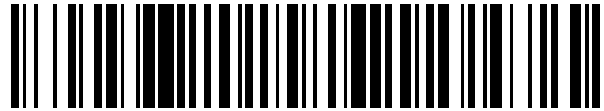


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 520 046**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/64**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2008 E 08787413 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2201111**

54 Título: **Reducción del contenido de dímeros en composiciones de polipéptidos del factor VII por tratamiento térmico**

30 Prioridad:

**24.08.2007 EP 07114950**

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

**11.11.2014**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)  
Thurgauerstrasse 36/38  
8050 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**KRARUP, JANUS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 520 046 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**

Reducción del contenido de dímeros en composiciones de polipéptidos del factor VII por tratamiento térmico

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un método para reducir el contenido de dímeros en composiciones de polipéptidos del factor VII, en particular composiciones que contienen variantes del factor VII.

**10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Se ha demostrado que el factor VII, que está implicado en la cascada de coagulación, es un agente terapéutico útil para tratar diversas afecciones patológicas. En consecuencia, hay una creciente necesidad de formulaciones que contengan los polipéptidos del factor VII activados que sean farmacéuticamente aceptables y tengan una eficacia clínica uniforme y predeterminada.

Durante la fabricación comercial de polipéptidos del factor VII, evitar la formación de agregados como di - y oligómeros del polipéptido de interés es un desafío. Dichas impurezas relacionadas con el producto son indeseadas debido a su potencial antigenicidad. Normalmente, se evitan los pH extremos y las altas temperaturas para controlar la formación de agregados/dímeros durante la producción.

WO 2007/026020 A1 se refiere a un método para purificar una composición que contiene polipéptidos del factor VII y el factor VIIa de los subproductos de la fabricación, mientras se reduce al mínimo la formación concurrente de productos de autodegradación del factor VII o el factor VIIa.

Por lo tanto, en relación con la fabricación de polipéptidos del factor VII, existe la necesidad de un paso de producción en el que la presencia de dímeros (incluidos los oligómeros superiores) del polipéptido del factor VII se reduzca sin pérdida significativa del rendimiento. Esto resultará en una sustancia farmacológica más segura y más estable, y finalmente un producto farmacéutico más seguro y más estable.

**30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención ha solucionado el problema mencionado antes mediante la aplicación de un paso de tratamiento térmico para reducir el contenido de dímeros (y oligómeros superiores).

Específicamente, la presente invención proporciona un método para reducir el contenido de dímeros en una composición que contiene un polipéptido del factor VII, que comprende los pasos de:

(a) si fuera necesario, ajustar el pH de dicha composición a un valor en el intervalo de 4.5-10.0 (según lo determinado a 5 °C);

(b) calentar la composición hasta una temperatura en el intervalo de 20 a 50 °C durante un período de al menos 5 minutos; y

(c) posteriormente enfriar la composición hasta una temperatura a lo sumo de 10 °C.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La figura 1 ilustra el desarrollo del contenido de dímeros en una muestra de la composición V158D/E296V/M298Q-FVII tratada con calor a 37 °C durante 120 minutos. Escala: tiempo en minutos.

La figura 2 ilustra el desarrollo del contenido de dímeros en tres muestras por lo demás idénticas de la composición V158D/E296V/M298Q-FVII que se calientan a 23 °C o a 37 °C, o se almacenan a 5-8 °C (control), durante 48 horas. Escala: tiempo en horas.

La figura 3 ilustra la cantidad de HMWP (polímero y oligómero), monómero y sal que queda después de completar la invención descrita.

La figura 4 ilustra el desarrollo del contenido de dímero en una muestra de la composición V158D/E296V/M298Q-FVII en la que el pH se ajustó a 9.5 antes del tratamiento térmico a 37 °C durante 168 horas. Escala: tiempo en horas.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Como se mencionó antes, la presente invención se refiere a un método para reducir el contenido de dímeros en una composición que contiene un polipéptido del factor VII. El método se aplica ventajosamente en la etapa final del proceso global para la producción de un polipéptido del factor VII, en que la manipulación posterior de la composición, que incluye calentamiento, cambios en el pH, poner en contacto con materiales cromatográficos, etc. puede causar una nueva formación de dímeros.

El método comprende los pasos siguientes de los cuales el paso (a) no es obligatorio:

(a) si fuera necesario, ajustar el pH de dicha composición a un valor en el intervalo de 4.5-10.0 (según lo determinado a 5 °C);

(b) calentar la composición hasta una temperatura en el intervalo de 20 a 50 °C durante un período de al menos 5 minutos; y

(c) posteriormente enfriar la composición hasta una temperatura a lo sumo de 10 °C.

*Composición que contiene un polipéptido del factor VII*

Cuando se utiliza en este documento, la expresión "composición" tiene la intención de dar a entender una composición líquida, preferentemente una composición líquida acuosa, es decir una composición que contenga menos de 5% de solventes no acuosos. La composición para ser utilizada en el método contiene el polipéptido del factor VII así como ciertas impurezas en forma de dímeros.

El término "dímero" tiene la intención de incluir dímeros verdaderos así como oligómeros superiores y agregados (por ej. trímeros, tetrámeros, etc.) de cualquier polipéptido del factor VII. Se ha observado que algunas variantes polipeptídicas del factor VII tienen una mayor tendencia a formar dímeros, en comparación con el factor VII de tipo silvestre. La mayor formación de dímeros se puede explicar por el hecho de que las variantes polipeptídicas del factor VII tienen estructuras diferentes que el factor VII de tipo silvestre y, en consecuencia, propiedades diferentes. Un ejemplo de una propiedad diferente es la temperatura a la cual se despliegan, es decir, su punto de fusión. Cuando los polipéptidos del factor VII se despliegan, su superficie se vuelve más hidrófoba y por lo tanto pueden tender a interactuar con otros polipéptidos desplegados hidrófobos del factor VII, formando por ese motivo dímeros. Por esta razón, la invención se puede considerar particularmente, aunque no exclusivamente, aplicable a las composiciones de dichas variantes polipeptídicas del factor VII.

El método de la invención es particularmente útil para composiciones con un contenido relativamente elevado de dímeros, es decir, el contenido de dímeros en la composición sin tratar (es decir, antes del paso (b)) es de al menos 3%, por ej. de al menos 4%, por ej. de al menos 5%, por ej. de al menos 6%, por ej. de al menos 8%, o incluso de al menos 10%.

La expresión " polipéptido del factor VII" se describe en más detalle más adelante. Basándose en las observaciones preliminares, se cree que la presente invención es especialmente adecuada para las formas no nativas del factor VII, como las variantes del factor VII, porque los polipéptidos de este grupo parecen tener una mayor tendencia a formar dímeros. Por lo tanto, en una realización, el polipéptido del factor VII utilizado en el método según la presente invención es un factor VIIa humano de tipo no silvestre, por ej. una variante del factor VII.

