina. Sin embargo, la evaluación *in vitro* inicial indicó que el aumento en la temperatura puede tener un efecto negativo sobre la actividad del producto PEGilado y, por lo tanto, las reacciones posteriores se llevaron a cabo a temperaturas más bajas (remítase al Ejemplo 5).

Tabla 1. Reacciones de PEGilación iniciales

Tamaño de PEG (kDa)	Temperatura de reacción (°C)	Conversión (%)
20	4	43
20	20	80
20	20	72
20	4	40
20	4	22
20	20 durante 1h, a continuación 4	40
10	20 durante 1h, a continuación 4	25

35 Se investigaron varias condiciones de purificación para el aislamiento del material PEGilado. La primera muestra de PEG(20kDa)-FVIIa se purificó por afinidad con heparina y la segunda muestra por afinidad con heparina seguida por intercambio de anión DEAE. No se incluyó benzamidina en los tampones para la purificación de estos lotes. Para todos los demás lotes, la purificación se llevó a cabo por afinidad con heparina con benzamidina en los tampones, seguida por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés). Inicialmente se incluyó benzamidina en los tampones para la SEC pero esto dificultó la identificación de los picos debido a una absorbancia muy marcada a 280 nm. Por lo tanto, se eliminó la benzamidina de los tampones de la SEC pero se añadió a las muestras inmediatamente después de la elución.

40 Para generar material para la evaluación *in vitro*, se aumentaron a escala las reacciones adicionalmente hasta 1 mg de FVIIa. Se prepararon variantes PEGiladas de 10 kDa, 20 kDa y 30 kDa de FVIIa utilizando condiciones

determinadas en reacciones a menor escala (Figura 4).

Tras la purificación por cromatografía de afinidad con heparina seguida por SEC tal como se ha descrito anteriormente, se analizaron los productos PEGilados por SDS-PAGE para demostrar la pureza (Figura 5) y se cuantificaron por un ensayo BCA.

5 **Ejemplo 4: Evaluación de la actividad *in vitro* de FVIIa PEGilado mediante un ensayo de PT**

Se determinó la actividad de FVIIa y FVIIa PEGilado utilizando un ensayo de tiempo de protrombina (PT, por sus siglas en inglés) (STACLOT VIIa-rTF, Diagnostica Stago, París, n.º de catálogo 00281). El factor tisular soluble recombinante (rsTF, por sus siglas en inglés) suministrado en el kit es específico para FVIIa. En el kit no se suministró el cloruro de calcio requerido para la coagulación, por lo tanto se adquirió cloruro de calcio 25 mM (Diagnostica Stago, n.º de catálogo 00367) para utilizar en el ensayo. La Figura 6 muestra los componentes que se proporcionan y los pasos implicados en el ensayo (naranja) dentro de la cascada de coagulación.

Todos los ensayos se llevaron a cabo utilizando un método de coagulación manual. Se pipeteó FVIIa o FVIIa PEGilado (50 µL) en el recipiente de reacción (vial de vidrio con un tapón de plástico). A continuación se añadió plasma deficiente en FVII (50 µL) en el recipiente de reacción seguido por 50 µL de rsTF y a continuación se añadió fosfolípido en el tubo de reacción y se incubó durante 180 s a 37 °C. Tras este tiempo, se añadieron 50 µL de cloruro de calcio 25 mM (precalentado a 37 °C) a la mezcla de reacción mientras se ponía en marcha simultáneamente un cronómetro. El tubo de reacción se balanceó suavemente hacia adelante y hacia atrás en el baño de agua a 37 °C y se llevó a cabo una observación cuidadosa para determinar la formación de un coágulo. Justo después de la formación del coágulo de fibrina se registró el tiempo del coágulo.

Se ha establecido que el intervalo de concentración adecuado para determinar la actividad de FVIIa en este ensayo está comprendido entre 0.01-10 ng/mL y se ha establecido que el intervalo de concentración para FVIIa PEGilado está comprendido entre 0.10-100 ng/mL. La concentración inicial de FVIIa PEGilado utilizada en los ensayos fue, por lo tanto, un orden de magnitud menor que la de FVIIa en el ensayo de PT debido al tiempo de coagulación rápido observado para la proteína no PEGilada, para la cual una concentración de 100 ng/mL resultaría en una coagulación inmediata.

Ejemplo 5: Evaluación de la actividad de FVIIa PEGilado mediante un ensayo de PT

La evaluación inicial de FVIIa PEGilado se llevó a cabo con muestras obtenidas a partir de reacciones de PEGilación que comenzaron con 0.2-0.3 mg de FVIIa. Se estudiaron muestras de FVIIa PEGilado de 10 kDa y FVIIa PEGilado de 20 kDa. Los primeros experimentos se llevaron a cabo con lotes de PEG(20kDa)-FVIIa que se suministraron en tampón citrato y que mostraron una actividad deficiente. Posteriormente las muestras se suministraron en tampón HEPES. Los resultados de los ensayos de TP para los lotes suministrados en tampón HEPES se enumeran en la Tabla 2. La concentración de benzamidina fue 4 mM en estas muestras de PEG-FVIIa tras la dilución de la concentración de FVIIa más elevada estudiada (100 ng/mL).

Tabla 2. Tiempos del coágulo para muestras de FVIIa PEGilado con 100 ng/mL (tampón HEPES)

Tamaño de PEG (kD)	Tiempo del coágulo (100ng/ml)	Tiempo del coágulo FVIIa (10ng/ml)	Tiempo del coágulo en tampón
20	100 s	48 s	114 s
20	99 s	48 s	114 s
20	75 s	48 s	114 s
20	90 s	48 s	114 s
20	67 s	48 s	114 s
10	65 s	48 s	114 s

Se investigó el cambio dependiente de la concentración en el tiempo del coágulo para FVIIa PEGilado de 20 kDa y 10 kDa a lo largo de un intervalo de concentraciones de 0.1-100 ng/mL (Figura 7). Estas muestras mostraron un cambio similar en los tiempos del coágulo con el incremento de la concentración como en la investigación anterior.

Debido a que las curvas para los diferentes tamaños de PEG son paralelas, es probable que cualesquiera cambios en el tiempo de coagulación en comparación con FVIIa en tampón HEPES sean debidos a la PEGilación. Basándose en las líneas de mejor ajuste, el intervalo de actividad del FVIIa PEGilado de 10 kDa y 20 kDa fue de 1.3% - 2.5%.

A continuación se estudiaron las muestras de FVIIa PEGilado de 10 kDa y 20 kDa procedentes de reacciones a mayor escala (1 mg de FVIIa). Todos los tiempos del coágulo para estas muestras PEGiladas fueron comparables entre sí y más rápidos que los observados para muestras procedentes de reacciones a menor escala (Tabla 3). Las muestras PEGiladas para estas reacciones se suministraron con una concentración mayor y, por lo tanto, requirieron una dilución mayor para alcanzar la concentración de 100 ng/mL utilizada como la concentración más alta en el ensayo de PT. El cambio dependiente de la concentración en el tiempo del coágulo para estas muestras se comparó con el de FVIIa (Figura 8). Se calculó un intervalo de la actividad porcentual para estas muestras a partir de las líneas de mejor ajuste y se observó que estaba comprendida entre 5 y 7.5%.

Las alícuotas de muestras procedentes de muestras de FVIIa PEGilado de 10 kDa y 20 kDa a mayor escala se sometieron a un cambio de tampón para incluir los excipientes observados en NovoSeven® (se reemplazó sacarosa por manitol ya que este no estaba disponible) y a continuación se liofilizaron. Los polvos resultantes se resuspendieron en agua y se analizaron utilizando el ensayo de PT (Figura 9). A la vez se analizaron las siguientes muestras: (1) una muestra de PEG(30 kDa)-FVIIa preparado a partir de una reacción a una escala de 1 mg, (2) FVIIa que había experimentado el proceso de PEGilación pero que no había incorporado PEG.

