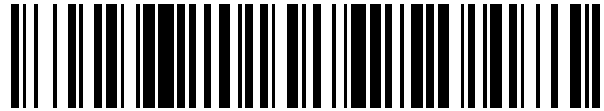


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 074**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2009 E 09753973 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2285829**

54 Título: **Método de control de una reacción de modificación de polipéptidos**

30 Prioridad:

30.05.2008 EP 08157300

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

22.10.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SEJERGAARD, LARS y
KRARUP, JANUS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 549 074 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

Método de control de una reacción de modificación de polipéptidos

Campo de la invención

5 [0001] La invención se refiere a un método de control de una reacción de modificación de polipéptidos, en particular pero no exclusivamente, a un método de control de la activación del factor VII humano (FVII) para producir factor VII(a) humano (FVII(a)). La invención también se refiere a polipéptidos que se pueden obtener mediante la reacción de modificación de polipéptidos y a composiciones farmacéuticas que contienen dichos polipéptidos.

Antecedentes de la invención

10 [0002] La coagulación sanguínea es un proceso que consiste en una compleja interacción de diversos componentes (o factores) sanguíneos que finalmente da lugar a un coágulo de fibrina. En general, los componentes sanguíneos, que participan en la que ha sido denominada "cascada" de la coagulación, son proteínas enzimáticamente inactivas (proenzimas o zimógenos) que se convierten en enzimas proteolíticas por la acción de un activador (que en sí mismo es un factor de la coagulación activado). Los factores de la coagulación que han sufrido dicha conversión se denominan generalmente "factores activos" y se designan mediante la adición de la letra "a" al nombre del factor de la coagulación (por ej. Factor VII(a))

15 [0003] FVII (también conocido como FVII monocatenario, FVII inactivado o zimógeno) es una única cadena polipeptídica, que por escisión proteolítica del enlace peptídico entre Arg152 e Ile153 se convierte en la forma activada: FVII(a). Esta reacción puede ser catalizada por autoproteólisis de FVII(a) o por otras enzimas como FXa o el veneno de la víbora de Russel. La autoactivación tiene la ventaja de que no se necesita agregar ni extraer físicamente ninguna enzima al final del proceso

20 [0004] Es muy importante poder controlar la activación de FVII cuidadosamente, dado que el contenido de los productos de degradación de la cadena pesada (AA290 y AA315) aumenta drásticamente una vez que se alcanza una proporción de activación de más del 99% (es decir, una vez que se agota el sustrato preferido de Arg 152). Por lo tanto, es crucial no sobreactivar el producto. Al mismo tiempo es deseable una alta proporción de activación por ejemplo, por encima del 94%, lo que deja un intervalo bastante estrecho (por ejemplo, 94-99%) en el que se puede obtener tanto un bajo contenido de degradación como una alta actividad.

25 [0005] Una cierta cantidad de activación enzimática tendrá lugar simultáneamente durante la purificación de la enzima. Además, los niveles de activación durante el proceso de purificación variarán inevitablemente debido a variaciones en la composición del material de partida - principalmente el título de FVII(a) y por lo tanto la carga de la columna. Un tiempo de retención inesperado durante la purificación también dará lugar a variaciones en los niveles de activación. Durante la purificación, las moléculas de FVII(a) experimentarán diferentes condiciones con respecto a concentración, pH, temperatura y tiempo de residencia, lo que dará lugar a la activación parcial. Se observó que luego de la purificación la proporción de activación varió ampliamente (por ejemplo, de 16% a 74%) dependiendo de la técnica y las condiciones de purificación. Esta variación en la proporción de activación luego de la purificación crea un problema importante con respecto a llevar adelante un proceso de activación estandarizado luego de la purificación.

30 [0006] La proporción de activación de FVII se puede calcular a través de procedimientos conocidos, sin embargo, no existe actualmente ninguna técnica de medición en tiempo real y los procedimientos conocidos tienen por lo general una duración de aproximadamente 30 minutos. Por consiguiente, si la proporción de activación se aproxima a 99% luego de la extracción de la muestra para la medición, entonces este valor será superado para cuando se obtengan los resultados. Esto resultará en altos niveles de productos de degradación de la cadena pesada indeseables.

35 [0007] US 4,286,056 (Baxter Travenol Lab) describe un método para producir concentrado del complejo activado de protrombina, que comprende controlar el grado de activación determinando el estado de activación del material de partida y después variando al menos una de las condiciones de activación según los análisis del progreso de la activación del material de partida para llegar a un nivel de activación predeterminado. WO 2007/013993 (Maxygen Holdings Ltd) describe un método para activar FVII a FVII(a) en solución, que comprende agregar un compuesto de amina, Ca^{2+} , ajustar el pH final de la solución entre aproximadamente 7.2 y 8.6, incubar la mezcla de activación resultante entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 25 °C por un tiempo suficiente para convertir al menos el 90% de scFVII a FVII(a). US 4,456,591 (Baxter Travenol Lab) describe un proceso de administración a un paciente que tiene un defecto en un factor de la coagulación como una deficiencia o un inhibidor, de una cantidad hemostática eficaz de una composición en la que el único agente hemostático eficaz activado es el factor VII(a).

[0008] Por lo tanto existe una gran necesidad de proporcionar un método mejorado para determinar el tiempo de reacción óptimo a fin de proporcionar los niveles deseados de enzima modificada.

55 [0009] La invención actual también proporciona un producto más puro de proteasa. Un producto más puro es menos probable que dé lugar a la formación de anti-proteasa (anticuerpos) en el paciente.

[0010] Además, el control estricto de la velocidad de activación de la proteasa se traduce finalmente en menor desperdicio en una planta de producción, puesto que se desecharán menos lotes de producción cuando un mayor número de lotes cumpla con los requisitos especificados en términos de pureza y uniformidad de la calidad.

Resumen de la invención

5 [0011] Según un aspecto de la invención se proporciona un método de control de la autoactivación del factor VII, o de un análogo o derivado de éste, que comprende los pasos de:

(a) medir la concentración inicial del factor VII/VIIa, o del análogo o derivado de éste;

(b) medir la proporción inicial del factor VII activado, o del análogo o derivado de éste;

10 (c) calcular el tiempo de reacción de la activación del factor VII, o del análogo o derivado de éste, mediante correlación de los valores medidos en cada uno de los pasos (a) y (b) con un valor de la proporción requerida de factor VII activado, o del análogo o derivado de éste, donde el tiempo de reacción, t , se calcula según la fórmula (I):

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{akt_0 \cdot (akt-1)}{akt \cdot (akt_0-1)}\right)}{k(T) \cdot xb \cdot F_0}$$

(I)

15 en la que "akt" se refiere a la proporción requerida de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, "akt₀" se refiere a la proporción inicial de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, medida en el paso (b), "F₀" se refiere a la concentración inicial del factor VII, o del análogo o derivado de éste, (en g/l) medida en el paso (a), $k(T)$ se refiere a la constante de reacción para la reacción dada (en L/g/min) como una función de la temperatura, T , y xb se refiere a la fracción molar, calculada según la ecuación de la fórmula (III),

$$xb = \frac{10^{pH-7.61}}{1 + 10^{pH-7.61}}$$

(III)

20 en la que pH se refiere al pH elegido de la reacción;

(d) realizar, a un pH de 6.0 a 8.0, la reacción de activación del factor VII durante el tiempo calculado en el paso (c); y

(e) finalizar la reacción después del tiempo de reacción calculado en el paso (c), finalización que comprende reducir el pH a un valor por debajo de aproximadamente 6.0, como por ejemplo entre 5.5 y 6.0.

25 [0012] Según otro aspecto de la invención se proporciona un polipéptido que se puede obtener según el método definido antes.

Figuras

[0013]

30 La figura 1 ilustra el concepto general de la invención. Con aportes variados, el proceso asegura que la producción es esencialmente constante y predecible.

La figura 2 ilustra la importancia de regular estrechamente el grado al cual se activa la proteasa. A medida que el grado de activación (%) aumenta de 99.5% a 100%, el porcentaje de producto degradado (proteasa) aumenta exponencialmente.

35 La figura 3 ilustra que cuanto más enzima (es decir, proteasa) hay presente en un lote, más rápidamente se producirá la activación de la proteasa. La fracción molar (xb) informada como porcentaje se puede encontrar usando el diagrama de Henderson-Hasselbach. La fracción activa de la enzima se puede calcular para cualquier pH. La correlación no es lineal.