La concentración del factor VIIa en la composición se expresa convenientemente como mg/mL o como UI/mL, donde 1 mg representa generalmente 43 000-56 000 UI o más. La concentración del polipéptido del factor VII en la composición es habitualmente al menos de 0.01 mg/mL, o al menos de 0.1 mg/mL. En diferentes realizaciones, el polipéptido del factor VII está presente en la composición en una concentración de 0.1-90 mg/mL; 0.5-80 mg/mL; 1.0-80 mg/mL; 1.5-70 mg/mL; 2-60 mg/mL; 3-50 mg/mL; o 5-50 mg/mL.

La composición puede, antes del paso (a), y en particular con posterioridad a cualquier aplicación del paso (a), incluir un tampón (debe ser entendido como un único agente o una combinación de agentes) que sea capaz de mantener el pH dentro del intervalo especificado, es decir, dentro de 4.5-10.0.

En una realización, el tampón es al menos un componente elegido de los grupos constituidos por los ácidos y las sales de MES, PIPES, ACES, BES, TES, HEPES, TRIS, histidina, imidazol, glicina, glicilglicina, glicinamida, ácido fosfórico, ácido acético (por ejemplo acetato de sodio o calcio), ácido láctico, ácido glutárico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido maleico y ácido succínico. Se debe entender que el tampón puede consistir en una mezcla de dos o más componentes, donde la mezcla sea capaz de proporcionar un valor de pH en el intervalo especificado. Como ejemplos se pueden mencionar el ácido acético y el acetato de sodio, etc.

La concentración del tampón se elige de modo de mantener el pH preferido de la composición. En varias realizaciones, la concentración del tampón es de 1-100 mM; 1-50 mM; 1-25 mM; o 2-20 mM.

Se ha observado que los polipéptidos del factor VII son propensos a la autoactivación y autodegradación a medida que el pH aumenta. Por otra parte, los polipéptidos del factor VII son más propensos a dimerizarse y agregarse a medida que el pH disminuye. El intervalo de pH de una composición de un polipéptido del factor VII se elige de modo que se pueda encontrar la mejor manera de resolver esos dos problemas relacionados con el pH. Se puede esperar que dichos intervalos de pH difieran entre los diferentes polipéptidos del factor VII, cuyas características químicas y por lo tanto estructurales difieren entre sí. En una realización de la invención, el pH de la composición se mantiene en el intervalo de 4.5-10, por ejemplo en el intervalo de 5-10; por ejemplo en el intervalo de 9-10. En otra realización de la invención, el pH de la composición se mantiene en el intervalo de 4.5-9.5; por ejemplo, en el intervalo de 4.5-8.5; por ejemplo, en el intervalo de 4.5-7.5; por ejemplo, en el intervalo de 4.5-6.5; por ejemplo, en el intervalo de 4.5-6.0; por ejemplo, en el intervalo de 5.0-6.5; por ejemplo, en el intervalo de 5.0-6.0; por ejemplo, en el intervalo de 5.2 a aproximadamente 5.9.

Cuando se hace referencia a los valores de pH, es aplicable el valor medido a 5 °C aproximadamente.

La composición se mantiene preferentemente a una temperatura a lo sumo de 10 °C, en particular a lo sumo de 5 °C, antes de la aplicación del tratamiento térmico (paso (b)).

En una realización preferida, la composición contiene una sal de calcio o magnesio, como cloruro de calcio o acetato de calcio. Los iones de calcio se unen al polipéptido del factor VII y son necesarios para el correcto plegamiento del dominio Gla del polipéptido del factor VII, de modo que el polipéptido del factor VII, en particular su dominio Gla, quede protegido de la autodegradación proteolítica. Se espera que los iones de magnesio puedan proteger los polipéptidos del factor VII de la misma manera que los iones de calcio.

La composición también puede incluir otros constituyentes, por ej. agentes modificadores de la tonicidad que contribuyen a la osmolalidad de la solución. Dichos modificadores de la tonicidad consisten habitualmente en al menos un agente elegido del grupo constituido por sales neutras, aminoácidos, péptidos de 2-5 residuos de aminoácidos, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos y alcoholes de azúcar. En algunas realizaciones preferidas, la composición consiste en dos o más de dichos agentes combinados. Por "sal neutra" se entiende una sal que no es un ácido ni una base cuando se disuelve en una solución acuosa.

En una realización, al menos un modificador de la tonicidad es una sal neutra elegida de los grupos constituidos por sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio y sales de magnesio, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, acetato de calcio, gluconato de calcio, levulato de calcio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio, gluconato de magnesio y levulato de magnesio.

En una realización preferida, el modificador de la tonicidad consiste en cloruro de sodio en combinación con al menos uno elegido de los grupos constituidos por cloruro de calcio, acetato de calcio, cloruro de magnesio y acetato de magnesio.

En otra realización preferida, el modificador de la tonicidad es al menos uno elegido del grupo constituido por cloruro de sodio, cloruro de calcio, sacarosa, glucosa y manitol.

Habitualmente, el modificador de la tonicidad está presente en una concentración de al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 20 mM, al menos 50 mM, al menos 100 mM, al menos 200 mM, al menos 400 mM, al menos 800 mM, al menos 1000 mM, al menos 1200 mM, al menos 1500 mM, al menos 1800 mM, al menos 2000 mM o al menos 2200 mM.

En una serie de realizaciones, el modificador de la tonicidad está presente en una concentración de 5-2200 mM, por ejemplo de 25-2200 mM, 50-2200 mM, 100-2200 mM, 200-2200 mM, 400-2200 mM, 600-2200 mM, 800-2200 mM, 1000-2200 mM, 1200-2200 mM, 1400-2200 mM, 1600-2200 mM, 1800-2200 mM, or 2000-2200 mM; 5-1800 mM, 25-1800 mM, 50-1800 mM, 100-1800 mM, 200-1800 mM, 400-1800 mM, 600-1800 mM, 800-1800 mM, 1000-1800 mM, 1200-1800 mM, 1400-1800 mM, 1600-1800 mM; 5-1500 mM, 25-1400 mM, 50-1500 mM, 100-1500 mM, 200-1500 mM, 400-1500 mM, 600-1500 mM, 800-1500 mM, 1000-1500 mM, 1200-1500 mM; 5-1200 mM, 25-1200 mM, 50-1200 mM, 100-1200 mM, 200-1200 mM, 400-1200 mM, 600-1200 mM o 800-1200 mM.