FVIIa que se había procesado de manera similar al FVIIa PEGilado pero que no había incorporado PEG mostró cambios similares en el tiempo de coagulación en comparación con FVIIa que se había sometido a un cambio de tampón en tampón HEPES (Figura 8). Esto indica que cualquier reducción en la actividad observada es debida a la unión de PEG y no al proceso. La variante de FVIIa PEGilada de 30 kDa también exhibió una actividad similar a las variantes con un tamaño de PEG menor. La liofilización de FVIIa PEGilado de 10 kDa y 20 kDa no parece afectar la actividad a concentraciones más elevadas. Con concentraciones más bajas la variante PEGilada de 10 kDa liofilizada parece exhibir una actividad similar a FVIIa no PEGilado. Sin embargo, se debe tener cuidado cuando se interprete este valor ya que estos datos proceden de un único experimento y se requiere repetir el análisis para verificar este resultado. Se determinaron los intervalos de actividad porcentual para estas muestras a partir de las líneas de mejor ajuste y estos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados del ensayo de PT utilizando muestras PEGiladas procedentes de reacciones a mayor escala

Tamaño de PEG (kD)	Tiempo del coágulo (100ng/mL)	% de actividad
30	33s	5-7.7
20	36s	5-7.5
20	30s	5-9
10	34s	5-7.5
10	35s	7.7-33

Ejemplo 6: Ensayo cromogénico

El ensayo cromogénico (Hyphen Biomed, n.º de catálogo 221304) mide la actividad de FVIIa mediante la formación de un sustrato coloreado y no conlleva la formación de un coágulo. Esto se logra por la activación de FX a FXa por FVIIa en presencia de calcio y tromboplastina. FXa escinde un sustrato cromogénico, específico respecto a FXa. Esto permite la medida cuantitativa de FVIIa (Figura 10).

El ensayo se llevó a cabo en una placa de microvaloración de 96 pocillos. Todos los pasos de precalentamiento e incubación se llevaron a cabo a 37 °C. La muestra (30 µL) se añadió a la placa de microvaloración y se precalentó a 37 °C durante 2 min. Se añadieron el reactivo R2 precalentado (30 µL) a cada pocillo y a continuación R1 precalentado (60 µL) y estos se mezclaron e incubaron durante 7 minutos. A continuación se añadió el sustrato cromogénico (R3, precalentado) con 60 µL por pocillo y se incubó durante 5 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 60 µL de ácido acético al 20% y se leyó la absorbancia a 405 nm.

Los resultados del ensayo cromogénico han mostrado que FVIIa en tampón HEPES es compatible con el ensayo y

esto proporcionó un resultado similar a FVIIa con benzamidina 20 mM. Un ejemplo de los resultados de un ensayo cromogénico se muestra en la Figura 11. Los valores de DE50 para FVIIa en tampón HEPES con benzamidina 20 mM son 307.6 ± 9.0 pg/mL (15.4 ± 0.5 mU/mL) y para FVIIa con benzamidina 20 mM son 351.4 ± 10.8 pg/mL (17.6 ± 0.5 mU/mL).

- 5 El intervalo del ensayo cromogénico para FVIIa se ha establecido entre las concentraciones de 0.10 pg/mL-100 ng/mL. Se requiere una concentración de FVIIa PEGilado en el orden de los miligramos para el ensayo cromogénico. Esto no es factible y por lo tanto no se ha utilizado el ensayo cromogénico para las muestras PEGiladas.

Ejemplo 7: Producción de TheraPEG™ de 20 kDa-FVIIa para un estudio PK en ratas

- 10 Se incrementó la escala de las reacciones de PEGilación de 1 mg a 2-3 mg de FVIIa. La producción de FVIIa TheraPEG™ de 20 kDa para un estudio PK en ratas se llevó a cabo en cuatro sublotos que contenían 2 mg o 3 mg de FVIIa (NovoSeven®). Se llevó a cabo la PEGilación utilizando las condiciones identificadas previamente y se realizó la purificación utilizando cromatografía de afinidad con heparina para eliminar el reactivo de PEG sin reaccionar, seguido por SEC para eliminar cualquier FVIIa no PEGilado residual y proteína diPEGilada. Las fracciones que contenían PEG(20 kDa)-FVIIa monoPEGilado se combinaron, se cambió el tampón por los componentes del tampón RT NovoSeven® antes de la liofilización.

- 20 Se confirmó la formación de un producto monoPEGilado para cada reacción de PEGilación mediante un análisis de SDS-PAGE (Figura 12). La conversión porcentual promedio de FVIIa en FVIIa PEGilado fue de $44.5 \pm 7.5\%$ según se aproximó por la integración de los picos en el cromatograma de la purificación por afinidad con heparina. El rendimiento final de FVIIa PEGilado fue de 1.09 mg de PEG(20 kDa)-FVIIa según se determinó por un ensayo de proteína total de Bradford. Esta cantidad representó un rendimiento promedio de $11.2 \pm 3.8\%$.

- 25 Se determinó la actividad *in vitro* de PEG(20 kDa)-FVIIa utilizando el ensayo de tiempo de protrombina (PT) modificado. Se emprendió el análisis del tiempo de coagulación durante los estudios anteriores (Ejemplo 5) representando los datos en un gráfico semi-log pero se cambió a un gráfico log-log para el presente estudio (Figura 13) ya que este es el método recomendado por el productor del kit. Se calculó la actividad retenida porcentual para las muestra antes y después de la liofilización. El tiempo del coágulo (a 100 ng/mL) y las actividades retenidas promedio de PEG(20 kDa)-FVIIa antes de la liofilización fueron de 33.0 ± 4.5 s y $0.6 \pm 0.4\%$ respectivamente. El tiempo del coágulo (a 100 ng/mL) y las actividades retenidas promedio de PEG(20 kDa)-FVIIa después de la liofilización fueron de 34.8 ± 4.7 s y $0.8 \pm 0.4\%$ respectivamente.

- 30 Se apreciaron diferencias en las actividades retenidas entre los lotes preparados para el estudio en ratas y los lotes preparados durante el estudio de viabilidad inicial (Ejemplos 3-5). Cuando se revisaron los datos para el estudio de viabilidad inicial se observó que el patrón de FVIIa proporcionaba tiempos de coagulación más largos a concentraciones equivalentes que los patrones utilizados para el análisis de los lotes del estudio en ratas. El patrón de FVIIa utilizado para el análisis de los lotes de viabilidad se había almacenado en tubos de microcentrifuga no siliconizados durante 15 días. Desde que se llevó a cabo este experimento se ha hecho evidente que el almacenamiento de FVIIa en estas condiciones puede dar como resultado algo de adhesión de la proteína al tubo. Por consiguiente, cuando se utilizó este patrón, la concentración real de FVIIa puede haber sido menor de lo esperado y como resultado puede que se haya añadido menos al ensayo de lo que se había calculado. Esto conllevaría tiempos de coagulación más prolongados y, por lo tanto, una actividad aparente menor del patrón y en consecuencia la actividad retenida residual de PEG(20 kDa)-FVIIa parecería mayor. Para el estudio PK en ratas, se congelaron los patrones de FVIIa a -80 °C en tubos Eppendorf LoBind® justo después de su reconstitución lo que debería evitar que FVIIa se adhiriera al tubo durante el almacenamiento y, por lo tanto, diera resultados más exactos en el ensayo de PT.

Ejemplo 8: Farmacocinética de TheraPEG™ 20 kDa-FVIIa frente a NovoSeven® en ratas

- 45 Se evaluaron las propiedades farmacocinéticas de PEG(20 kDa)-FVIIa en ratas Sprague Dawley macho y se compararon directamente con la farmacocinética de FVIIa (NovoSeven®) en este modelo. Se administraron dosis a nueve animales por grupo mediante inyección intravenosa rápida en la vena de la cola con una concentración de 0.3 mg/kg y un volumen de 2.5 mL/kg. Se tomaron muestras de sangre a las 0.033, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0, 6.0 y 24 horas. Se prepararon las muestras plasmáticas y la concentración de FVIIa se analizó por ELISA. La Figura 14 muestra un gráfico del tiempo frente a la concentración de FVIIa. Se calcularon las semividas alfa, beta y globales y se presentan en la Tabla 4. Los resultados muestran que la semivida plasmática de TheraPEG™ (20 kDa)-FVIIa fue significativamente más prolongada que la de FVIIa.

Tabla 4. Resultados del estudio PK en ratas

	Tiempo (horas)	
	FVIIa - PEG(20kDa)	NovoSeven®
Alfa t1/2	1.06	0.56
Beta t1/2	8.91	3.71
t1/2	6.81	3.01

Ejemplo 9: Producción de TheraPEG™ de 20 kDa-FVIIa para un estudio PK en perros

5 Se incrementó la escala de las reacciones de PEGilación de 3 mg a 25 mg de FVIIa mediante reacciones intermedias llevadas a cabo a una escala de 5 y 10 mg. La producción de PEG(20 kDa)-FVIIa para un estudio PK en perros se llevó a cabo utilizando dos fuentes de FVIIa.