La figura 4 muestra que la concentración de FVII(a) obtenido es dependiente de la concentración. A alta concentración de FVII(a), la velocidad de activación de FVII es mayor que a baja concentración de FVII(a).

40 La figura 5 muestra que la concentración de FVII(a) obtenida es dependiente del pH. A mayor pH (6.8) la velocidad de activación de FVII es mayor; a menor pH (6.2), la velocidad activación de FVII es menor y a pH 6.5 la velocidad de activación de FVII es intermedia.

Descripción detallada de la invención

[0014] La invención proporciona el beneficio de combinar un modelo físico o matemático con una herramienta (PAT) de tecnología analítica de procesos para evaluar una variable esencial del proceso. La herramienta PAT tiene la ventaja de ser aplicada de manera on-line, in-line o at-line para controlar con precisión la reacción de modificación. Por lo tanto, el uso de esta técnica proporciona al usuario un valor requerido inmediato de modo que la reacción se pueda realizar de la mejor manera para alcanzar óptimos resultados. En una realización, la al menos una variable del proceso se puede elegir entre el grado de modificación, las mediciones de concentración del reactivo, las mediciones de pH y las mediciones de temperatura. En una realización, la variable adicional del proceso puede ser el tiempo de reacción.

5 [0015] En una realización, el método comprende controlar el grado de pegilación de un polipéptido. Por lo tanto, según otro aspecto de la invención se proporciona un método para controlar el grado de pegilación de un polipéptido que comprende los pasos de aplicar el grado de pegilación requerida, la concentración de enzima, la concentración de PEG, la concentración de polipéptido y la temperatura a un modelo matemático y calcular el tiempo de reacción.

[0016] En una realización, el método comprende controlar el grado de pegilación de un polipéptido factor IX (FIX). En una realización, el grado de pegilación se calcula de conformidad con las variables del proceso siguientes: tiempo de reacción, concentración de enzima, concentración de PEG, concentración de FIX y temperatura (que será habitualmente de 22 °C). Se apreciará que el experto será capaz de calcular el tiempo de reacción óptimo para lograr un grado requerido de la pegilación de FIX introduciendo los valores de las variables del proceso en un modelo matemático (que se puede derivar de los métodos de Eulers, Runge-Kutta, Newton-Raphson o DASPK). Dichos métodos matemáticos se pueden emplear ventajosamente para proporcionar un control preciso de las reacciones de modificación de polipéptidos.

20 [0017] Según un aspecto de la invención se proporciona un método de control de la autoactivación del factor VII, o de un análogo o derivado de éste, que comprende los pasos de:

(a) medir la concentración inicial del factor VII/VIIa, o del análogo o derivado de éste;

25 (b) medir la proporción inicial del factor VII activado, o del análogo o derivado de éste;

(c) calcular el tiempo de reacción de la activación del factor VII, o del análogo o derivado de éste, mediante correlación de los valores medidos en cada uno de los pasos (a) y (b) con un valor de la proporción requerida de factor VII activado, o del análogo o derivado de éste, donde el tiempo de reacción, t , se calcula según la fórmula (I):

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{akt_0 \cdot (akt-1)}{akt \cdot (akt_0-1)}\right)}{k(T) \cdot xb \cdot F_0}$$

30 (I)

en la que "akt" se refiere a la proporción requerida de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, "akt0" se refiere a la proporción inicial de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, medida en el paso (b), "F0" se refiere a la concentración inicial del factor VII, o del análogo o derivado de éste, (en g/l) medida en el paso (a), $k(T)$ se refiere a la constante de reacción para la reacción dada (en L/g/min) como una función de la temperatura, T , y xb se refiere a la fracción molar, calculada según la ecuación de la fórmula (III),

35

$$xb = \frac{10^{pH-7.61}}{1 + 10^{pH-7.61}}$$

(III)

donde pH se refiere al pH elegido de la reacción; y

(d) realizar, a un pH de 6.0 a 8.0, la reacción de activación del factor VII durante el tiempo calculado en el paso (c); y

40 (e) finalizar la reacción después del tiempo de reacción calculado en el paso (c), finalización que comprende reducir el pH a un valor por debajo de aproximadamente 6.0, como por ejemplo entre 5.5 y 6.0.

[0018] En una realización, la reacción de modificación consiste en la escisión enzimática de un polipéptido o la modificación por adición de un agente químico a un polipéptido (por ej. pegilación).

45 [0019] En la realización en la que la modificación consiste en la escisión enzimática, se encontró sorprendentemente que la concentración inicial y la proporción de escisión se pueden correlacionar con la proporción requerida de

escisión para calcular un tiempo de reacción preciso. Los resultados de esta correlación son extremadamente exactos (a menudo dentro de aproximadamente un 0.5% de la proporción de escisión) y repetibles. El proceso también proporciona la significativa ventaja de que sólo se deben calcular dos medidas antes de la reacción (a saber la concentración inicial y la proporción de escisión). Además, la reacción puede proceder durante el tiempo calculado sin necesidad de monitorear el estado de la misma (o incluso sin medir la proporción final de escisión, a menos que sea necesario a efectos del control de calidad).

[0020] Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" según se usan en este documento significan un compuesto formado por al menos cinco aminoácidos constituyentes unidos por enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de los aminoácidos codificados por el código genético y pueden ser aminoácidos naturales que no son codificados por el código genético, así como aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos naturales que no son codificados por el código genético son por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos comprenden los aminoácidos fabricados por síntesis química, es decir, los D-isómeros de los aminoácidos codificados por el código genético como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (tert-butilglicina), β -alanina, ácido 3-aminometilbenzoico, y ácido antranílico.

[0021] En una realización, el polipéptido es una enzima, como un factor de la coagulación sanguínea o una proteína relacionada con la hemostasia (por ejemplo, una serina proteasa). Los ejemplos de dichos polipéptidos incluyen: I (fibrinógeno), II (protrombina), factor tisular, V (proacelerina), VI, VII, VIII, IX (factor de Christmas), X (factor de Stuart-Prower), XI (antecedente de la tromboplastina plasmática), XII (factor de Hageman), XIII (factor estabilizador de fibrina), factor de von Willebrand, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (HMWK), fibronectina, antitrombina III, cofactor II de la heparina, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de la proteasa dependiente de la proteína Z (ZPI), plasminógeno, alfa 2-antiplasmina, activador del plasminógeno tisular (tPA), urocinasa, inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI1), inhibidor del activador de plasminógeno-2 (PAI2) y procoagulante del cáncer.

[0022] En otra realización, el polipéptido es un polipéptido autoactivado. En otra realización, la enzima es un factor de la coagulación sanguínea (por ejemplo, un factor de la coagulación sanguínea serina proteasa). Los ejemplos de factores de coagulación sanguínea serina proteasas incluyen los clasificados en EC 3.4.21, por ejemplo: II, VII, IX, X, XI, XII, precalicreína, proteína C y plasminógeno (las formas activadas de los zimógenos inactivos son FIIa, factor VIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, calicreína, proteína C activada (aPC) y plasmina, respectivamente). [0023] En una realización en la que la reacción de modificación comprende la escisión enzimática, el factor de la coagulación sanguínea es el factor VII o un análogo o derivado de éste.

[0024] En una realización en la que la reacción de modificación comprende la pegilación, el factor de la coagulación sanguínea es el factor IX o un análogo o derivado de éste.

[0025] En un aspecto de la invención, la invención proporciona un método de activación del factor de la coagulación sanguínea serina proteasa, factor VII, que comprende los pasos de:

(a) medir la concentración inicial del factor de la coagulación sanguínea serina proteasa;

(b) medir la proporción inicial del factor de la coagulación sanguínea serina proteasa activada;

(c) calcular el tiempo de la reacción de activación del factor de la coagulación sanguínea serina proteasa mediante correlación de los valores medidos en cada uno de los pasos (a) y (b) con un valor de la proporción requerida de factor de la coagulación sanguínea serina proteasa activada, donde el tiempo de reacción, t , se calcula según la fórmula (I):

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{akt0 \cdot (akt-1)}{akt \cdot (akt0-1)}\right)}{k(T) \cdot xb \cdot F0}$$

(I)

en la que " akt " se refiere a la proporción requerida de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, " $akt0$ " se refiere a la proporción inicial de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, medida en el paso (b), " $F0$ " se refiere a la concentración inicial del factor VII, o del análogo o derivado de éste, (en g/l) medida en el paso (a), $k(T)$ se refiere a la constante de reacción para la reacción dada (en L/g/min) como una función de la temperatura, T , y xb se refiere a la fracción molar, calculada según la ecuación de la fórmula (III),

$$xb = \frac{10^{pH-7.61}}{1 + 10^{pH-7.61}}$$

(III)

en la que pH se refiere al pH elegido de la reacción;

(d) realizar la reacción de activación del factor de la coagulación sanguínea serina proteasa durante el tiempo calculado en el paso (c); y

5 (e) finalizar la reacción después del tiempo de reacción calculado en el paso (c), finalización que comprende reducir el pH a un valor por debajo de aproximadamente 6.0, como por ejemplo entre 5.5 y 6.0.