A menudo, la composición que contiene el polipéptido del factor VII se obtiene de un paso de purificación precedente. En una realización particularmente importante, un paso de cromatografía de intercambio aniónico precede al paso (a). Se ha observado que se produce una concentración elevada de dímeros del polipéptido del factor VII durante este paso de intercambio aniónico. Por consiguiente, es particularmente útil colocar este paso antes de los pasos de ajuste del pH, calentamiento y enfriamiento de la presente invención que juntos reducen la cantidad de dímeros remanentes.

*Polipéptido del factor VII*

Según se usa en este documento, las expresiones "polipéptido del factor VII" o "polipéptido FVII" significan cualquier proteína que comprende la secuencia de aminoácidos 1-406 del factor VIIa humano de tipo silvestre (es decir un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos dada a conocer en la patente de Estados Unidos N° 4,784,950) y sus variantes así como polipéptidos relacionados con el factor VII, derivados del factor VII y conjugados del factor VII. Esto incluye las variantes del factor VII, los derivados del factor VII y los conjugados del factor VII que tienen prácticamente la misma actividad biológica o mejor respecto al factor VIIa humano de tipo silvestre.

La expresión "factor VII" se entiende que abarca los polipéptidos del factor VII en su forma sin escindir (zimógeno), así como todos los que han sido procesados proteolíticamente para producir sus respectivas formas bioactivas, que se pueden denominar factor VIIa. Normalmente, el factor VII se escinde entre los residuos 152 y 153 para producir el factor VIIa, es decir, la forma activada del factor VII. Dichas variantes del factor VII pueden tener propiedades diferentes respecto al factor VII humano, como estabilidad, unión a fosfolípidos, actividad específica alterada y similares.

El "factor VII" o "factor VIIa" dentro de la definición anterior incluye también variaciones alélicas naturales que pueden existir y producirse entre un individuo y otro. Asimismo, el grado y la ubicación de la glucosilación u otras modificaciones post traducción pueden variar dependiendo de las células huésped elegidas y de la naturaleza del entorno celular del huésped.

Según se usa en este documento, " FVIIa humano de tipo silvestre" es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos dada a conocer en la patente de Estados Unidos N° 4,784,950.

Según se usa en este documento, "polipéptidos relacionados con el factor VII" abarca los polipéptidos, incluidas las variantes, en los cuales la actividad biológica del factor VIIa ha sido modificada sustancialmente, por ejemplo reducida, con respecto a la actividad del factor VIIa de tipo silvestre. Estos polipéptidos incluyen, pero no exclusivamente, el factor VII o el factor VIIa en los cuales se han introducido alteraciones específicas en la secuencia de aminoácidos que modifican o desestabilizan la bioactividad del polipéptido.

La expresión "derivado del factor VII" según se usa en este documento, tiene la intención de designar un polipéptido FVII que tiene prácticamente la misma o mejor actividad biológica respecto al factor VII de tipo silvestre, en el cual uno o más de los aminoácidos del péptido original han sido modificados genéticamente y/o químicamente y/o enzimáticamente, por ejemplo mediante alquilación, glucosilación, PEGilación, acilación, formación de éster o formación de amida, o similares. Esto incluye, pero no exclusivamente, el factor VIIa humano pegilado, el factor VIIa humano pegilado en la cisteína y sus variantes. Los ejemplos no limitantes de derivados del factor VII incluyen derivados de FVII Glucopegilados como los dados a conocer en WO 03/31464 y en las solicitudes de patente de Estados Unidos US 20040043446, US 20040063911, US 20040142856, US 20040137557, US 20040132640, WO2007022512 y US 20070105755 (Neose Technologies, Inc.); los conjugados de FVII como los dados a conocer en WO 01/04287, la solicitud de patente US 20030165996, WO 01/58935, WO 03/93465 (Maxygen ApS) y WO 02/02764, la solicitud de patente US 20030211094 (University of Minnesota).

La expresión "actividad biológica mejor" se refiere a los polipéptidos de FVII con i) prácticamente la misma o mayor actividad proteolítica en comparación con el factor VIIa humano de tipo silvestre recombinante o ii) a polipéptidos FVII que tienen prácticamente la misma o mayor actividad de unión a TF en comparación con el factor VIIa humano de tipo silvestre recombinante o iii) a polipéptidos FVII que tienen prácticamente la misma vida media plasmática o mayor en comparación con el factor VIIa humano de tipo silvestre recombinante.

La expresión " factor VIIa humano pegilado" significa factor VIIa humano, que tiene una molécula de PEG conjugada a un polipéptido del factor VIIa humano. Se debe entender, que la molécula de PEG se puede unir a cualquier parte del polipéptido del factor VIIa por ejemplo cualquier residuo de aminoácido o grupo carbohidrato del polipéptido del factor VIIa.

La expresión " factor VIIa humano pegilado en la cisteína" significa el factor VIIa humano, que tiene una molécula de PEG conjugada a un grupo sulfhidrilo de una cisteína introducida en dicho factor VIIa humano.

La expresión "variante del factor VII" según se usa en este documento, tiene la intención de designar un polipéptido FVII que tiene prácticamente la misma bioactividad o mejor que el factor VII de tipo silvestre, o alternativamente, que tiene la bioactividad sustancialmente modificada o reducida respecto al factor VII de tipo silvestre, y son polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia del factor VII de tipo silvestre por inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos.

Los ejemplos no limitantes de variantes del factor VII que tienen prácticamente la misma actividad proteolítica o mayor que el factor VIIa humano de tipo silvestre recombinante incluyen S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino et al., Arch.

Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); las variantes de FVIIa que tienen mayor estabilidad proteolítica como las dadas a conocer en la patente de Estados Unidos N° 5,580,560; el factor VIIa que ha sido escindido proteolíticamente entre los residuos 290 y 291 o entre los residuos 315 y 316 (Mollerup et al., Biotechnol. Bioeng. 48:501-505, 1995); las formas oxidadas del factor VIIa (Kornfelt et al., Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999); las variantes de FVII como las dadas a conocer en PCT/DK02/00189 (correspondiente a WO 02/077218); y las variantes de FVII que tienen mayor estabilidad proteolítica como las dadas a conocer en WO 02/38162 (Scripps Research Institute); las variantes de FVII que tienen un dominio Gla modificado y tienen mayor unión a la membrana como las dadas a conocer en WO 99/20767, las patentes de Estados Unidos US 6017882 y US 6747003, la solicitud de patente de Estados Unidos 20030100506 (University of Minnesota) y WO 00/66753, las solicitudes de patente de Estados Unidos US 20010018414, US 2004220106 y US 200131005, las patentes de Estados Unidos US 6762286 y US 6693075 (University of Minnesota); y las variantes de FVII como las dadas a conocer en WO 01/58935, la patente de Estados Unidos US 6806063, la solicitud de patente de Estados Unidos 20030096338 (Maxygen ApS), WO 03/93465 (Maxygen ApS), WO 04/029091 (Maxygen ApS), WO 04/083361 (Maxygen ApS), y WO 04/111242 (Maxygen ApS), así como en WO 04/108763 (Canadian Blood Services).