10 La preparación de FVIIa-PEG(20 kDa) utilizando la primera fuente de FVIIa (NovoSeven®) se llevó a cabo en 5 lotes por PEGilación de FVIIa a escalas de reacción comprendidas entre 10 y 25 mg. Las condiciones de reacción fueron idénticas para cada lote y el análisis por SDS-PAGE mostró que la PEGilación fue constante. La conversión porcentual promedio de FVIIa en FVIIa PEGilado fue de un $41.8 \pm 11.7\%$ según se aproximó por la integración de los picos en el cromatograma de la purificación por afinidad con heparina. El rendimiento final total de FVIIa PEGilado fue de 15.3 mg de PEG(20 kDa)-FVIIa según se determinó por un ensayo de proteína total de Bradford. Esta cantidad representó un rendimiento promedio de un $14.7 \pm 3.6\%$.

15 Se calculó la actividad *in vitro* para las muestras antes y después de la liofilización. El tiempo del coágulo (a 100 ng/mL) y las actividades retenidas promedio *cf.* FVIIa de PEG(20 kDa)-FVIIa antes de la liofilización fueron de 28.5 ± 3.5 s y $1.8 \pm 0.6\%$ respectivamente. El tiempo del coágulo (a 100 ng/mL) y actividades retenidas promedio de PEG(20 kDa)-FVIIa *cf.* FVIIa después de la liofilización fueron de 32.2 ± 4.1 s y $2.2 \pm 2.5\%$ respectivamente.

20 La preparación de PEG(20 kDa)-FVIIa utilizando la segunda fuente de FVIIa se llevó a cabo en 3 lotes por PEGilación de FVIIa a escalas de reacción de 25 mg. Las condiciones de reacción fueron idénticas para cada lote y el análisis por SDS-PAGE mostró que la PEGilación fue constante. La conversión porcentual promedio de FVIIa en FVIIa PEGilado fue de un $40.3 \pm 2.9\%$ según se aproximó por la integración de los picos en el cromatograma de la purificación por afinidad con heparina. El rendimiento final total de FVIIa PEGilado fue de 13.1 mg de PEG(20 kDa)-FVIIa según se determinó por un ensayo de proteína total de Bradford. Esta cantidad representó un rendimiento promedio de un $17.5 \pm 6.9\%$.

25 Se calculó la actividad *in vitro* para las muestras antes y después de la liofilización. El tiempo del coágulo (a 100 mg/mL) y las actividades retenidas promedio de PEG(20 kDa)-FVIIa *cf.* FVIIa antes de la liofilización fueron de 37.0 ± 3.5 s y $1.5 \pm 0.6\%$ respectivamente. El tiempo del coágulo (a 100 ng/mL) y las actividades retenidas promedio de PEG(20 kDa)-FVIIa *cf.* FVIIa después de la liofilización fueron de 35.7 ± 1.1 s y $1.3 \pm 0.3\%$ respectivamente.

Ejemplo 10: Análisis *in vitro* de PEG(20 kDa)-FVIIa mediante medidas de la velocidad de la reacción de coagulación

30 Con el fin de establecer si PEG(20 kDa)-FVIIa coagula con la misma velocidad que FVIIa, se realizó el ensayo de PT modificado en un analizador de coagulación Sysmex CA50. Según se forma el coágulo, el analizador registra el cambio en la luz dispersada desde un 2-80%. Representando el tiempo de coagulación frente a la detección del % del coágulo, se puede calcular la velocidad de coagulación a partir de la pendiente de la curva y se puede comparar entre muestras. Es importante comparar muestras con las mismas concentraciones ya que hay un efecto dependiente de la concentración en la velocidad de reacción.

35 Se midió la velocidad de la reacción de FVIIa y PEG(20 kDa)-FVIIa con cuatro concentraciones diferentes; 7.5, 10, 12.5 y 20 ng/mL (Figura 15). Se observó que la velocidad media de la reacción de FVIIa PEGilado fue un 22% la de FVIIa en las cuatro concentraciones estudiadas (Tabla 5).

40

Tabla 5. Velocidad de reacción de FVIIa PEGilado frente a FVIIa

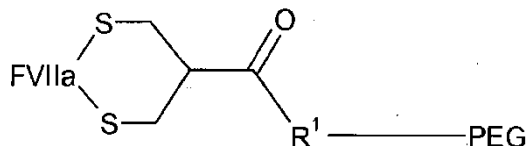
Concentración (ng/mL)	Velocidad de reacción (% de coágulo/s)		% de actividad de FVIIa PEGilado cf. FVIIa
	FVIIa	FVIIa PEGilado	
7.5	15.838	3.6436	23.0
10	17.937	3.5308	19.7
12.5	17.414	4.0073	23.0
20	20.235	4.6423	22.9
		Media	22.2

Ejemplo 11: Farmacocinética y coagulación sanguínea de productos TheraPEG™ de 20 kDa-FVIIa en perros con hemofilia A

- 5 El objetivo de este estudio es determinar si los dos productos PEG(20 kDa)-FVIIa diferentes (Ejemplo 9) tenían perfiles farmacológicos favorables y eran eficaces en perros con hemofilia A con propensión a inhibidores en comparación con NovoSeven® y otra fuente de FVIIa. Estos dos productos PEGilados difieren en la fuente de FVIIa utilizada en su preparación.
- 10 Se llevaron a cabo un pretratamiento con CBC, perfil químico sérico del fibrinógeno, FDP, tiempo de trombina (TT) y UA en cada perro para verificar un estado de salud normal y para una comparación con los valores de referencia. Se congelaron alícuotas de plasma y suero adicionales a -70 °C para ensayos futuros del factor de coagulación y de los anticuerpos inhibidores. Inicialmente se empleó un perro por artículo de estudio, con la idea de ampliar el estudio si la seguridad y semivida biológica resultaban ser satisfactorias.
- 15 Se seleccionaron las dosis de cada artículo de estudio para proporcionar una dosificación equipotente en función del ensayo de la velocidad de reacción *in vitro* (Ejemplo 10) y se logró la dosificación por infusión IV en la vena cefálica. Se obtuvieron muestras plasmáticas a los 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 horas recogiendo sangre en el anticoagulante citrato trisódico 0.109 M seguido por centrifugación y congelación a -70 °C. Se estudiaron las muestras plasmáticas para determinar lo siguiente: aPTT, actividad por Staclot FVIIa, niveles antigénicos de FVIIa por ELISA y calidad del coágulo a partir del tromboelastograma. En el momento de la punción
- 20 venosa se realizó el tiempo de coagulación de sangre entera (WBCT, por sus siglas en inglés) inmediatamente. El aPTT, ensayo Staclot y WBCT se utilizaron para estimar la semivida biológica, mientras que el ELISA de FVIIa se utilizó para determinar la semivida en función de los niveles antigénicos proteicos.
- 25 Se realizó un cribado para determinar toxicidades inesperadas realizando estudios de química sérica y CBC a las 48 horas y 5 días tras la administración del producto. Se evaluaron el fibrinógeno, FDP y tiempo de trombina (TT) para estudiar un aumento en el riesgo de trombosis. Se utilizó el ensayo Bethesda para realizar un cribado y determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado factor FVIIa-polietilenglicol, donde uno o más grupos polietilenglicol están conjugados con FVIIa mediante un grupo conector que hace de puente entre los átomos de azufre de dos residuos de cisteína que formaban un enlace disulfuro en FVIIa, donde el conjugado tiene la estructura:



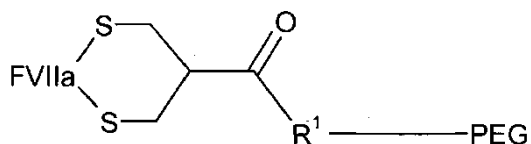
- donde R1 es un sustituyente que es un enlace directo, un grupo alquileo (preferentemente un grupo alquileo C₁₋₁₀), o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; donde los grupos arilo incluyen grupos fenilo, benzoilo o naftilo; donde los grupos heteroarilo adecuados incluyen piridina, pirrol, furano, pirano, imidazol, pirazol, oxazol, piridazina, pirimidina y purina; donde la unión al polímero es por medio de un enlace hidrolíticamente lábil o mediante un enlace no lábil.
2. Un conjugado factor FVIIa-polietilenglicol de la reivindicación 1, donde el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 5-100 kDa.
3. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado factor FVIIa-polietilenglicol tal como se reivindica en cualquier reivindicación anterior.
4. Una composición farmacéutica de la reivindicación 3 donde la composición comprende un portador, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptables.
5. Una composición farmacéutica tal como se reivindica en las reivindicaciones 3 o 4, que además comprende otro agente farmacéuticamente activo.
6. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, que es adecuada para la administración parenteral.
7. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-6, que es adecuada para inyecciones intradérmicas, subcutáneas e intramusculares y para infusiones intravenosas o intraóseas.
8. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-7 en forma de una solución, suspensión o emulsión.
9. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-8, donde el conjugado de FVIIa tiene una semivida mayor en comparación con el FVIIa no modificado.
10. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-9, donde el conjugado de FVIIa tiene una AUC mayor en comparación con el FVIIa no modificado.
11. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-10, donde el conjugado de FVIIa tiene una biodisponibilidad mayor en comparación con el FVIIa no modificado.
12. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-10, donde el conjugado de FVIIa tiene una inmunogenicidad menor en comparación con el FVIIa no modificado.
13. Un conjugado factor FVIIa-polietilenglicol de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para utilizar en el tratamiento de una enfermedad de la coagulación sanguínea **caracterizada por** una pérdida de función de FVIIa o para utilizar en el tratamiento de un traumatismo.
14. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-12 para utilizar en el tratamiento de una enfermedad de la coagulación sanguínea o traumatismo.
15. Un conjugado factor FVIIa-polietilenglicol para utilizar tal como se reivindica en la reivindicación 13 o la reivindicación 14 donde la enfermedad de coagulación sanguínea es hemofilia A o hemofilia B.
16. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de FVIIa de cualquiera de las reivindicaciones 3-12 para utilizar en la reducción del riesgo de hemartrosis, hemorragia, hemorragia gastrointestinal y menorragia en mamíferos con hemofilia A, hemofilia B o traumatismo.

17. La composición farmacéutica para utilizar en la reivindicación 16, donde la composición es para la administración subcutánea.

18. La composición farmacéutica para utilizar en la reivindicación 16, donde la composición es para la administración intravenosa.

5 19. La composición farmacéutica para utilizar en la reivindicación 16, donde la composición es para la administración una vez cada uno-catorce días.

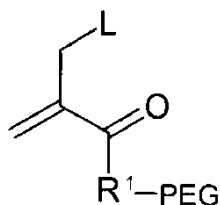
20. Un proceso para preparar el siguiente conjugado factor FVIIa-polietilenglicol,



10 donde R1 es un sustituyente que es un enlace directo, un grupo alquileo (preferentemente un grupo alquileo C₁₋₁₀) o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; donde los grupos arilo incluyen grupos fenilo, benzoilo y naftilo; donde los grupos heteroarilo adecuados incluyen piridina, pirrol, furano, pirano, imidazol, pirazol, oxazol, piridazina, pirimidina y purina; donde la unión al polímero tiene lugar por medio de un enlace hidrolíticamente lábil o por un enlace no lábil y donde el proceso comprende:

- 15 (a) la reducción de un enlace disulfuro natural entre dos residuos de cisteína en FVIIa para generar dos grupos tiol libres;
- (b) una primera de reacción de adición del tiolato entre un reactivo de conjugación que comprende un doble enlace conjugado y un grupo saliente;
- (c) la eliminación del grupo saliente, para generar un doble enlace conjugado; y
- 20 (d) una segunda reacción de adición del tiolato, para formar un puente de 3 carbonos entre los dos átomos de azufre.

21. Un proceso tal como se reivindica en la reivindicación 20, donde el reactivo de conjugación tiene la fórmula



25 donde R1 es un sustituyente que es un enlace directo, un grupo alquileo (preferentemente un grupo alquileo C₁₋₁₀) o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; donde los grupos arilo incluyen grupos fenilo, benzoilo y naftilo; donde los grupos heteroarilo adecuados incluyen piridina, pirrol, furano, pirano, imidazol, pirazol, oxazol, piridazina, pirimidina y purina; donde la unión al polímero tiene lugar por medio de un enlace hidrolíticamente lábil o por un enlace no lábil y L es un grupo saliente.