[0026] Según otro aspecto, la invención proporciona un método para activar el factor VII a factor VII(a), o a un análogo o derivado de éste, que comprende los pasos de:

(a) medir la concentración inicial de factor VII;

(b) medir la proporción inicial de factor VII activado;

10 (c) calcular el tiempo de la reacción de activación del Factor VII mediante correlación de los valores calculados en cada uno de los pasos (a) y (b) con un valor de la proporción requerida del factor de VII activado, donde el tiempo de reacción, t , se calcula según la fórmula (I):

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{akt_0 \cdot (akt-1)}{akt \cdot (akt_0-1)}\right)}{k(T) \cdot xb \cdot F_0}$$

(I)

15 en la que " akt " se refiere a la proporción requerida de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, " akt_0 " se refiere a la proporción inicial de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, medida en el paso (b), " F_0 " se refiere a la concentración inicial del factor VII, o del análogo o derivado de éste, (en g/l) medida en el paso (a), $k(T)$ se refiere a la constante de reacción para la reacción dada (en L/g/min) como una función de la temperatura, T , y xb se refiere a la fracción molar, calculada según la ecuación de la fórmula (III),

$$xb = \frac{10^{pH-7.61}}{1 + 10^{pH-7.61}}$$

(III)

20 en la que pH se refiere al pH elegido de la reacción;

(d) realizar, a un pH de 6.0 a 8.0, la reacción de activación del factor VII durante el tiempo calculado en el paso (c); y

(e) finalizar la reacción después del tiempo de reacción calculado en el paso (c), finalización que comprende reducir el pH a un valor por debajo de aproximadamente 6.0, como por ejemplo entre 5.5 y 6.0.

25 [0027] En otro paso opcional (e), la reacción se finaliza después del tiempo de reacción calculado en el paso (c).

[0028] Aún en otro aspecto, la invención proporciona un método para prevenir la degradación de un factor VII activado, o de un análogo o derivado del factor VII activado, donde dicho método comprende los pasos de:

(a) medir la concentración inicial del factor VII/VIIa, o del análogo o derivado de éste;

(b) medir la proporción inicial del factor VII activado, o del análogo o derivado de éste;

30 (c) calcular el tiempo de reacción de la activación del factor VII, o del análogo o derivado de éste, mediante correlación de los valores medidos en cada uno de los pasos (a) y (b) con un valor de la proporción requerida de factor VII activado, o del análogo o derivado de éste, donde el tiempo de reacción, t , se calcula según la fórmula (I):

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{akt_0 \cdot (akt-1)}{akt \cdot (akt_0-1)}\right)}{k(T) \cdot xb \cdot F_0}$$

(I)

35 en la que " akt " se refiere a la proporción requerida de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, " akt_0 " se refiere a la proporción inicial de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, medida en el paso (b), " F_0 " se refiere a la concentración inicial del factor VII, o del análogo o derivado de éste, (en g/l)

medida en el paso (a), $k(T)$ se refiere a la constante de reacción para la reacción dada (en L/g/min) como una función de la temperatura, T , y x_b se refiere a la fracción molar, calculada según la ecuación de la fórmula (III),

$$x_b = \frac{10^{pH-7.61}}{1 + 10^{pH-7.61}}$$

(III)

donde pH se refiere al pH elegido de la reacción; y

5 (d) realizar, a un pH de 6.0 a 8.0, la reacción de activación del factor VII durante el tiempo calculado en el paso (c); y

(e) finalizar la reacción después del tiempo de reacción calculado en el paso (c), finalización que comprende reducir el pH a un valor por debajo de aproximadamente 6.0, como por ejemplo entre 5.5 y 6.0.

10 [0029] En una realización de la invención, el procedimiento de correlación descrito en el paso (c) se calcula según la fórmula (I):

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{akt_0(akt-1)}{akt \cdot (akt_0-1)}\right)}{k(T) \cdot x_b \cdot F_0}$$

(I)

15 en la que "akt" se refiere a la proporción requerida de polipéptido escindido, "akt₀" se refiere a la proporción inicial de polipéptido escindido medida en el paso (b), "F₀" se refiere a la concentración inicial de polipéptido (en g/l) medida en el paso (a), $k(T)$ se refiere a la constante de reacción para la reacción dada (en L/g/min) como una función de la temperatura, T , y x_b se refiere a la fracción molar. En una realización, $k(T)$ es un polinomio o una spline que describe la variación de k con la temperatura. Para rFVIIa, se usó el polinomio de 3er orden siguiente: $k(T) = k^* (0.00001 T^3 - 0.00147 T^2 + 0.02566 T + 0.86729)$ siendo T la temperatura (5 a 60 °C). De manera similar, pKa se puede expresar como una función de la temperatura.

20 [0030] En una realización, la temperatura es entre 5 °C y 25 °C, preferentemente entre 10 °C y 20 °C. En otra realización, la reacción de activación se realiza a temperatura ambiente (por ej. de aproximadamente 21.5 °C).

[0031] En la realización en la que la modificación comprende la escisión del factor VII, la reacción de activación se realiza generalmente a una temperatura constante.

[0032] La aplicación de la invención a la activación del factor VII resulta beneficiosamente en la producción de moléculas de factor VII totalmente activado que contienen un mínimo de productos de degradación.

25 [0033] El término "análogo" según se usa en este documento con referencia a un polipéptido significa un péptido modificado en el que se sustituyeron uno o más residuos de aminoácidos del péptido con otros residuos de aminoácidos y/o en el que se eliminaron uno o más residuos de aminoácidos del péptido y/o en el que se añadieron uno o más residuos de aminoácidos al péptido. Dicha adición o eliminación de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el extremo N-terminal del péptido y/o en el extremo C-terminal. Se debe entender que todos los aminoácidos para los cuales no se menciona el isómero óptico son el isómero L.

30

[0034] Ejemplos de análogos del factor VII se pueden encontrar en WO 02/22776. En una realización, el análogo del factor VII es un análogo hiperactivo, es decir uno que tiene al menos dos veces más actividad amidolítica que el factor VII natural. En una realización preferida, el análogo del factor VII es V158D/E296V/M298Q-FVII(a) (Ejemplo 6 en WO 02/22776).

35 [0035] La medición de la concentración inicial del polipéptido en el paso (a) normalmente se puede realizar por espectroscopia UV. En una realización, la concentración se ajustará entre aproximadamente 1.5 g/L y 2.2 g/L (por ej. aproximadamente 1.9 g/L).

40 [0036] La medición de la proporción inicial de polipéptido escindido en el paso (b) se puede realizar generalmente mediante SDS-PAGE reducida, HPLC reducida o no reducida o electroforesis en chip (por ej. Agilent Bioanalyzer). En una realización, el paso (b) se realiza por electroforesis en chip (por ej. Agilent Bioanalyzer). En la realización en la que el polipéptido comprende el factor VII, la proporción inicial de factor VII activado, VII(a), estará generalmente entre 10 y 90% dependiendo de las condiciones de purificación.

45 [0037] Se apreciará que las referencias a la "proporción requerida de polipéptido modificado" se refieren a cualquier proporción de modificación requerida por el usuario. En la realización en la que la modificación comprende la escisión del factor VII, la proporción requerida de escisión estará entre 94 y 99%, como entre 95 y 97% (por ej.

aproximadamente 95%). Estos intervalos se elegirán habitualmente de modo que produzcan una alta proporción de productos de activación (por ej., el factor VII(a)) pero que minimicen la cantidad de los productos de degradación de la cadena pesada (AA290 y AA315).

5 [0038] En la realización en la que la modificación comprende la escisión del factor VII, la reacción de escisión comprende además la adición de un compuesto amina (por ejemplo, histidina, Tris, lisina, arginina, fosforilcolina o betaína). En otra realización, el compuesto amina es histidina. En una realización, el compuesto amina se agrega en una concentración final de aproximadamente 1 a 500 mM, como de aproximadamente 10 a 100 mM (por ej. 10 mM).