Los ejemplos no limitantes de variantes de FVII que tienen mayor actividad biológica en comparación con FVIIa de tipo silvestre incluyen las variantes de FVII como las dadas a conocer en WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, WO 03/027147, WO 04/029090, WO 05/075635 y la solicitud de patente europea número de solicitud 05108713.8 (Novo Nordisk A/S), WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y las variantes de FVIIa que tiene mayor actividad como s dadas a conocer en JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.)

Los ejemplos de variantes del factor VII incluyen, pero no exclusivamente, P10Q-FVII, K32E-FVII, P10Q/K32E-FVII, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, y S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII,

F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII,  
 F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII,  
 F374Y/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII,  
 5 F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII,  
 F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII,  
 F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII,  
 10 F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII,  
 F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII,  
 F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII,  
 F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-  
 FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A -FVII,  
 15 F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII,  
 20 F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII,  
 25 F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,  
 30 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A-Factor VII, S60A-Factor VII; R152E-Factor VII,  
 S344A-Factor VII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-  
 FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; y FVII que tiene sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de  
 aminoácidos entre 233Thr y 240Asn; FVII que tiene sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de  
 35 aminoácidos entre 304Arg y 329Cys; y FVII que tiene sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de  
 aminoácidos entre 153Ile y 223Arg.

Por lo tanto, las variantes de sustitución en un polipéptido del factor VII incluyen, pero no exclusivamente,  
 40 sustituciones en las posiciones P10, K32, L305, M306, D309, V158, E296, K337, M298, S336, S314, K316, F374,  
 S52, S60, R152, S344, T106, K143, N145, V253, R290, A292, G291, R315, V317, y sustituciones, adiciones o  
 deleciones en la secuencia de aminoácidos entre T233 y N240 o entre R304 y C329; o entre I153 y R223, o sus  
 combinaciones, en particular variantes como P10Q, K32E, L305V, M306D, D309S, L305I, L305T, F374P, V158T,  
 M298Q, V158D, E296V, K337A, M298K, M298Q, S336G, S314E, K316H, K316Q, F374Y, S52A, S60A, R152E,  
 S344A, T106N, K143N, N145T, V253N, R290N, A292T, G291N, R315N, V317T, y sustituciones, adiciones o  
 45 deleciones en la secuencia de aminoácidos entre T233 y N240, o entre R304 y C329, o entre I153 y R223, o sus  
 combinaciones.

La actividad biológica del factor VIIa en la coagulación de la sangre deriva de su capacidad para (i) unirse al factor  
 tisular (TF) y (ii) catalizar la escisión proteolítica del factor IX o el X factor para producir los factores IX o X activados  
 50 (factores IXa o Xa, respectivamente).

A los efectos de la invención, la actividad biológica de los polipéptidos del factor VII se puede cuantificar midiendo la  
 capacidad de una preparación para promover la coagulación de la sangre, cp. con ensayo 4 descrito en este  
 documento. En este ensayo, la actividad biológica se expresa como la reducción en el tiempo de coagulación con  
 55 respecto a una muestra de control y se convierte a "unidades de factor VII" por comparación con un estándar de  
 suero humano combinado que contiene 1 unidad/mL de actividad del factor VII. Alternativamente, la actividad  
 biológica del factor VIIa se puede cuantificar (i) midiendo la capacidad del factor VIIa o de un polipéptido relacionado  
 con el factor VII para producir el factor X activado (factor Xa) en un sistema que contiene el TF incorporado en una  
 membrana lipídica y factor X. (Persson et al., J. Biol. Chem. 272:19919-19924, 1997); (ii) midiendo la hidrólisis del  
 60 factor X en un sistema acuoso ("Ensayo de proteólisis in vitro", véase el ensayo 2 más adelante); (iii) midiendo la  
 unión física del factor VIIa o de un polipéptido relacionado con el factor VII a TF empleando un instrumento basado  
 en resonancia de plasmones superficiales (Persson, FEBS Letts. 413:359-363, 1997); (iv) midiendo la hidrólisis de  
 un sustrato sintético por el factor VIIa y/o un polipéptido relacionado con el factor VII ("Ensayo de hidrólisis in vitro",  
 véase el ensayo 1 más adelante); o (v) midiendo la generación de trombina en un sistema in vitro independiente de

TF (véase el ensayo 3 más adelante).

Las variantes del factor VII que tienen prácticamente la misma actividad biológica o mejor respecto al factor VIIa de tipo silvestre abarcan las que tienen al menos aproximadamente 25%, preferentemente al menos aproximadamente 50%, más preferentemente al menos aproximadamente 75% y muy preferentemente al menos aproximadamente 90% de la actividad específica del factor VIIa que ha sido producido en el mismo tipo de células, cuando se analizan en uno o más de: un ensayo de coagulación (ensayo 4), un ensayo de proteólisis (ensayo 2) o un ensayo de unión a TF como los descritos antes. Las variantes del factor VII que tienen la actividad biológica sustancialmente reducida respecto al factor VIIa de tipo silvestre son las que tienen menos de aproximadamente 25%, preferentemente menos de aproximadamente 10%, más preferentemente menos de aproximadamente 5% y muy preferentemente menos de aproximadamente 1% de la actividad específica del factor VIIa de tipo silvestre que ha sido producido en el mismo tipo de células cuando se analizan en uno o más de: un ensayo de coagulación (ensayo 4), un ensayo de proteólisis (ensayo 2), o un ensayo de unión a TF como los descritos antes. Las variantes del factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente modificada respecto al factor VII de tipo silvestre incluyen, pero no exclusivamente, las variantes del factor VII que tienen la actividad proteolítica del factor X independiente de TF y las que se unen a TF pero no escinden al factor X.

*Paso (a) - Ajuste del pH*

En el primer paso no obligatorio, paso (a), el pH de la composición, si fuera necesario, se ajusta a un valor en el intervalo de 4.5-10.0. Como se mencionó antes, esto se alcanza habitualmente mediante adición de uno o más tampones. Las composiciones que ya tienen un pH dentro del intervalo especificado no necesitan, por supuesto, que se les ajuste el pH, pero puede ser deseable ajustarles el pH, por ejemplo a la vista de cualquier paso posterior de activación y formulación.