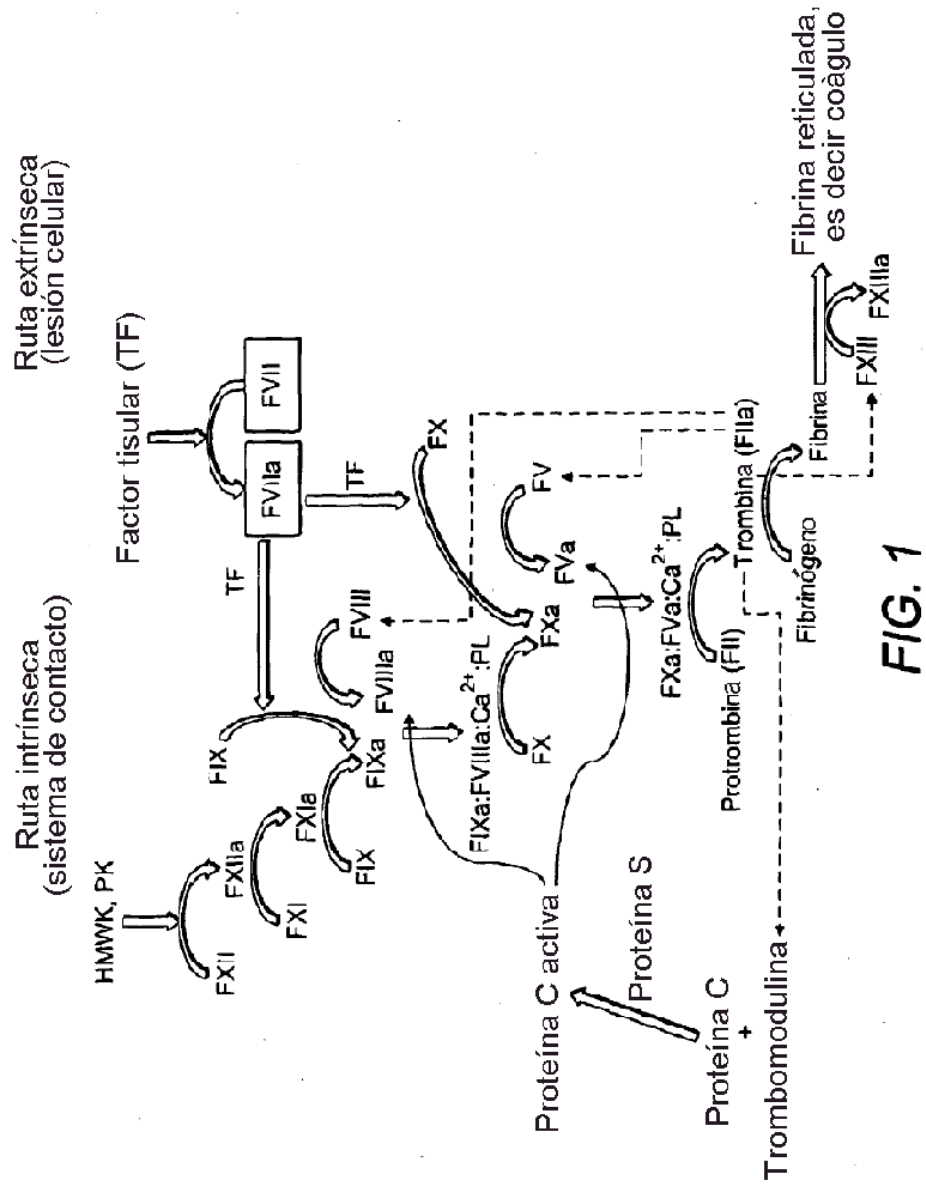


FIG. 1

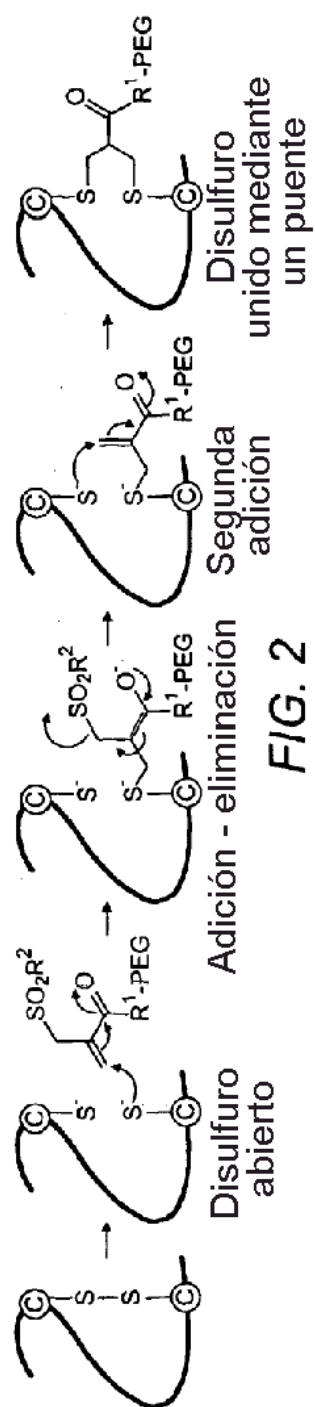


FIG. 2

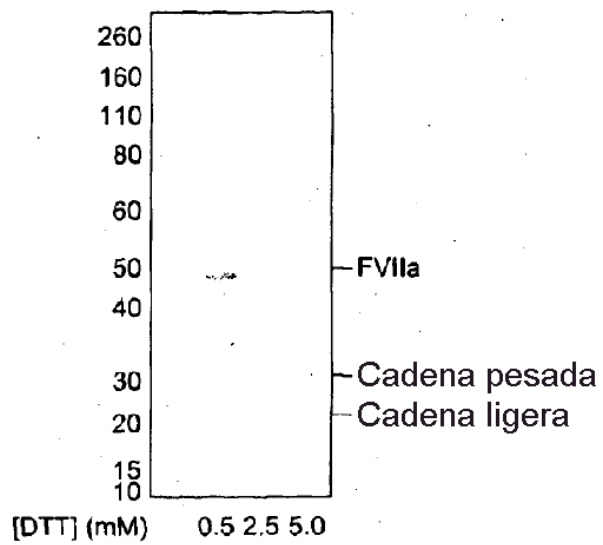


FIG. 3(a)

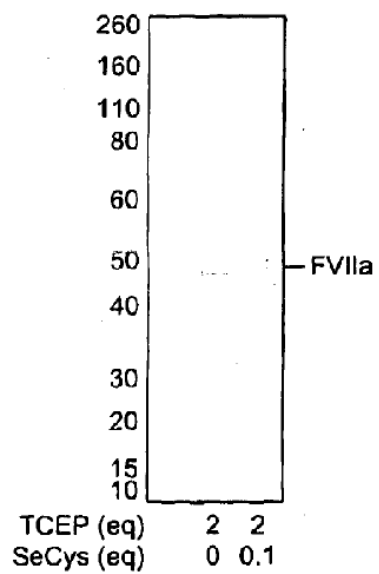


FIG. 3(b)