10 [0039] En la realización en la que la modificación comprende la escisión del factor VII, la reacción de escisión comprende además la adición de iones calcio (por ej. cloruro de calcio). En una realización, los iones calcio se agregan en una concentración final de aproximadamente 1 a 50 mM, como de 10 a 25 mM (por ej. de 12 mM).

[0040] En la realización en la que la modificación comprende la escisión del factor VII, la reacción de escisión comprende además la adición de cloruro de sodio. En una realización, el cloruro de sodio se agrega a una concentración final de aproximadamente 1 a 100 mM, como de 20 a 80 mM (por ej. de 60 mM).

15 [0041] En una realización de la invención, la proporción requerida de escisión de serina proteasa es entre 90 y 99%, como entre 94 y 99%, como entre 95 y 97%, como entre 96 y 98%, como entre 97 y 99%.

20 [0042] En la realización en la que la modificación comprende la escisión del factor VII, la reacción de activación se realiza generalmente a un pH entre 6.0 y 8.0. La reacción autocatalítica del factor VII es dependiente del pH. A medida que el pH se eleva, se inicia la actividad amidolítica del factor VII y por consiguiente la velocidad de reacción aumentará en consecuencia. Por lo tanto, es deseable elegir un valor de pH entre 6.0 y 8.0, y asegurar que la reacción proceda a este pH mediante un tamponamiento adecuado. Si el pH varía durante la reacción de activación entonces la velocidad de activación diferirá de la calculada en el paso (c) y por consiguiente impactará sobre la calidad del producto resultante.

25 [0043] Por lo tanto, en una realización, el método de la invención comprende además el paso de elegir un pH entre 6.0 y 8.0 antes del inicio de la reacción de activación y el mantenimiento de la reacción en el valor de pH elegido durante la reacción de activación. En otra realización, el pH se elige entre 6.25 y 6.75 (por ej. 6.5 ± 0.05).

30 [0044] En vista de la exactitud sustancial de la metodología descrita en este documento, es deseable asegurarse de que la reacción de activación se finalice inmediatamente después del tiempo de reacción calculado en el paso (c). Si se permite que la reacción de activación continúe más allá del tiempo calculado en el paso (c) entonces esto aumentará la posible presencia de productos de degradación de la cadena pesada indeseables. Los expertos en el área conocen una serie de métodos alternativos para la finalización, por ejemplo, la adición de sílice a la mezcla de reacción. Sin embargo, en una realización, la reacción de activación se finaliza reduciendo el pH a un valor por debajo de aproximadamente 6.0, como entre 5.5 y 6.0 (por ej. 5.8). En una realización, el pH se reduce por adición de un ácido fuerte (por ej. ácido clorhídrico 1 M).

35 [0045] En otra realización de la invención, el procedimiento de correlación descrito en el paso (c), utilizado para calcular el tiempo de reacción (en adelante indicado como "t") se puede calcular según la fórmula (II):

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{akt_0 \cdot (akt-1)}{akt \cdot (akt_0-1)}\right)}{k \cdot xb \cdot F_0}$$

(II)

40 en la que "akt" se refiere a la proporción requerida de polipéptido escindido, "akt₀" se refiere a la proporción inicial de polipéptido escindido medida en el paso (b), "F₀" se refiere a la concentración inicial del polipéptido (en g/l) medida en el paso (a), k se refiere a la constante de reacción para la reacción dada (en L/g/min) y xb se refiere a la fracción molar.

[0046] La fracción molar (xb) se puede calcular utilizando la relación de Henderson-Hasselbach que establece correlaciones entre la fracción activa de la enzima a cualquier valor de pH. Normalmente, esta relación no será una correlación lineal (por ej. sigmoidal).

45 [0047] En la realización en la que la modificación comprende la escisión del factor VII, xb se puede calcular basándose en el grado de protonación de la histidina. Las serina proteasas (incluido el factor VII(a)) se caracterizan por una tríada catalítica que consiste en tres residuos: Serina 139, Histidina 57 y Aspartato 81. Se sabe que el residuo de histidina debe ser desprotonado para que reaccione y la serina proteasa sólo se activa en un intervalo de pH por encima del pKa de la histidina (que es 7.61).

50 [0048] Por lo tanto, en la realización en la que la modificación comprende la escisión del factor VII, xb se puede calcular según la ecuación siguiente de la fórmula (III):

$$xb = \frac{10^{pH-7.61}}{1 + 10^{pH-7.61}}$$

(III)

en la que pH se refiere al pH elegido de la reacción;

[0049] Se puede calcular el valor de k según la cinética de la reacción de la determinada reacción que se pretende medir. Por lo tanto, k es una constante física que define la dependencia de la concentración. Dicha constante se puede calcular generalmente de acuerdo con la suma de los mínimos cuadrados lo que será fácilmente evidente para los expertos en el área. Por ejemplo, en la realización en la que el polipéptido comprende el factor VII, el valor de k ha sido calculado como 0.29 L/g/min. Por consiguiente, en la realización en la que la modificación comprende la escisión del factor VII, el procedimiento de correlación descrito en el paso (c) para calcular el tiempo de reacción ("t") se puede calcular según la fórmula (IV):

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{akt_0 \cdot (akt-1)}{akt \cdot (akt_0-1)}\right)}{0.29 \cdot xb \cdot F_0}$$

10 (IV)

[0050] En la que *akt*, *akt*₀, *xb* y *F*₀ son los definidos antes.

[0051] En otra realización de la invención, el procedimiento de correlación descrito en el paso (c) se calcula por medio de la fórmula (V), en la que *xb* de fórmula (II) es 1:

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{akt_0 \cdot (akt-1)}{akt \cdot (akt_0-1)}\right)}{k \cdot F_0}$$

(V)

15 en la que "*akt*" se refiere a la proporción requerida de polipéptido escindido, "*akt*₀" se refiere a la proporción inicial de polipéptido escindido medida en el paso (b), "*F*₀" se refiere a la concentración inicial de polipéptido (en g/l) medida en el paso (a) y k se refiere a la constante de reacción para la reacción dada (en L/g/min).

[0052] Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido que se puede obtener según el método definido antes.

20 [0053] En diferentes realizaciones, dicho factor de la coagulación sanguínea serina proteasa es el Factor II o el Factor VII o el Factor IX o el Factor X o el Factor XI o el Factor XII; o un análogo o derivado de cualquiera de dichos factores de la coagulación sanguínea.

[0054] En una realización, el polipéptido es un análogo o derivado del factor VII(a) o del factor IX.

25 [0055] Los análogos o derivados del factor VII(a) o del factor IX y las composiciones farmacéuticas que contienen los análogos o derivados del factor VII(a) o del factor IX según la presente invención, se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades que se alivian por administración del factor de la coagulación VII(a) o IX humano, como un trastorno hemorrágico, p. ej., hemofilia, una enfermedad hematológica, hemartrosis, hematomas, hemorragia mucocutánea, enfermedad hematológica heredada, trastorno hemorrágico familiar, enfermedad hematológica familiar o terapia de reemplazo del factor. En una realización, la enfermedad que se alivia por
30 administración del factor de la coagulación VII(a) o IX humano es hemofilia, como la hemofilia B o la enfermedad de Christmas.

[0056] También se proporciona un análogo o derivado del factor VII(a) o del factor IX, como los definidos precedentemente, para utilizar en el tratamiento de la hemofilia.

35 [0057] También se proporciona el uso de un análogo o derivado del factor VII(a) o del factor IX, como los definidos precedentemente, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la hemofilia.

[0058] También se proporciona una composición farmacéutica que contiene un análogo o derivado del factor VII(a) o del factor IX para utilizar en el tratamiento de la hemofilia.