El paso de ajuste del pH de la composición también puede incluir dilución o concentración (por ejemplo evaporación del solvente) de la composición.

La composición se mantiene preferentemente a una temperatura a lo sumo de 10 °C, en particular a lo sumo de 5 °C, más particularmente próximo a 0 °C, durante el paso (a).

*Paso (b) - Tratamiento térmico*

El tratamiento térmico es el paso fundamental del método de reducción del contenido de dímeros en la composición.

Se encontró que la temperatura de calentamiento debe ser de al menos 20 °C para que tenga lugar la reducción del contenido de dímeros, al menos en un plazo razonable, por ej. en el correr de 72 horas. Por otra parte, se cree que una temperatura de calentamiento superior a 50 °C causará riesgo de desnaturalización (y por lo tanto desactivación) del polipéptido del factor VII.

El calentamiento hasta la temperatura deseada se puede lograr colocando un recipiente que contenga la composición en un baño termostatzado, por ejemplo, en un baño de aceite, en un baño de agua o en una estufa. El tiempo necesario para alcanzar la temperatura deseada dependerá del coeficiente de transmisión del calor del recipiente versus el medio circundante. A menudo es deseable, que la temperatura deseada se alcance tan rápido como sea posible, o que al menos una temperatura de 20 °C, o una temperatura aproximadamente 5 °C inferior al punto fijado, se alcance tan pronto como sea posible. En realizaciones alternativas, el tratamiento térmico se lleva a cabo de modo continuo o discontinuo en un reactor de flujo continuo, donde el tiempo de flujo continuo corresponde al período deseado para el tratamiento térmico. Una serie de realizaciones prácticas resultarán evidentes para los expertos en el área.

La temperatura deseable y el período necesario para el tratamiento térmico se pueden determinar, por ej., en un modelo experimental como el descrito como Ejemplo 2 en este documento. El período mínimo necesario para el tratamiento térmico es generalmente de alrededor de 5 minutos, por ejemplo de 10 minutos, mientras que el período máximo puede ser en principio de varios o muchos días, por ej. 168 horas. Por razones prácticas, el período para el tratamiento es preferentemente de 10 minutos a 72 horas.

Se cree que el tratamiento térmico prolongado podría causar la formación de dímeros de un tipo diferente del que es reducido por el tratamiento térmico. Esta hipótesis es respaldada por las observaciones del ejemplo 2, en el que el tratamiento térmico a 37 °C por más de 10 horas resulta en realidad en una nueva formación significativa de dímeros.

Dicho esto, el período preferido para el tratamiento térmico a 30-45 °C es habitualmente de 10-600 minutos. El período preferido para el tratamiento térmico a 20-30 °C es habitualmente de 5-72 horas, y el período preferido para el tratamiento térmico a 35-50 °C es habitualmente de 10-300 minutos. En la realización actualmente más preferida,



el tratamiento térmico tiene lugar a alrededor de 37 °C durante 10-120 minutos.

5 Se debe entender que la optimización del método de la invención podría conducir a un tratamiento térmico que no necesariamente implique una temperatura constante, pero que a su vez podría ser ventajoso utilizar un aumento gradual o escalonado de la temperatura y/o una disminución gradual o escalonada de la temperatura dentro del intervalo de temperatura global de 20-50 °C.

10 El propósito del tratamiento térmico es reducir el contenido de dímeros en la composición que contiene el polipéptido del factor VII. En particular, se debería esperar una reducción significativa para justificar los pasos adicionales en el proceso de producción global. Por lo tanto, es preferible que el nivel de dímeros (según lo determinado por el método de GPC de HMWP descrito) en dicha composición, expresado como puntos porcentuales en comparación con el agrupamiento total de polipéptido del factor VII se haya reducido en al menos un factor de 1.2, como por ejemplo en al menos un factor de 1.5, en particular en al menos un factor de 2, o incluso en al menos un factor de 3.

15 Se prevé que el contenido de dímeros se pueda reducir a un nivel por debajo del 5%, en particular a un nivel por debajo del 4%, y más preferentemente a un nivel por debajo del 3%, o incluso a un nivel por debajo del 2% o incluso más preferentemente a un nivel por debajo del 1.5%.

20 *Paso (c) - Enfriamiento*

La composición se enfría posteriormente hasta una temperatura a lo sumo de 10 °C, por ejemplo a lo sumo de 5 °C. Es ventajoso llevar a cabo el enfriamiento bastante rápidamente, por ejemplo enfriando en un baño de hielo (aprox. 0° C), o agregando hielo a la composición. Alternativamente, y como antes, el enfriamiento se puede realizar en un reactor de flujo continuo. Enfriando rápidamente, se puede evitar la existencia prolongada de las condiciones en las que se pueden volver a formar los dímeros (por ej. a temperaturas de 5-15 °C).

30 Después de enfriada, la composición puede ser sometida a otros pasos del proceso. Se toma en cuenta que esos pasos del proceso preferentemente no deberían causar ninguna nueva formación significativa de dímeros. Dicho esto, en una realización preferida, el polipéptido del factor VII se activa en un paso posterior al paso (b), es decir, el polipéptido del factor VII se activa antes o después de enfriar la composición. Preferentemente el polipéptido del factor VII se activa en un paso posterior al proceso térmico porque la activación puede ser difícil de controlar durante el calentamiento.

35 *Realización preferida*

En una realización particularmente preferida, la invención se refiere a un método para reducir el contenido de dímeros en una composición que contiene una variante del factor VII, donde dicho método comprende los pasos de:

- 40 (a) si fuera necesario, ajustar el pH de dicha composición a un valor en el intervalo de 5.0-6.5;
- (b) calentar la composición hasta una temperatura en el intervalo de 30-45 °C durante un período en un intervalo de 200-600 minutos; y
- 45 (c) posteriormente enfriar la composición hasta una temperatura a lo sumo de 5 °C.

*Realización preferida*

50 En una segunda realización particularmente preferida, la invención se refiere a un método para reducir el contenido de dímeros en una composición que contiene una variante del factor VII, donde dicho método comprende los pasos de:

- (a) si fuera necesario, ajustar el pH de dicha composición a un valor en el intervalo de 9.0-10.0;
- 55 (b) calentar la composición hasta una temperatura en el intervalo de 30-45 °C durante un período en un intervalo de 200-600 minutos; y
- (c) posteriormente enfriar la composición hasta una temperatura a lo sumo de 5 °C.

60 *Preparación y purificación de los polipéptidos del factor VII*

El factor VIIa humano purificado aplicable en el método de la presente invención se prepara preferentemente mediante tecnología de recombinación del ADN, por ejemplo según describen Hagen et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83:2412-2416, 1986 o según se describe en la patente europea N° 0 200 421 (ZymoGenetics, Inc.)