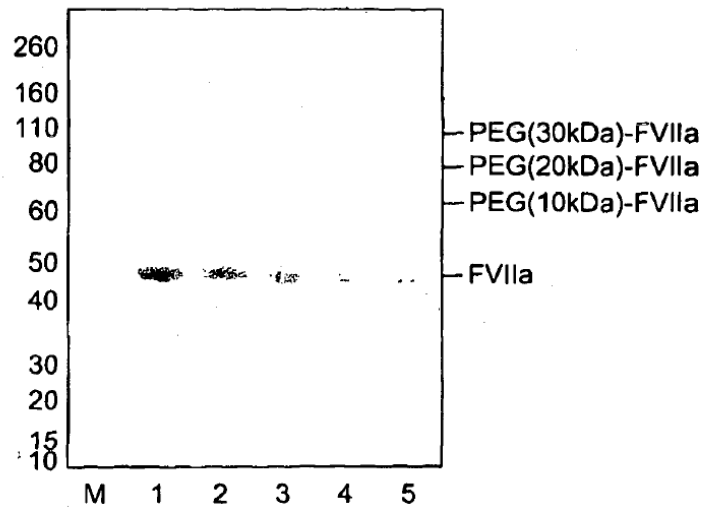


FIG. 4

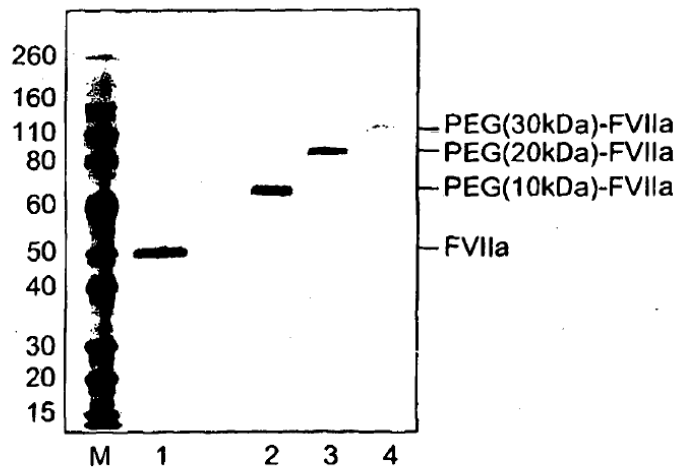


FIG. 5

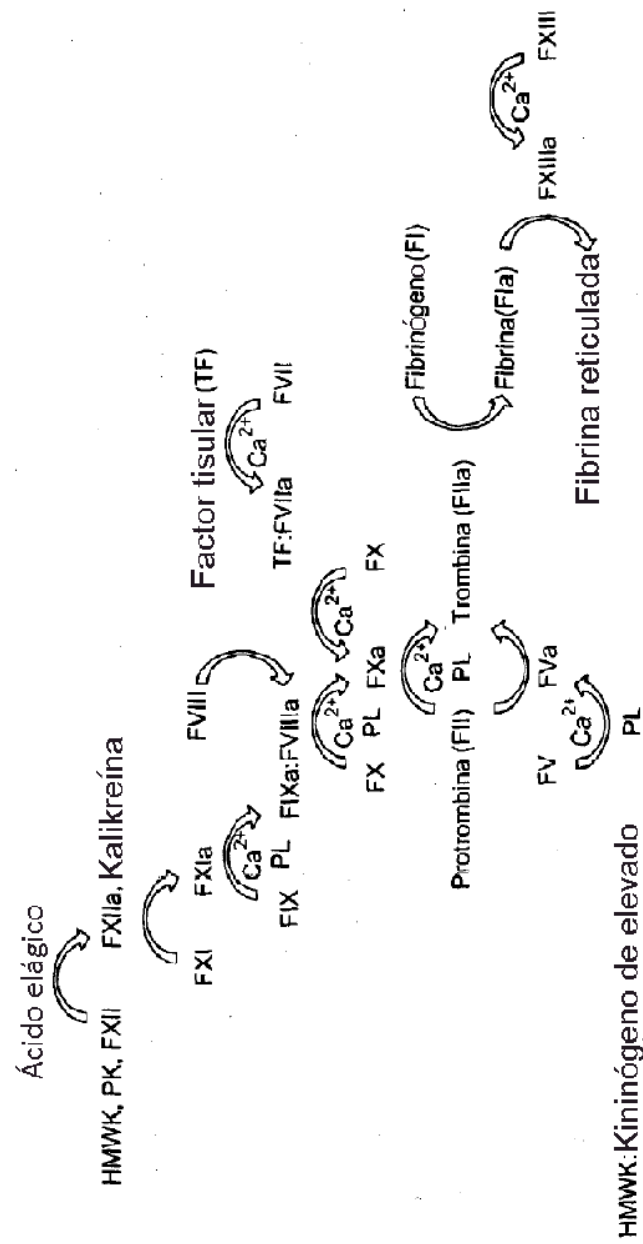


FIG. 6

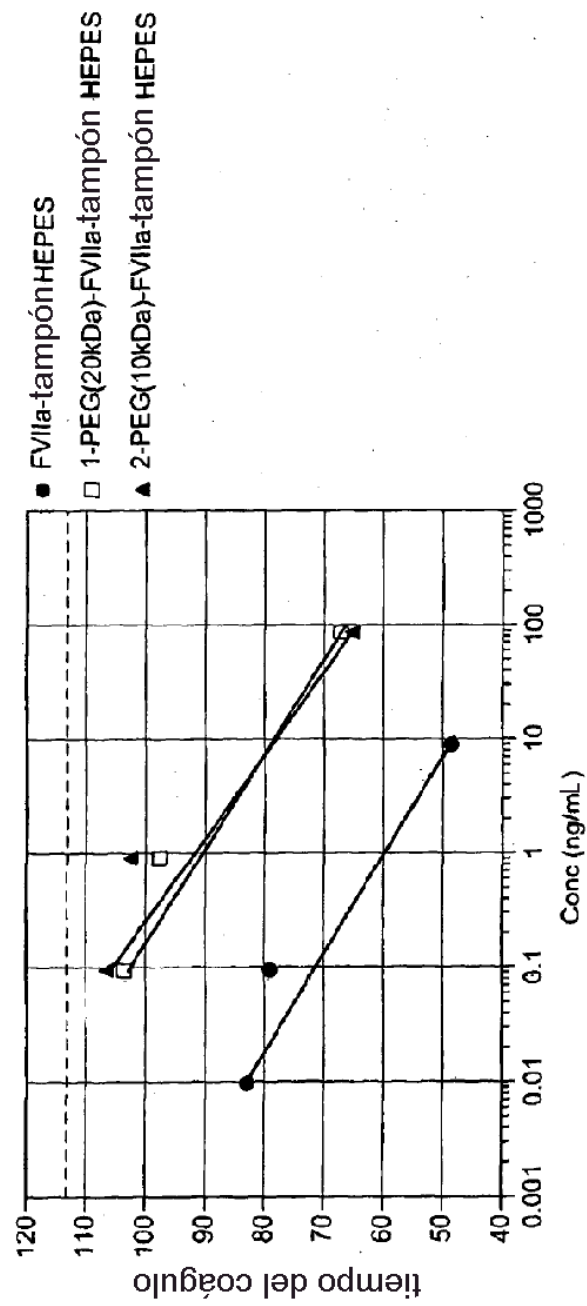


FIG. 7

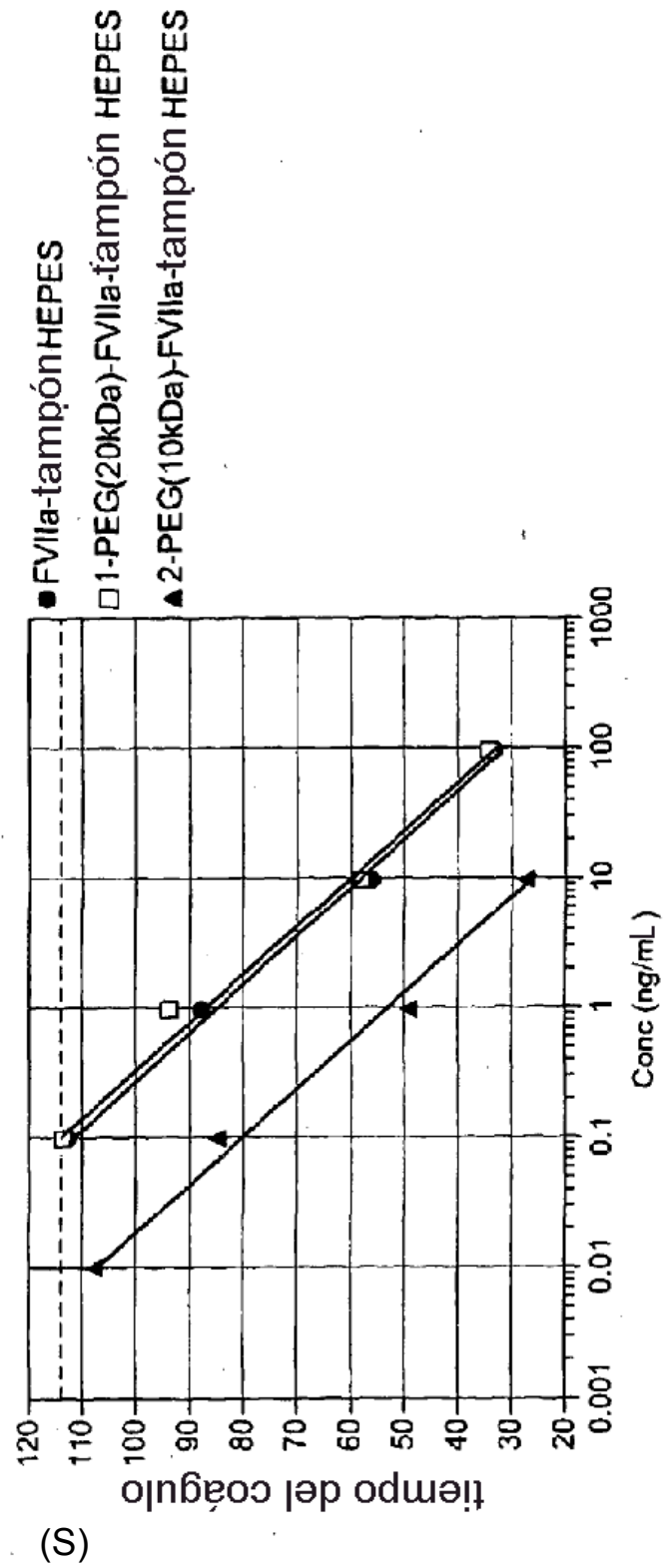


FIG. 8

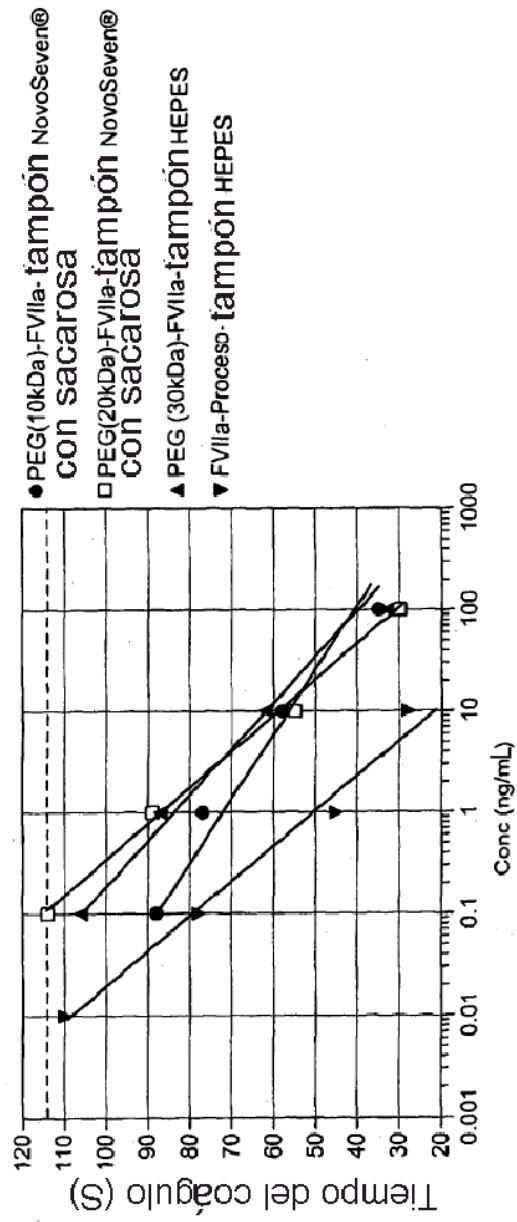


FIG. 9