[0059] Los términos "tratamiento" y "tratar" según se usan en este documento significan el manejo y la atención de un paciente con el propósito de combatir una afección, como una enfermedad o un trastorno. El término pretende

- incluir todo el espectro de tratamientos para una determinada afección de la cual sufre el paciente, como la administración del principio activo para aliviar los síntomas o las complicaciones, para retrasar el avance de la enfermedad, el trastorno o la afección, para aliviar o mitigar los síntomas y las complicaciones, o para curar o eliminar la enfermedad, el trastorno o la afección, así como para prevenir la afección, donde la prevención debe ser entendida como el manejo y el cuidado de un paciente con el fin de combatir la enfermedad, la afección o el trastorno e incluye la administración de los péptidos activos para prevenir la aparición de los síntomas o las complicaciones. El paciente que se va a tratar es preferentemente un mamífero, en particular un ser humano, pero puede también incluir animales, como perros, gatos, vacas, ovejas y cerdos. Se debe entender, que los regímenes terapéuticos y profilácticos (preventivos) representan aspectos separados de la presente invención.
- 5 [0060] Según se usa en este documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un péptido significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una determinada enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para cada propósito dependerán del tipo y la gravedad de la enfermedad o lesión así como del peso y el estado general del sujeto. Se entenderá que determinar una dosis apropiada se puede lograr mediante experimentación sistemática, construyendo una matriz de valores y analizando diferentes puntos de la matriz, todo lo cual forma parte de las competencias corrientes de un médico o veterinario entrenado.
- 10 [0061] Según otro aspecto de la invención, se proporciona una formulación farmacéutica que contiene un polipéptido según se definió antes.
- 15 [0062] La formulación también puede contener un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, quelante(s), estabilizantes y surfactantes. En una realización de la invención, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir una formulación que contiene agua. Dicha formulación es habitualmente una solución o una suspensión. En una realización de la invención la formulación farmacéutica es una solución acuosa.
- [0063] La expresión "formulación acuosa" se define como una formulación que contiene al menos 50% p/p de agua. Asimismo, la expresión "solución acuosa" se define como una solución que contiene al menos 50% p/p de agua, y la expresión "suspensión acuosa" se define como una suspensión que contiene al menos 50% p/p de agua.
- 25 [0064] En una realización, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, en la que el médico o el paciente añade solventes y/o diluyentes antes de usarla.
- [0065] En una realización, la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ej. liofilizada o secada por aspersión) pronta para usar sin ninguna disolución previa.
- 30 [0066] En una realización, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un péptido de la presente invención, y un tampón, en el que dicho péptido está presente en una concentración entre 0.1 y 100 mg/ml, y donde dicha formulación tiene un pH entre aproximadamente 2.0 y aproximadamente 10.0.
- 35 [0067] En una realización de la invención el pH de la formulación se elige de la lista que consiste en 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9 y 10.0.
- [0068] En otra realización de la invención el tampón se elige del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, fosfato ácido de sodio, fosfato ácido disódico, fosfato de sodio, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o sus mezclas. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.
- 40 [0069] En una realización de la invención, la formulación contiene además un conservante farmacéuticamente aceptable. En una realización de la invención, el conservante se elige del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y timerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorofenoxipropano-1,2-diol) o sus mezclas.
- 45 [0070] En una realización de la invención el conservante está presente en una concentración entre 0.1 mg y 20 mg/ml. En una realización de la invención el conservante está presente en una concentración entre 0.1 mg/ml y 5 mg/ml. En una realización de la invención el conservante está presente en una concentración entre 10 mg/ml y 5 mg/ml. En una realización de la invención el conservante está presente en una concentración entre 10 mg/ml y 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, 2000.
- 55

[0071] En una realización de la invención, la formulación contiene además un agente isotónico. En una realización de la invención, el agente isotónico se elige del grupo que consiste en una sal (por ej. cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ej. L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ej. PEG400), o sus mezclas. Se puede emplear cualquier azúcar como mono, di o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluidos por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de sodio. En una realización, el aditivo azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En una realización, el aditivo alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcares mencionados antes se pueden utilizar individualmente o en combinación. No existe límite fijo para la cantidad empleada, en tanto el azúcar o el alcohol de azúcar sean solubles en la preparación líquida y no afecten adversamente los efectos estabilizantes logrados utilizando los métodos de la invención. En una realización, la concentración del azúcar o del alcohol de azúcar es entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En una realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 1 mg/ml y 50 mg/ml. En una realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 1 mg/ml y 7 mg/ml. En una realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 8 mg/ml y 24 mg/ml. En una realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 25 mg/ml y 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, 2000.

[0072] En una realización de la invención, la formulación contiene además un quelante. En una realización de la invención el quelante se elige entre sales de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), ácido cítrico, ácido aspártico y sus mezclas. En una realización de la invención el quelante está presente en una concentración entre 0.1 mg/ml y 5 mg/ml. En una realización de la invención el quelante está presente en una concentración entre 0.1 mg/ml y 2 mg/ml. En una realización de la invención el quelante está presente en una concentración entre 2 mg/ml y 5 mg/ml. Cada uno de estos quelantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, 2000.

[0073] En una realización de la invención, la formulación contiene además un estabilizante. El uso de un estabilizante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, 2000.

[0074] Más particularmente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que presenta posiblemente formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Por "formación de agregados" se entiende una interacción física entre las moléculas del polipéptido que resulta en la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o grandes agregados visibles que precipitan de la solución. Por "durante el almacenamiento" se entiende una composición o formulación farmacéutica líquida que una vez preparada, no es administrada inmediatamente a un sujeto. Por el contrario, luego de la preparación, se acondiciona para el almacenamiento, ya sea en forma líquida, congelada o en forma seca para su posterior reconstitución en forma líquida o en otra forma adecuada para la administración a un sujeto. Por "forma seca" se entiende que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca ya sea mediante secado por congelación (por ej. liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secado por aspersión (véase Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5ª ed; Longman Scientific and Technical, Essex, Reino Unido), pp. 491-676; Broadhead *et al.* (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; y Mumenthaler *et al.* (1994) Pharm. Res. 11:12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4:47-53). La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida, puede afectar adversamente la actividad biológica de dicho polipéptido, produciendo una pérdida de la eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede causar otros problemas como bloqueo de tubos, membranas, o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene el polipéptido se administra usando un sistema de infusión.

[0075] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener además una cantidad suficiente de una base de aminoácido para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácido" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, en la que está presente cualquier aminoácido en su forma de base libre o su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre en tanto otros están presentes en sus formas de sal. En una realización, los aminoácidos para usar en la preparación de las composiciones de la invención son los que tienen una cadena lateral cargada, como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D, o mezclas de ambos) de un aminoácido particular (por ej. glicina, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y sus mezclas) o combinaciones de estos estereoisómeros, pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o en su forma de sal.

En una realización se usa el estereoisómero L. Las composiciones de la invención también se pueden formular con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se entiende un derivado del aminoácido natural que produce el efecto deseado de disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos adecuados de la arginina incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, los análogos adecuados de la metionina incluyen etionina y butionina y los análogos adecuados de la cisteína incluyen S-metil-L-cisteína. Al igual que con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan en las composiciones ya sea en su forma de base libre como de sal. En una realización de la invención los aminoácidos o análogos de aminoácidos se usan en una concentración suficiente para evitar o retrasar la agregación de la proteína.

[0076] En una realización de la invención, se puede agregar metionina (u otros aminoácidos o análogos de aminoácidos sulfúricos) para inhibir la oxidación de los residuos de metionina a sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como el agente terapéutico es un polipéptido que contiene al menos un residuo de metionina susceptible de dicha oxidación. Por "inhibir" se entiende la acumulación mínima en el tiempo de especies de metionina oxidada. Inhibir la oxidación de metionina resulta en una mayor retención del polipéptido en su forma molecular apropiada. Se puede usar cualquier estereoisómero de metionina (L, D o sus mezclas) o sus combinaciones. La cantidad a agregar debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de modo que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para los organismos reguladores. Esto significa que la composición no contenga más de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de sulfóxido de metionina. Generalmente, esto se puede lograr agregando metionina de modo que la relación entre la metionina agregada y los residuos de metionina varíe entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1000:1, por ejemplo entre 10:1 y aproximadamente 100:1.

[0077] En una realización de la invención, la formulación contiene además un estabilizante elegido del grupo de los polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. En una realización de la invención, el estabilizante se elige entre polietilenglicol (por ej. PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o sus derivados (por ej. HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol, y diferentes sales (por ej. cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizantes específicos constituye una realización alternativa de la invención.

[0078] Las composiciones farmacéuticas también pueden contener estabilizantes adicionales que mejoren aún más la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo de la misma. Los estabilizantes de particular interés para la presente invención incluyen, pero no exclusivamente, metionina y EDTA, que protegen al polipéptido contra la oxidación de la metionina, y un surfactante no iónico, que protege al polipéptido contra la agregación asociada a la congelación y descongelación o al cizallamiento mecánico.