El factor VII también se puede producir por los métodos descritos por Broze y Majerus, *J.Biol.Chem.* 255 (4): 1242-1247, 1980 y Hedner y Kisiel, *J.Clin.Invest.* 71: 1836-1841, 1983. Estos métodos producen el factor VII sin cantidades detectables de otros factores de la coagulación sanguínea. Una preparación aún más purificada del factor VII se puede obtener mediante inclusión de una filtración en gel adicional como paso final de purificación. El factor VII se convierte después en el factor VIIa activado por medios conocidos, por ejemplo por varias proteínas plasmáticas diferentes, como el factor XIIa, IXa o Xa. Alternativamente, como describen Bjoern et al. (*Research Disclosure*, 269 septiembre de 1986, pp. 564-565), el factor VII se puede activar pasándolo por una columna de cromatografía de intercambio iónico, como una Mono Q® (Pharmacia fine Chemicals) o similar, o por autoactivación en solución. Preferentemente, los pasos del método de la invención se aplican inmediatamente antes de la activación del polipéptido del factor VII.

Los polipéptidos relacionados con el factor VII se pueden producir por modificación del factor VII de tipo silvestre o por tecnología de recombinación del ADN. Los polipéptidos relacionados con el factor VII con secuencia de aminoácidos alterada en comparación con el factor VII de tipo silvestre se pueden producir modificando la secuencia del ácido nucleico que codifica el factor VII de tipo silvestre ya sea alterando los codones de aminoácidos o por eliminación de algunos de los codones de aminoácidos del ácido nucleico que codifica el factor VII natural por medios conocidos, por ej. mutagénesis de sitio específico.

Será evidente para los expertos que se pueden realizar sustituciones fuera de las regiones fundamentales para la función de la molécula del factor VIIa y que de todos modos se produzca un polipéptido activo. Los residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido del factor VII, y por consiguiente preferentemente no sujetos a sustitución, se pueden identificar mediante procedimientos conocidos, como mutagénesis dirigida o mutagénesis por barrido de alanina (véase, por ej., Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la última técnica, se introducen mutaciones en cada residuo de la molécula cargado positivamente, y se prueba la actividad coagulante, respectivamente reticulante de las moléculas mutantes resultantes para identificar residuos de aminoácidos que sean fundamentales para la actividad de la molécula. Los sitios de interacción sustrato-enzima también se pueden determinar mediante análisis de la estructura tridimensional según se determina por técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcado por fotoafinidad (véase, por ej., de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *Journal of Molecular Biology* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Letters* 309: 59-64).

La introducción de una mutación en la secuencia del ácido nucleico para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido se puede llevar a cabo por mutagénesis dirigida empleando cualquiera de los métodos conocidos. Es particularmente útil el procedimiento que utiliza un vector de ADN bicatenario, superenrollado con un inserto de interés y dos cebadores sintéticos que contienen la mutación deseada. Los cebadores del oligonucleótido, cada uno complementario a la hebra opuesta del vector, se extienden durante el ciclo de temperatura por medio de la Pfu ADN polimerasa. Al incorporarse los cebadores, se genera un plásmido mutado que contiene mellas escalonadas. Después del ciclo de temperatura, el producto se trata con DpnI que es específica para el ADN metilado y hemimetilado para digerir la plantilla del ADN original y para seleccionar el ADN sintetizado que contiene la mutación. Se pueden emplear otros procedimientos conocidos para crear, identificar y aislar variantes, como por ejemplo, barajado de genes o técnicas de presentación en fago.

La separación de polipéptidos de sus células de origen se puede lograr por cualquier método conocido incluidos, pero no exclusivamente, extracción del medio de cultivo celular que contiene el producto deseado de un cultivo celular adherente; centrifugación o filtración para separar las células no adherentes; y similares.

Opcionalmente, los polipéptidos del factor VII se pueden purificar posteriormente. La purificación se puede lograr utilizando cualquier método conocido, entre otros, pero no exclusivamente, cromatografía de afinidad, como, por ejemplo, en una columna de anticuerpo anti-factor VII (véase, por ejemplo, Wakabayashi et al., *J. Biol. Chem.* 261:11097, 1986; y Thim et al., *Biochem.* 27:7785, 1988); cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de intercambio iónico; cromatografía de exclusión por tamaño; procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoeléctrico preparativo (IEF), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), o extracción y similares. Véase, en general, Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, Nueva York, 1982; y *Protein Purification*, J.C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989. Luego de la purificación, la preparación contiene preferentemente menos de 10% en peso, más preferentemente menos de 5% y muy preferentemente menos de 1% de polipéptidos que no son del factor VII derivados de la célula huésped.

Los polipéptidos del factor VII se pueden activar por escisión proteolítica, utilizando factor XIIa u otras proteasas que tengan especificidad tipo tripsina, como por ejemplo, factor IXa, calicreína, factor Xa y trombina. Véase, por ej., Osterud et al., *Biochem.* 11:2853 (1972); Thomas, patente de los Estados Unidos N° 4,456,591; y Hedner et al., *J. Clin. Invest.* 71:1836 (1983). Alternativamente, los polipéptidos del factor VII se pueden activar pasando a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico como Mono Q® (Pharmacia) o análoga, o por autoactivación en solución. Preferentemente los pasos del método de la invención se aplican, como se mencionó antes, inmediatamente antes de la activación del polipéptido del factor VII.

El polipéptido del factor VII activado resultante se puede después formular y administrar como se describe en el área.

5 Los ejemplos siguientes ilustran la práctica de la invención. Estos ejemplos se incluyen únicamente con fines ilustrativos y no tiene la intención den limitar el alcance de la invención reivindicada en modo alguno.

## Ejemplos

### Métodos

10

#### Determinación del contenido de dímeros - Método GPC de HMWP

15 Se utilizó un método de cromatografía de exclusión por tamaño, SE-HPLC, para analizar muestras de FVIIa en condiciones no disociativas. El contenido de HMWP (proteínas de alto peso molecular), es decir agregados de FVIIa en forma de dímeros, oligómeros y polímeros, se determinó mediante el % de área con respecto al pico del producto monómero diana.

20 La columna utilizada fue una Waters Protein Pak 300 SW (7.5 \* 300 mm, correspondiente a un volumen de columna de 13.25 mL) o una columna con especificaciones similares. Las condiciones analíticas generales fueron:

Temperatura: TA (21-25 °C); detección: detección UV a la salida de la columna a 215 nm; flujo: 0.5 ml/min correspondiente a 2.25 CV/h.

25 La corrida analítica se realizó usando un tampón de corrida con la composición siguiente: sulfato de amonio 0.2 M, isopropanol al 5%, ajustado a pH 7.0.