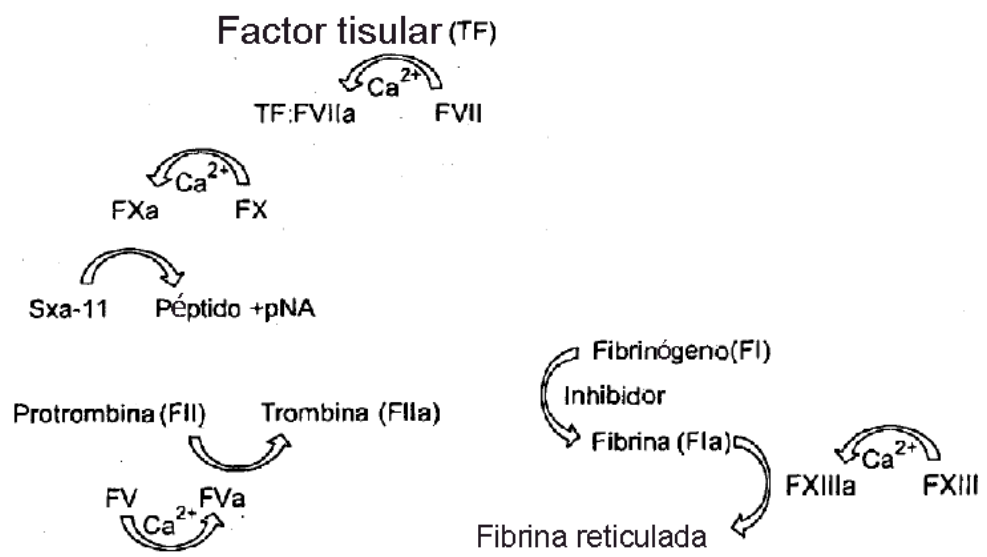


FIG. 10

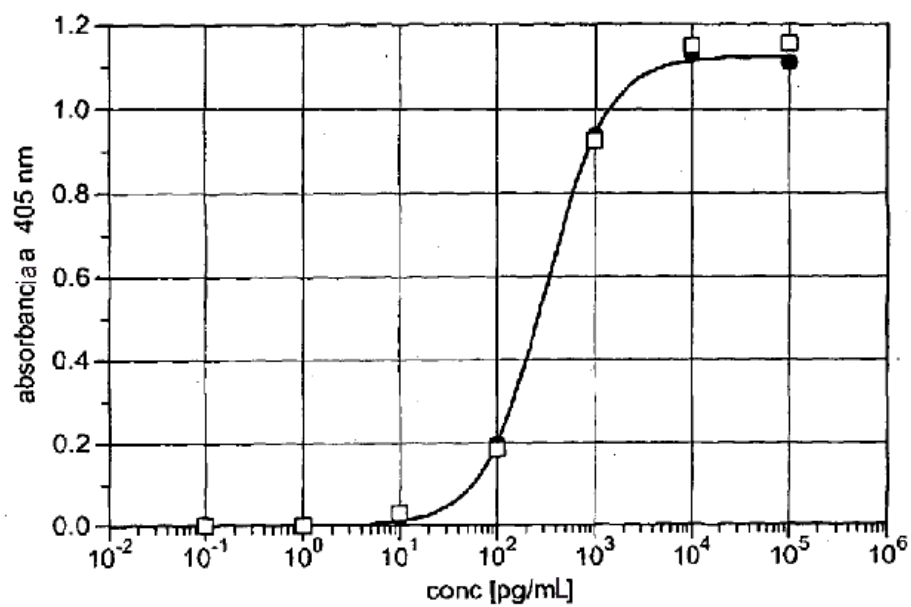


FIG. 11

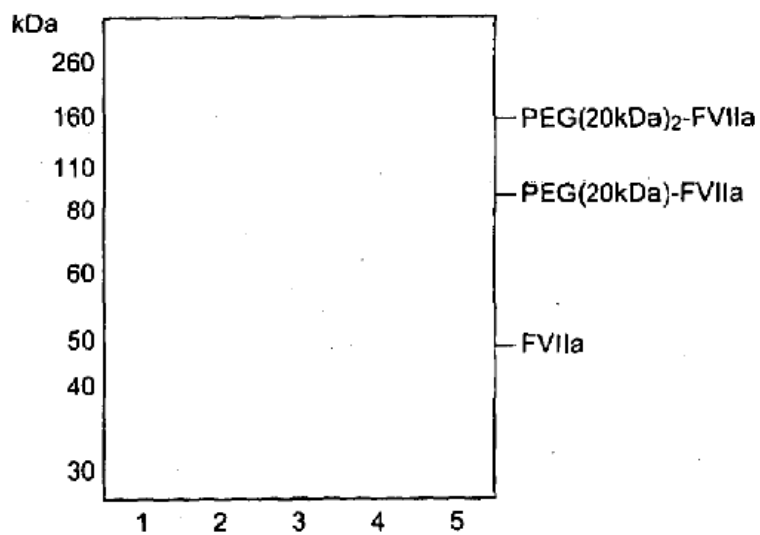


FIG. 12

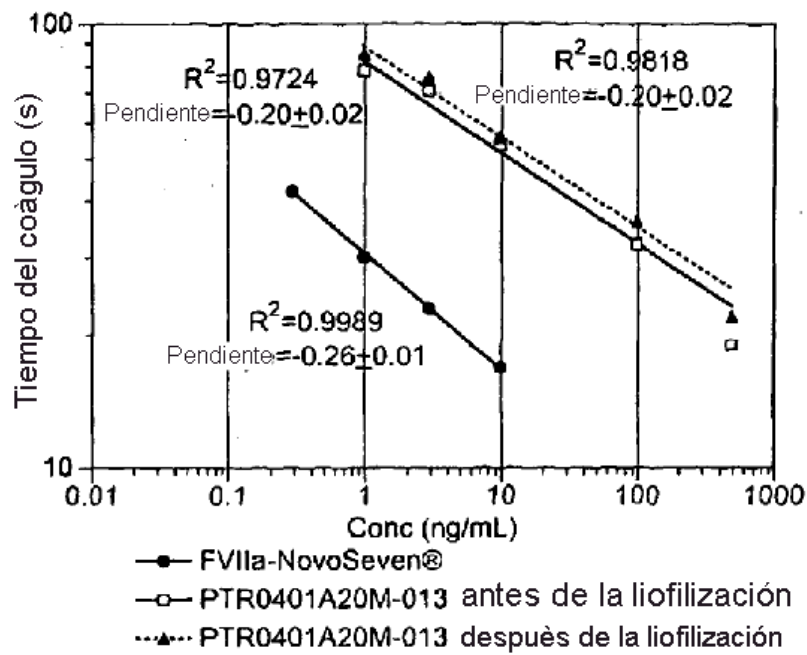


FIG. 13(a)

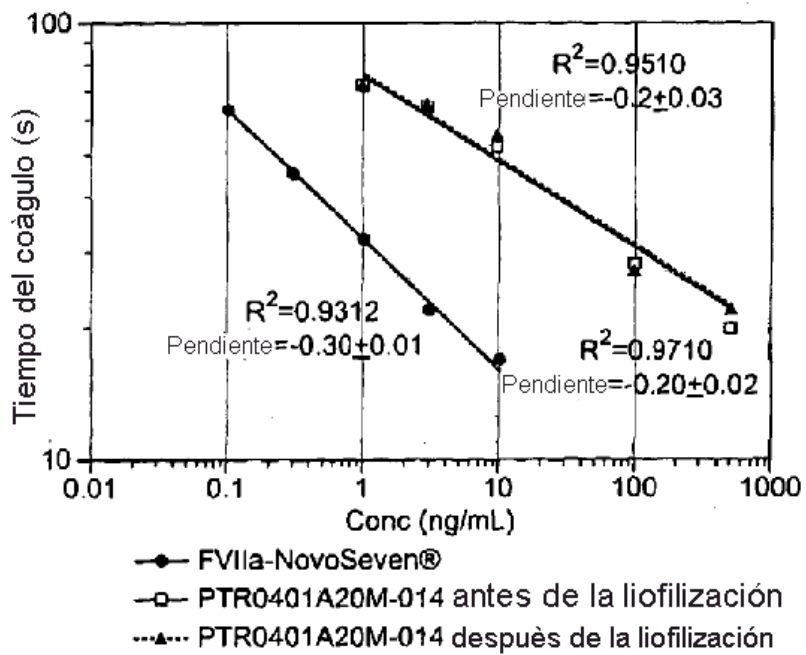


FIG. 13(b)

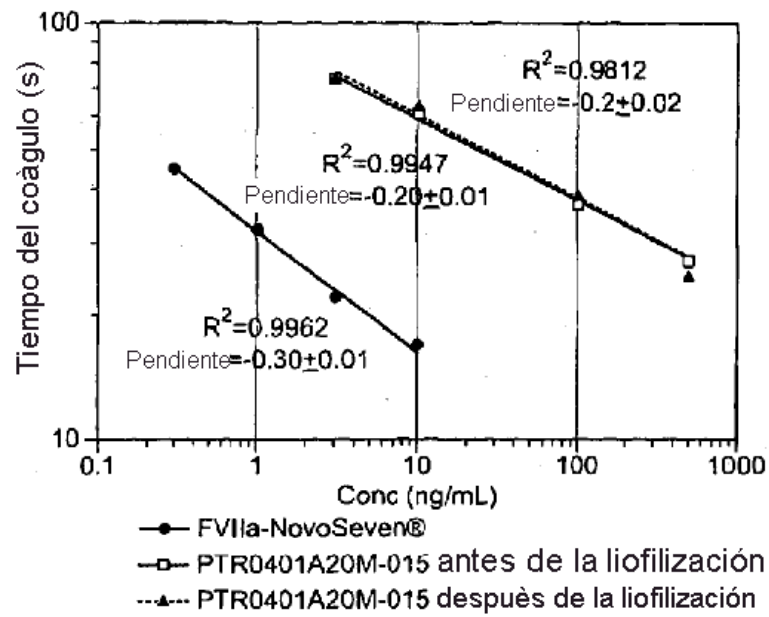


FIG. 13(c)