[0079] En una realización de la invención la formulación contiene además un surfactante. En una realización de la invención, el surfactante se elige entre un detergente, aceite de ricino etoxilado, diglicéridos poliglucosilados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, polímeros en bloque de polioxipropileno-polioxietileno (por ej. poloxámeros como Pluronic[®] F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, derivados polioxietilénicos y polietilénicos como derivados alquilados y alcoxilados (tweens, por ej. Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o sus derivados etoxilados, diglicéridos o sus derivados polioxietilénicos, alcoholes, glicerol, lecitinas y fosfolípidos (por ej. fosfatidil serina, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol, difosfatidil glicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ej. ácido dipalmitoil fosfatídico) y lisofosfolípidos (por ej. palmitoil lisofosfatidil-L-serina y 1-acil-sn-glicero-3-fosfato ésteres de etanolamina, colina, serina o treonina) y derivados alquil, alcoxil (alquil éster), alcoxi (alquil éter) de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ej. derivados lauroil y miristoil de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y los DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP cargados positivamente, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (por ej. cefalinas), glicero glucolípidos (por ej. galactopiranosido), esfingoglucolípidos (por ej. ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, derivados del ácido fusídico - (por ej. tauro-dihidrofusidato de sodio etc.), ácidos grasos de cadena larga y sus sales C6-C12 (por ej. ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N^α-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados de cadena lateral acilada de lisina o arginina, derivados N^α-acilados de dipéptidos que contengan cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N^α-acilado de un tripéptido que contenga cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, N^o de registro CAS [577-11-7]), docusato de calcio, N^o de registro CAS [128-49-4]), docusato de potasio, N^o de registro CAS [7491-09-0]), SDS (dodecilsulfato de sodio o laurilsulfato de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o sus derivados, ácidos biliares y sus sales y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glucocolato de sodio, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, surfactantes aniónicos monovalentes (alquil-aril-sulfonatos), surfactantes zwitteriónicos (por ej. N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, surfactantes catiónicos (bases de amonio cuaternario) (por ej. bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), surfactantes no iónicos (por ej. dodecil β-D-glucopiranosido), poloxaminas (por ej. Tetronic's), que son copolímeros en bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilenodiamina, o el surfactante se puede elegir del grupo de los derivados de imidazolina, o sus mezclas. Cada uno de estos surfactantes específicos constituye una realización alternativa de la invención.

[0080] El uso de un surfactante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, 2000.

5 [0081] Es posible que estén presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica del péptido de la presente invención. Dichos ingredientes adicionales pueden incluir humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de masa, modificadores de la tonicidad, quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ej. seroalbúmina humana, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ej. un aminoácido como betaina, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Dichos ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar adversamente la estabilidad general de la formulación farmacéutica de la presente invención.

10 [0082] Las composiciones farmacéuticas que contienen un péptido de la presente invención se pueden administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, tópicamente, por ejemplo, en sitios de la piel y la mucosa, en sitios que se saltan la absorción, por ejemplo, la administración en una arteria, en una vena o en el corazón, y en sitios que implican absorción, por ejemplo, la administración en la piel, debajo de la piel, en un músculo o en el abdomen.

15 [0083] La administración de composiciones farmacéuticas según la invención se puede realizar a través de varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago y los intestinos, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alveolos o una combinación de éstas, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la conjuntiva, ureteral y parenteral a pacientes que necesiten dicho tratamiento.

20 [0084] Las composiciones de la invención actual se pueden administrar en varias formas farmacéuticas, por ejemplo como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, pomadas, pastas, yesos, ungüentos, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, atomizaciones, polvos, aerosoles, inhalantes, gotas oculares, ungüentos oftálmicos, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, ungüentos vaginales, solución de inyección, soluciones que se transforman in situ, por ejemplo gelificación in situ, solidificación in situ, precipitación in situ, cristalización in situ, solución de infusión e implantes.

30 [0085] Las composiciones de la invención también se pueden combinar con, o unir a, por ejemplo a través de interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un portador farmacéutico, un sistema de administración del fármaco y un sistema de administración del fármaco avanzado, para mejorar aún más la estabilidad del péptido de la presente invención, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr la cronoterapia bien conocida por los expertos y aumentar la obediencia del paciente, o cualquier combinación de éstos. Los ejemplos de portadores, sistemas de administración del fármaco y sistemas de administración del fármaco avanzados incluyen, pero no exclusivamente, polímeros, por ejemplo celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, poli (vinil alcohol), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros en bloque de ellos, polietilenglicoles, proteínas portadoras, por ejemplo albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo sistemas de copolímeros en bloque bien conocidos por los expertos, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y sus dispersiones, fase L2 y sus dispersiones, bien conocidas por los expertos en el comportamiento de fases en sistemas lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsión, automicroemulsión, ciclodextrinas y sus derivados, y dendrímeros.

40 [0086] Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvos y soluciones para la administración pulmonar de un péptido de la presente invención, empleando, por ejemplo un inhalador de dosis fija, un inhalador de polvo seco y un nebulizador, todos dispositivos bien conocidos en el área.

45 [0087] Las composiciones de la invención actual, son específicamente útiles en la formulación de sistemas de administración de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta. Más específicamente, pero no exclusivamente, las composiciones son útiles en la formulación de sistemas de liberación parenteral controlada y sistemas de liberación sostenida (ambos sistemas conducen a una reducción en muchas veces de la cantidad de administraciones), bien conocidos por los expertos en el área. Aún más preferentemente, son sistemas de liberación controlada y de liberación sostenida administrados por vía subcutánea. Sin limitar el alcance de la invención, los ejemplos de sistemas de liberación controlada y composiciones útiles, son los hidrogeles, los geles oleaginosos, los cristales líquidos, las micelas poliméricas, las microesferas y las nanopartículas.

55 [0088] Los métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones de la invención actual incluyen, pero no exclusivamente, cristalización, condensación, co-cristalización, precipitación, co-precipitación, emulsión, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por aspersion, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación del solvente para producir microesferas, extrusión y procesos de fluido supercrítico. Se hace referencia general a Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

[0089] La administración parenteral se puede realizar por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa en forma de lapicera. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Otra opción es una composición que puede ser una solución o una suspensión para la administración del péptido de la presente invención en forma de un aerosol nasal o pulmonar. Como otra opción más, las composiciones farmacéuticas que contienen el péptido de la presente invención también se pueden adaptar a la administración transdérmica, por ej. mediante inyección sin aguja o desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o la administración transmucosa, por ej. bucal.

[0090] La invención se describirá ahora con referencia a los ejemplos no limitantes siguientes.

Metodología

Cálculo de la proporción inicial de activación

[0091] La proporción inicial de activación se determinó utilizando el Agilent Bioanalyzer 2100, un aparato a base de chip para la realización de electroforesis analítica, empleando el kit Agilent Protein 80 (Agilent 5067-1515). El análisis se realizó según las instrucciones del fabricante provistas en "Guía del usuario experto de Agilent 2100 Bioanalyzer 2100", Manual número de pieza: G2946-90000, edición: noviembre de 2003 y "Guía de inicio rápido del kit Agilent Protein 80", número de pieza: G2938-90063, edición 04/2007 (ambos de: Agilent Technologies Deutschland GmbH, Hewlett-Packard-Straße 8, 76337 Waldbronn, Alemania).

[0092] En un tubo eppendorf de 500 microlitros, se agregaron 2 microlitros de tampón de muestra del kit Protein 80 a 4 microlitros de muestra. La muestra se llevó a ebullición durante 5 minutos en un bloque de calentamiento a 100 °C. Se permitió que la mezcla se enfriara durante 10 segundos antes de 15 segundos de centrifugación en un equipo picofuge. Se agregaron 84 microlitros de agua purificada y el vial se mezcló. El método de análisis se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante mencionadas antes que son capaces de resolver: cadena pesada de FVII(a), cadena ligera de FVII(a), y cadena única de FVII que eluyen en el orden respectivo. La proporción de activación es la relación entre cadena pesada de FVII(a) (HC) + cadena ligera de FVII(a) (LC) y el total de FVII (HC+LC+SC). Por ejemplo:

$$\text{Proporción de activación} = (\text{HC} + \text{LC}) / (\text{HC} + \text{LC} + \text{SC}) * 100\%$$

Ejemplos

Ejemplo 1

Cálculo del tiempo de reacción para la activación del factor VII humano

[0093] 6.316 kg de solución de V158D/E296V/M298Q-FVII(a) (Ejemplo 6 en WO 02/22776) que contenía histidina 10 mM, CaCl₂ 12 mM, NaCl 60 mM, pH 6.0 (a 5 °C) se midieron por UV280 y tuvieron una absorbancia de 2.31 AU, utilizando una trayectoria óptica de 1 cm. La concentración se calculó usando el coeficiente de absorbancia molar (0.7 g/kg*AU) y fue de 1.62 g/kg. La proporción inicial de activación se determinó que era 20% de conformidad con el protocolo mencionado precedentemente.