30 Luego de equilibrar la columna y utilizando 0.5 CV de tampón de corrida, se descongelaron muestras de FVIIa que contenían aproximadamente 1 mg de FVIIa/ml y se analizaron concentradas mediante la inyección de un volumen de muestra de 25 microlitros (correspondiente un volumen de muestra de 0.2% con respecto al volumen de la columna).

La muestra fue seguida de elución por 1.5 CV.

35 Un cromatograma consta generalmente de dos picos principales y dos picos menores, como se ilustra en la figura 3. Como se observa desde la izquierda, se ven dos picos que representan a HMWP (picos de polímero y dimer/oligómero). El primer pico principal representa al monómero de FVIIa y el segundo pico principal representa el pico de la sal.

#### *Ejemplo 1 -Tratamiento térmico de una variante del factor VIIa a 37 °C*

40

Se filtró una solución de 1.5 mg/mL de una variante de FVIIa en CaCl<sub>2</sub> 15 mM, NaCl 30 mM, histidina 10 mM, pH 6.0 (a 5 °C) a través de un filtro de 0.22 micrómetros a un frasco de HDPE de 700 mL. Se ajustó el pH a 5.8 (a 5 °C) utilizando HCl 1 M o NaOH 1 M. El frasco se colocó en un baño de agua a una temperatura de 37 °C. Elevar la temperatura del frasco de HDPE hasta 37 °C llevó aproximadamente 20 minutos. A los 45 minutos de que la solución hubiera alcanzado los 37 °C, la reacción se detuvo colocando el frasco en hielo.

50 Se determinó por GPC que el contenido inicial de dímeros era de 7.3% y se redujo a 2.8% luego del tratamiento térmico. Por consiguiente, el tratamiento térmico a 37 °C durante 45 minutos pareció ser suficiente para reducir el contenido de dímeros en un factor de más de 2.

El desarrollo de la reducción del contenido de dímeros para un experimento similar conducido durante un total de 120 minutos se ilustra en la figura 1. El experimento se controló mediante recolección frecuente de muestras, congelamiento rápido de las muestras a -80 °C; y análisis subsiguiente (véase más adelante).

#### *Ejemplo comparativo 1 -Almacenamiento de una variante del factor VIIa a 5-8 °C*

55

Se filtró una solución de 1.5 mg/mL de una variante de FVIIa en CaCl<sub>2</sub> 15 mM, NaCl 30 mM, histidina 10 mM, pH 6.0 (a 5 °C) a través de un filtro de 0.22 micrómetros a un frasco de HDPE de 700 mL. Se ajustó el pH a 5.8 (a 5 °C) utilizando HCl 1 M o NaOH 1 M. El frasco se colocó en un baño de agua a una temperatura de 5-8 °C. Después de 60 minutos, la reacción se detuvo colocando el frasco en hielo.

60 El contenido inicial de dímeros fue de 7.7% - Luego del tratamiento fue de 7.9%.

#### *Ejemplo 2 - Tratamiento térmico prolongado de una variante del factor VIIa a 23 °C y 37 °C*

Se llevó a cabo un experimento de tratamiento térmico a 37 °C esencialmente como se describe en el ejemplo 1 (pH 5.7) durante un total de 48 horas y se llevó a cabo un experimento similar a 23 °C durante un total de 48 horas. Ambos experimentos se controlaron mediante recolección frecuente de muestras, congelamiento rápido de las muestras a -80 °C; y análisis subsiguiente (véase más adelante). El desarrollo de la reducción del contenido de dímeros empleando las dos temperaturas diferentes se ilustra en la figura 2. A 37 °C, se observó una rápida caída en el contenido de dímeros, en tanto la disminución del contenido de dímeros para la muestra a 23 °C fue más lenta y posiblemente el contenido de dímeros no haya alcanzado su mínimo después de 48 horas. Estos tipos de experimentos se pueden usar para determinar las condiciones óptimas (el período suficiente para el tratamiento térmico) para otros polipéptidos del factor VII y a otras temperaturas elegidas.

A efectos de comparación, se dejó una muestra (similar al Ejemplo comparativo 1; pH 5.7) durante un total de 48 horas a 5-8 °C. Se observó un ligero aumento en el contenido de dímeros en este caso (véase Figura 2; curva superior).

*Ejemplo 3 - Tratamiento térmico prolongado de una variante del factor VIIa a pH 9.5*

Se llevó a cabo un experimento de tratamiento térmico, esencialmente como se describe en el ejemplo 1, durante un total de 168 horas; sin embargo, el ajuste inicial de pH se aumentó de pH 5.8 a pH 9.5. El experimento se controló mediante recolección frecuente de muestras, congelamiento rápido de las muestras a -80 °C; y análisis subsiguiente. El desarrollo de la reducción del contenido de dímeros a pH elevado se ilustra en la figura 4. A pH 9.5 se observó una caída rápida similar en el contenido de dímeros, seguido de una formación de dímeros lenta.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para reducir el contenido de dímeros en una composición que contiene un polipéptido del factor VII, que comprende los pasos de:
- (a) si fuera necesario, ajustar el pH de dicha composición a un valor en el intervalo de 5.0-10.0 (según lo determinado a 5 °C);
- 10 (b) calentar la composición hasta una temperatura en el intervalo de 20 a 50 °C durante un período de al menos 5 minutos; y
- (c) posteriormente enfriar la composición hasta una temperatura a lo sumo de 10 °C.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura del paso (b) está en el intervalo de 30-45 °C y el período de calentamiento del paso (b) en el intervalo de 10-600 minutos.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el pH se ajusta a un valor de 5.0-6.5 en el paso (a).
- 20 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el polipéptido del factor VII es una variante del factor VII.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición contiene una sal de calcio.
- 25 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el nivel de dímeros en dicha composición expresado como puntos porcentuales con respecto al agrupamiento total de polipéptidos del factor VII, se redujo en al menos un factor de 2.
- 30 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido del factor VII es activado en un paso posterior al paso (b).
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que un paso de cromatografía de intercambio aniónico precede al paso (a).
- 35