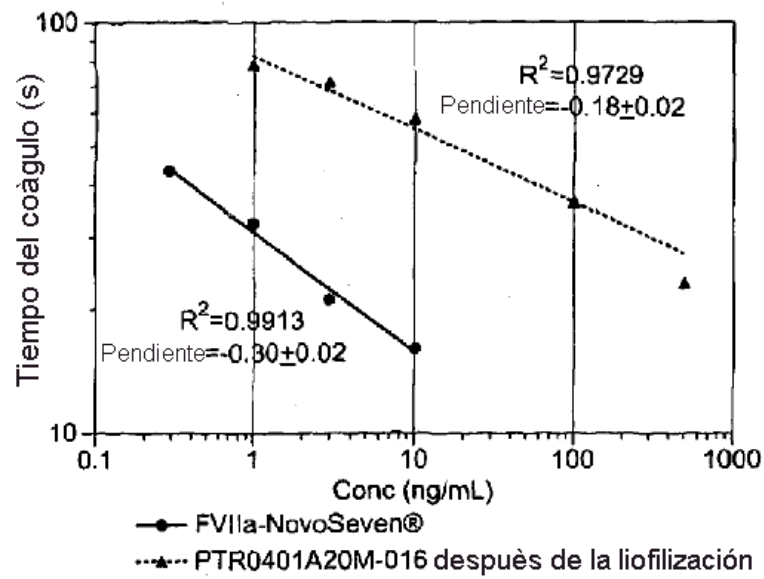
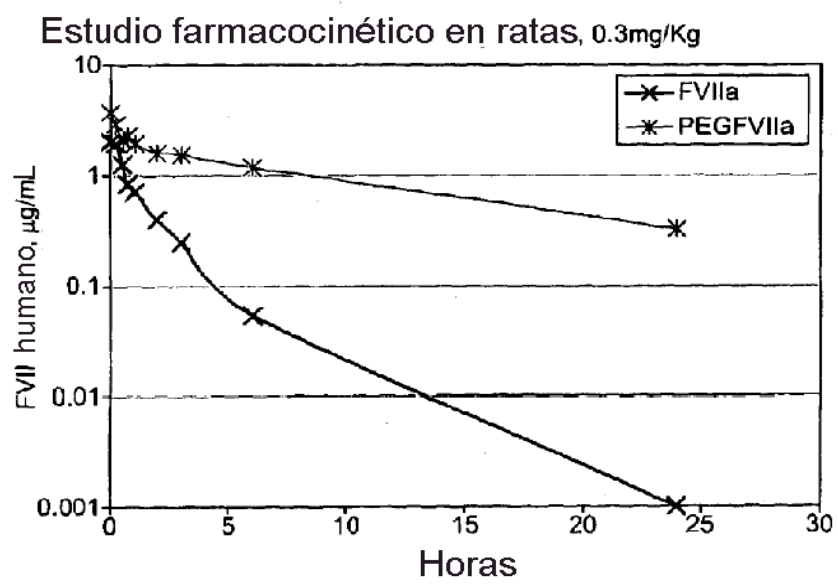


FIG. 13(d)

**FIG. 14**

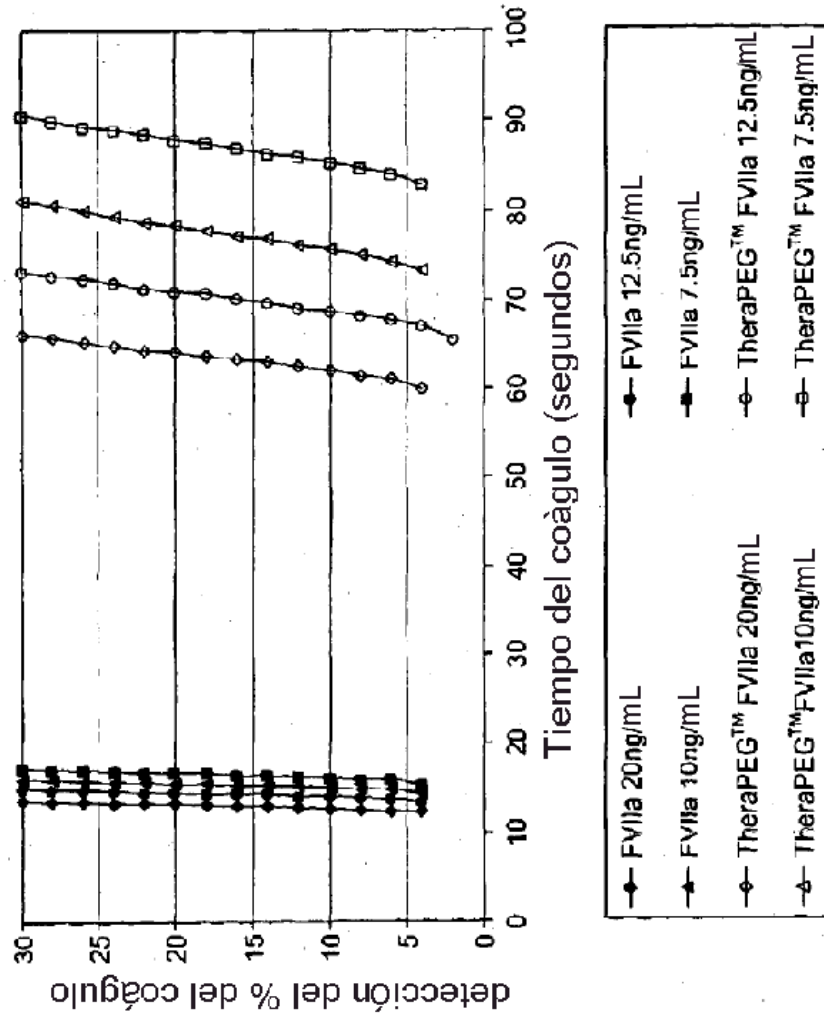


FIG. 15

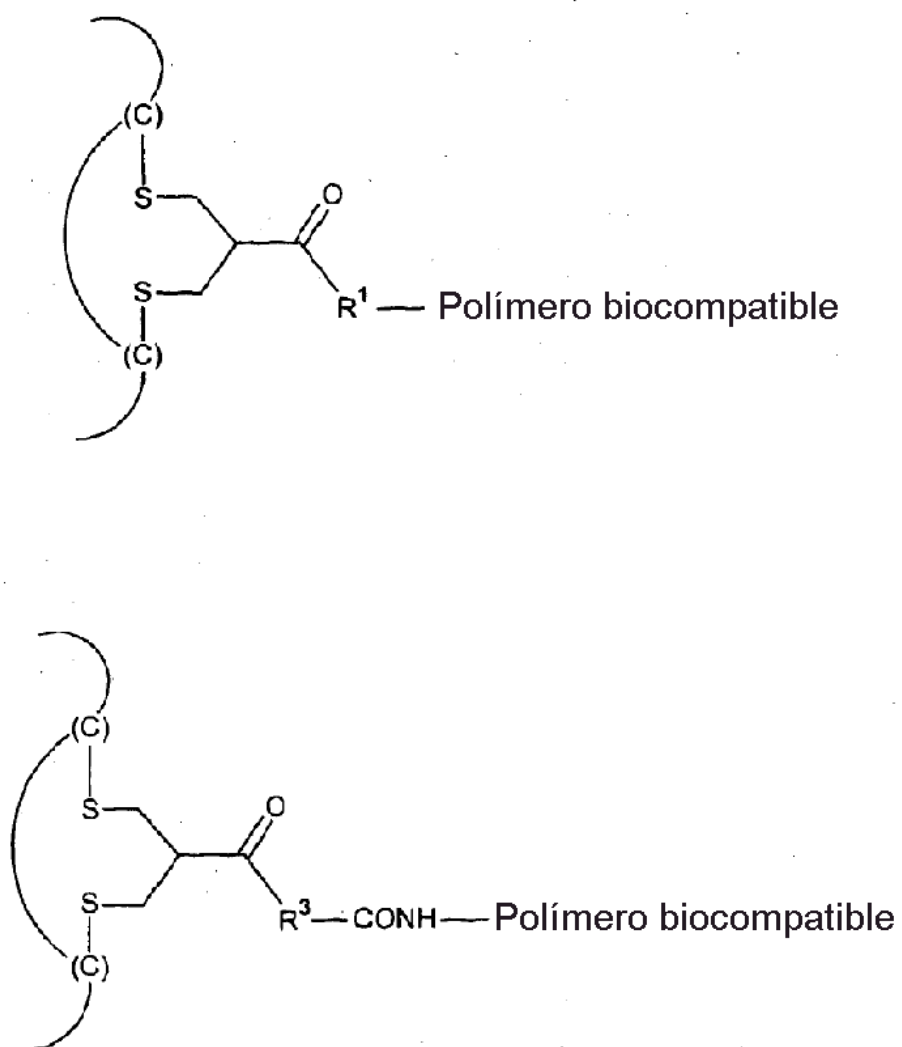


FIG. 16