[0094] Se decidió que las variables para la reacción fueran las siguientes:

proporción de activación requerida: 95%;

pH: 6.50;

temperatura: 21.5 °C.

[0095] El tiempo de activación se calculó según la ecuación de la fórmula (I) y fue de 128 minutos.

[0096] La reacción de activación se inició ajustando el pH hacia 6.50 (a 21.5 °C) usando 25 ml de NaOH 1 M. Después de 128 min, el pH se redujo nuevamente a 5.80 usando 22 ml de HCl 1 M (22.3 °C). Después de finalizar la reacción de activación, se sometió a análisis una muestra, empleando la metodología mencionada antes, que informó que la proporción de activación fue de 95.6%.

[0097] La proporción real de activación varió de lo previsto por la ecuación de fórmula (I) en sólo 0.6% luego de más de 2 horas de activación enzimática.

Ejemplo 2

Otros cálculos del tiempo de reacción para la activación del factor VII humano

[0098] Este experimento se llevó a cabo en 5 lotes purificados distintos de V158D/E296V/M298Q-FVII(a) (Ejemplo 6 en WO 02/22776) cada uno con diferentes valores de proporción inicial de activación, para evaluar la precisión y la

exactitud del método de la invención. Este experimento se llevó a cabo de manera análoga a la descrita en el ejemplo 1 y los resultados se pueden ver en la tabla 1.

Tabla 1

<i>Variable</i>	<i>Lote 1</i>	<i>Lote 2</i>	<i>Lote 3</i>	<i>Lote 4</i>	<i>Lote 5</i>
Inicial	61	74	53	16	34
Proporción de activación					
Concentración (g/L)	1.96	1.93	1.87	1.89	2.1
Proporción requerida de activación	92	96	94	96	98
pH	6.50	6.52	6.51	6.50	6.51
Tiempo de activación (min)	51	52	71	126	108
Proporción final real de activación	90	96	96	96	98

5 [0099] Los resultados de esta evaluación demuestran que en 3 de los 5 lotes, el método de la invención predijo la proporción final de activación, exactamente. En los restantes 2 lotes, la variación fue sólo de 2% que no se considera una variación significativa ni perjudicial. Por lo tanto, la tabla 1 muestra la validación cruzada del modelo de la invención actual. Los datos experimentales se comparan con los datos que el modelo predijo en 5 lotes de producción diferentes en un proyecto piloto. Con aporte muy variable (proteasa activa 16-74%, "act a tiempo cero"), se puede predecir y obtener una producción constante.

10 [0100] El uso de los términos "un" y "una" y "el" y "la" y referentes similares utilizados en el contexto de describir la invención se debe considerar que abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o el contexto lo contradiga claramente. Por ejemplo, la frase "el compuesto" se debe entender que hace referencia a varios "compuestos" de la invención o aspecto particular descrito, a menos que se indique lo contrario.

15 [0101] A menos que se indique lo contrario, todos los valores exactos provistos son representativos de los valores aproximados correspondientes (por ej., todos los ejemplos de valores exactos provistos con respecto a un factor o una medida particular se puede considerar que también proporcionan una medida aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", cuando corresponda).

20 [0102] La descripción de cualquier aspecto o aspecto de la invención empleando términos como "comprende/que comprende,", "tiene/que tiene", "que incluye/incluido(a)s" o "contiene/que contiene" con referencia a un elemento o elementos pretende proporcionar respaldo para un aspecto o aspecto de la invención similar que "consiste en", "consiste esencialmente en", o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga claramente (por ej., una composición que se describa aquí que contiene un elemento particular se debe entender que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga claramente).

REIVINDICACIONES

1. Un método para controlar la autoactivación del factor VII, o de un análogo o derivado de éste, que comprende los pasos de:

(a) medir la concentración inicial del factor VII/VIIa, o del análogo o derivado de éste;

5 (b) medir la proporción inicial del factor VII activado, o del análogo o derivado de éste;

(c) calcular el tiempo de reacción de la activación del factor VII, o del análogo o derivado de éste, mediante correlación de los valores medidos en cada uno de los pasos (a) y (b) con un valor de la proporción requerida del factor VII activado, o del análogo o derivado de éste, donde el tiempo de reacción, t , se calcula según la fórmula (I):

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{akt_0 \cdot (akt-1)}{akt \cdot (akt_0-1)}\right)}{k(T) \cdot xb \cdot F_0}$$

(I)

10 en la que "akt" se refiere a la proporción requerida de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, "akt₀" se refiere a la proporción inicial de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, medida en el paso (b), "F₀" se refiere a la concentración inicial del factor VII, o del análogo o derivado de éste, (en g/l) medida en el paso (a), $k(T)$ se refiere a la constante de reacción para la reacción dada (en L/g/min) como una función de la temperatura, T, y xb se refiere a la fracción molar, calculada según la ecuación de la fórmula (III),

$$xb = \frac{10^{pH-7.61}}{1 + 10^{pH-7.61}}$$

(III)

en la que pH se refiere al pH elegido de la reacción;

20 (d) realizar, a un pH de 6.0 a 8.0, la reacción de activación del factor VII durante el tiempo calculado en el paso (c); y

(e) finalizar la reacción después del tiempo de reacción calculado en el paso (c), finalización que comprende reducir el pH a un valor por debajo de aproximadamente 6.0, como por ejemplo entre 5.5 y 6.0.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que $k(T)$ es un polinomio o una spline.

25 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el procedimiento de correlación descrito en el paso (c) se calcula según la fórmula (II):

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{akt_0 \cdot (akt-1)}{akt \cdot (akt_0-1)}\right)}{k \cdot xb \cdot F_0}$$

(II)

en la que akt , akt_0 , k , xb y F_0 son los definidos en la reivindicación 1 y k es la constante de reacción.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que $k = 0.29$.

30 5. Un método para prevenir la degradación de un factor VII activado, o de un análogo o derivado del factor VII activado, donde dicho método comprende los pasos de:

(a) medir la concentración inicial del factor VII/VIIa, o del análogo o derivado de éste;

(b) medir la proporción inicial del factor VII activado, o del análogo o derivado de éste;

(c) calcular el tiempo de reacción de la activación del factor VII, o del análogo o derivado de éste, mediante correlación de los valores medidos en cada uno de los pasos (a) y (b) con un valor de la proporción

requerida del factor VII activado, o del análogo o derivado de éste, donde el tiempo de reacción, t , se calcula según la fórmula (I):

$$t = \frac{-\ln\left(\frac{akt_0 \cdot (akt-1)}{akt \cdot (akt_0-1)}\right)}{k(T) \cdot xb \cdot F_0}$$

(I)

5 en la que "akt" se refiere a la proporción requerida de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, "akt₀" se refiere a la proporción inicial de factor VII escindido, o del análogo o derivado de éste, medida en el paso (b), "F₀" se refiere a la concentración inicial del factor VII, o del análogo o derivado de éste, (en g/l) medida en el paso (a), $k(T)$ se refiere a la constante de reacción para la reacción dada (en L/g/min) como una función de la temperatura, T, y xb se refiere a la fracción molar, calculada según la ecuación de la fórmula (III),

$$xb = \frac{10^{pH-7.61}}{1 + 10^{pH-7.61}}$$

(III)

10 en la que pH se refiere al pH elegido de la reacción;

(d) realizar, a un pH de 6.0 a 8.0, la reacción de activación del factor VII durante el tiempo calculado en el paso (c); y

15 (e) finalizar la reacción después del tiempo de reacción calculado en el paso (c), finalización que comprende reducir el pH a un valor por debajo de aproximadamente 6.0, como por ejemplo entre 5.5 y 6.0.

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el paso (d) se realiza a una temperatura constante.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la temperatura es 5 a 60 °C.

8. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en el que la temperatura es entre 5 °C y 25 °C.

20 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho análogo del factor VII es V158D/E296V/M298Q-FVII(a).

10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la proporción de escisión requerida estará entre 90 y 99%, como entre 94 y 99%, como entre 95 y 97%, como entre 96 y 98%, como entre 97 y 99%.

25 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la concentración del factor VII(a), o del análogo o derivado de éste, se ajusta entre 1.5 g/L y 2.2 g/L.

12. Un método como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la reacción de activación se realiza a un pH entre 6.25 y 6.75 (por ej. 6.5 ± 0.05).

13. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12, en el que la reacción de activación se realiza a temperatura ambiente (por ej. 21.5 °C).