Figura 1

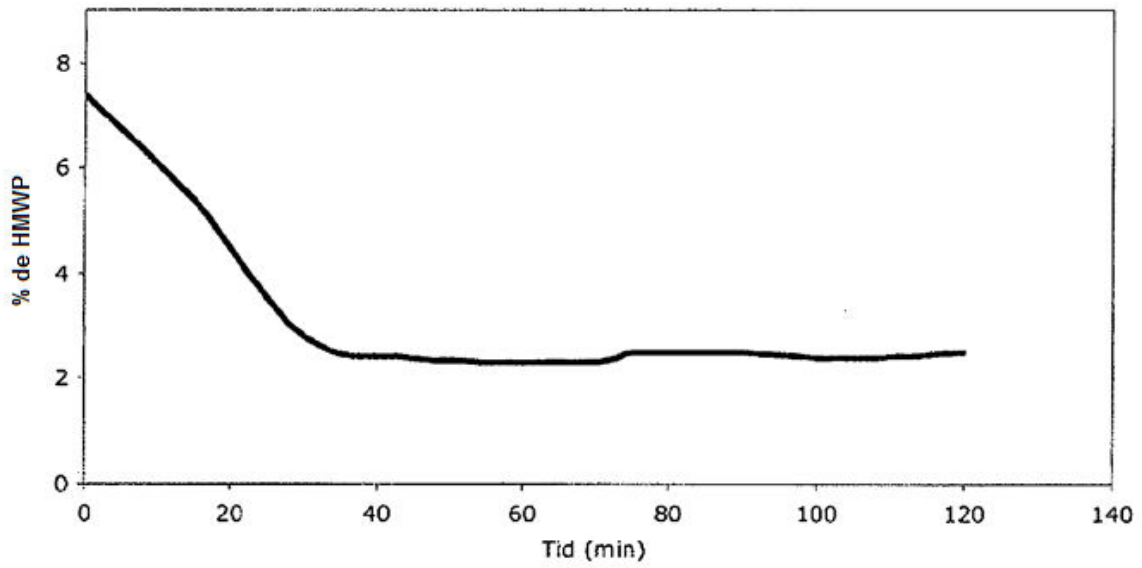


Figura 2

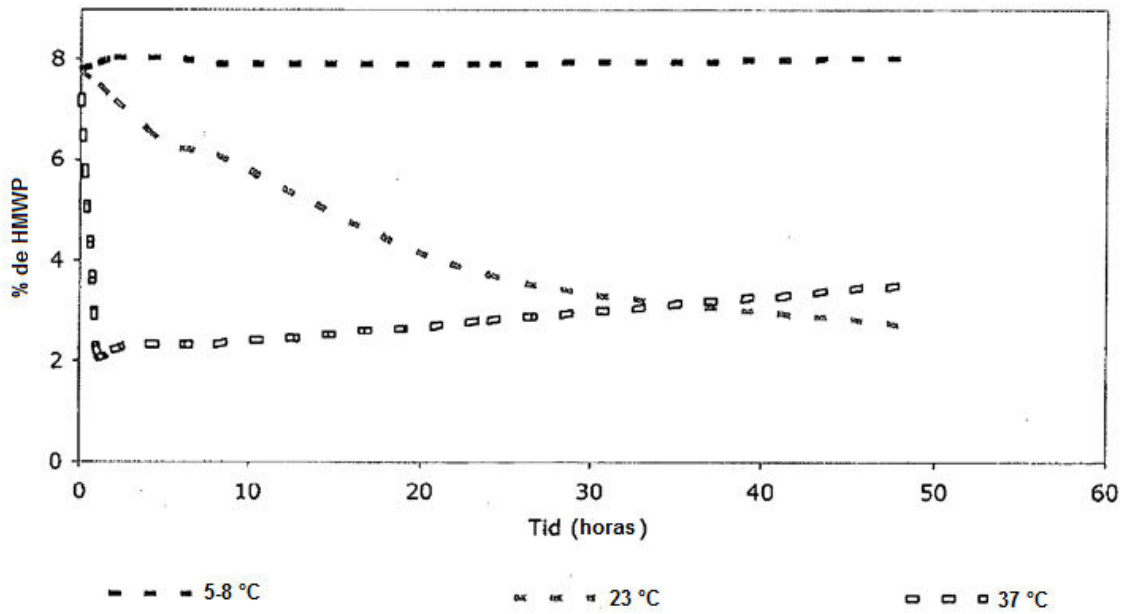


Figura 3

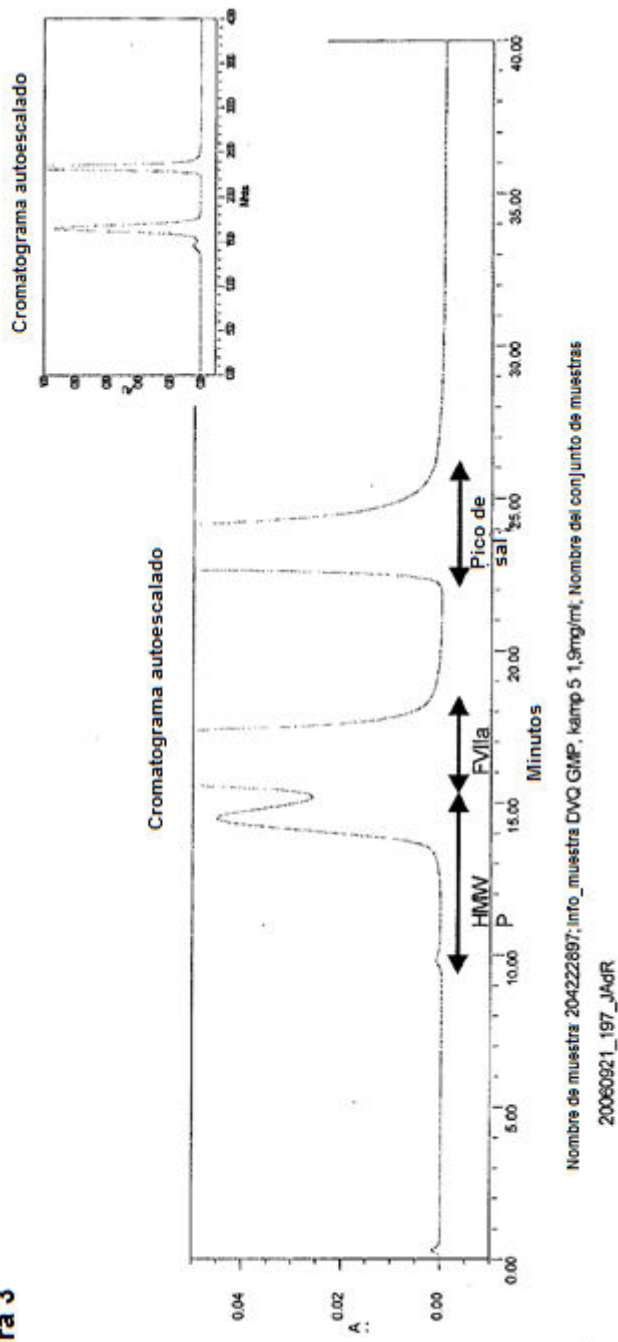


Figura 4