30

Fig 1

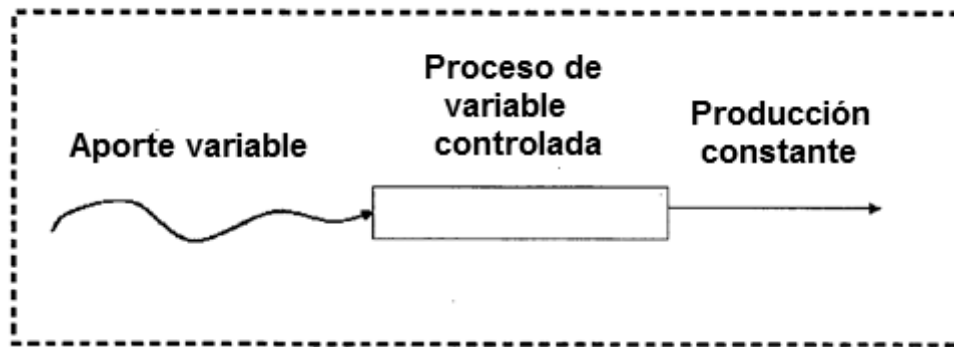


Fig 2

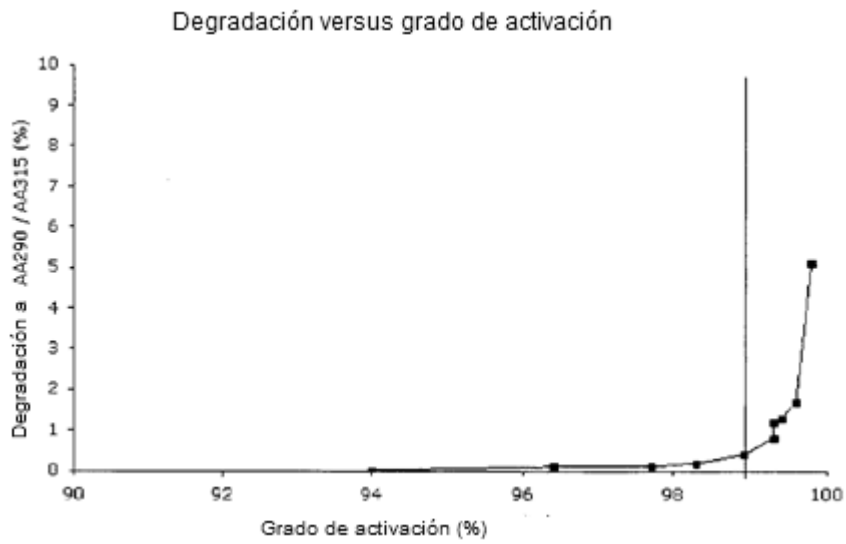
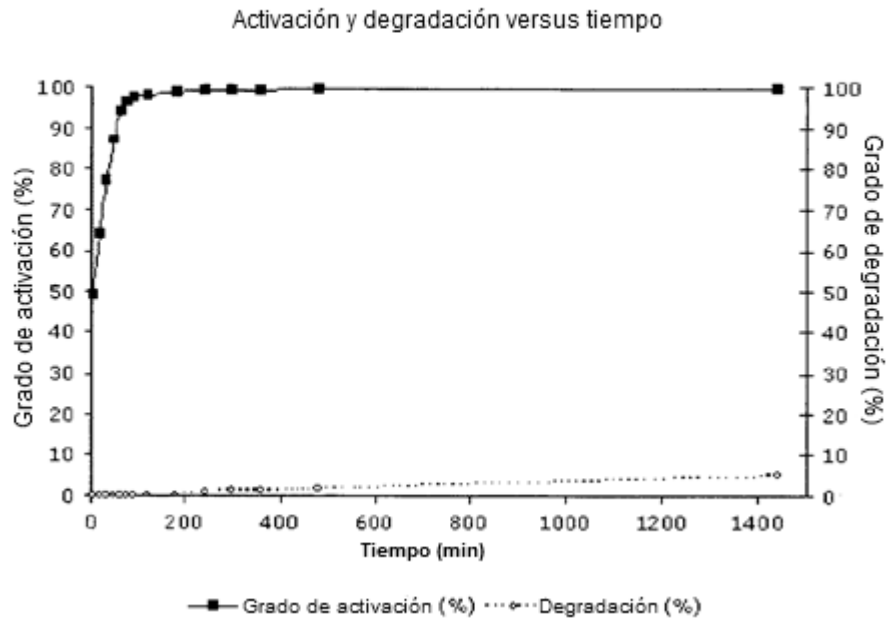


Fig 3

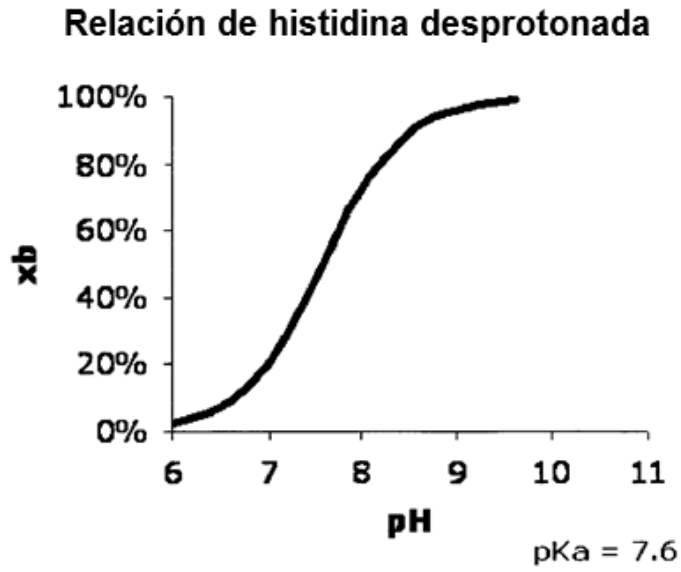


Fig 4

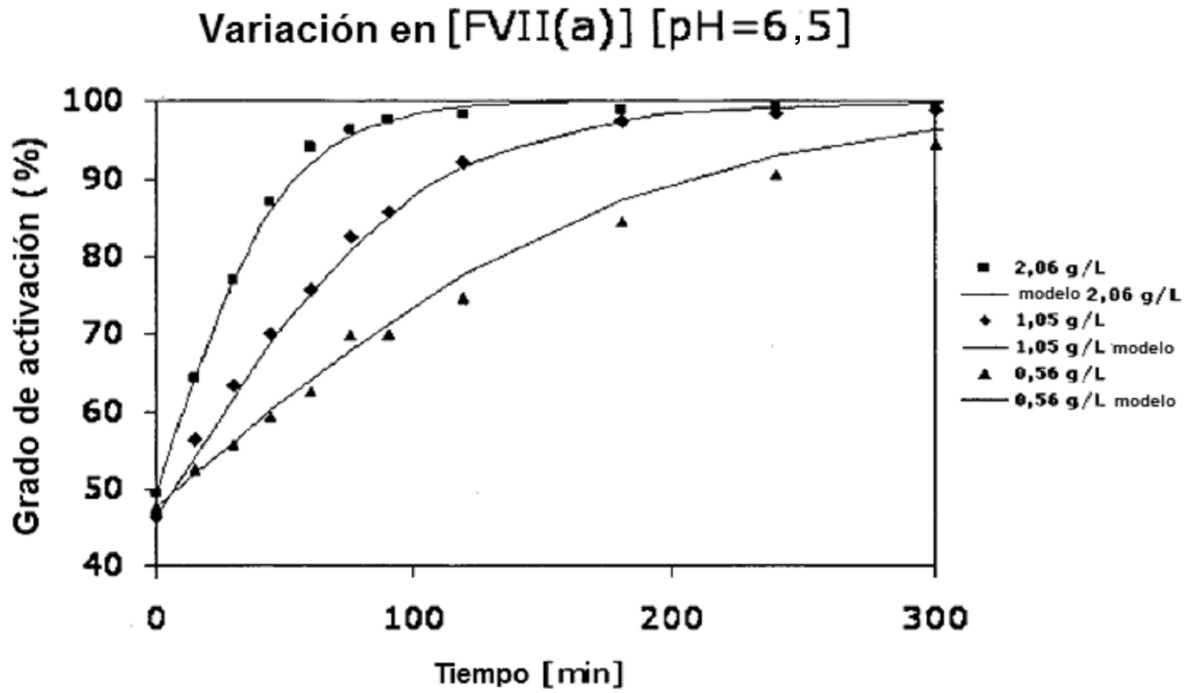


Fig 5

Variación en pH [conc. = 1,85 g/L]

