

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 639**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/54** (2007.01)

**A61K 47/61** (2007.01)

**A61P 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2007 E 12004951 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2532369**

54 Título: **Conjugado de factor VIIa - ácido (poli)siálico que tiene una semivida in vivo prolongada**

30 Prioridad:

**15.12.2006 US 875217 P**

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

**21.02.2018**

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)**

**Zählerweg 4**

**6300 Zug, CH y**

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TURECEK, PETER;**

**SIEKMANN, JUERGEN;**

**SCHEIFLINGER, FRIEDRICH y**

**CANAVAGGIO, MICHEL**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 655 639 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Conjugado de factor VIIa - ácido (poli)siálico que tiene una semivida *in vivo* prolongada

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un constructo proteínico que comprende factor de coagulación VIIa (FVIIa) que está unido a un resto de hidrato de carbono que incluye una cadena de 1-4 unidades de ácido siálico. Además, la presente invención se refiere a métodos para prolongar la semivida *in vivo* de proteínas de coagulación sanguínea, especialmente de FVIIa en la sangre de un mamífero que padece un trastorno hemorrágico asociado a defectos funcionales o deficiencias de al menos FVIIa, factor VIII (FVIII) y factor IX (FIX).

**Antecedentes de la invención**

15 La cascada de la coagulación sanguínea se divide en tres segmentos diferentes: las vías intrínseca, extrínseca y común (Schenone *et al.*, Curr Opin Hematol. 2004; 11: 272-7). La cascada implica una serie de enzimas serina proteasa (zimógenos) y cofactores de proteína. Cuando se requiere, un precursor de zimógeno inactivo se convierte en la forma activa, que en consecuencia convierte la siguiente enzima de la cascada.

20 La vía intrínseca requiere de los factores de coagulación VIII, IX, X, XI y XII. La iniciación de la vía intrínseca se produce cuando la precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular, factor XI (FXI) y factor XII (FXII) se exponen a una superficie cargada negativamente. También se requieren iones calcio y fosfolípidos segregados por las plaquetas.

25 La vía extrínseca se inicia cuando el lumen vascular de los vasos sanguíneos está dañado. El factor tisular de glicoproteína de membrana queda expuesto y se une entonces al factor VII (FVII) circulante y a pequeñas cantidades preexistentes de su forma activada FVIIa. Esta unión facilita la conversión completa de FVII en FVIIa y, posteriormente, en presencia de calcio y fosfolípidos, la conversión del factor IX (FIX) en factor IXa (FIXa) y del factor X (FX) en factor Xa (FXa). La asociación del FVIIa con el factor tisular intensifica la actividad proteolítica, provocando un acercamiento más estrecho de los sitios de unión de FVII para el sustrato (FX y FIX) e induciendo un cambio conformacional que intensifica la actividad enzimática del FVIIa. La tasa de activación del FX por la vía extrínseca es aproximadamente 50 veces más lenta que la tasa alcanzada por la vía (intrínseca) de FIXa, FVIIIa, fosfolípido e iones calcio.

35 La activación del FX es el punto común de las dos vías. Junto con fosfolípidos y calcio, los factores Va (FVa) y Xa convierten la protrombina en trombina (complejo de protrombinasa), que después escinde el fibrinógeno para formar monómeros de fibrina. Los monómeros se polimerizan formando cadenas de fibrina. El factor XIIIa (FXIIIa) une estas cadenas entre sí de forma covalente para formar una red rígida.

40 La conversión del FVII en FVIIa también se cataliza por una serie de proteasas, incluyendo trombina, FIXa, FXa, factor XIa (FXIa) y factor XIIa (FXIIa). Para la inhibición de la fase temprana de la cascada, el inhibidor de la vía del factor tisular selecciona como diana el complejo producto FVIIa/factor tisular /FXa.

45 El FVII (también conocido como factor estable o proconvertina) es una glicoproteína de serina proteasa dependiente de la vitamina K con un papel fundamental en la hemostasia y la coagulación (Eigenbrot, Curr Protein Pept Sci. 2002; 3: 287-99).

50 El FVII se sintetiza en el hígado y se segrega como una glicoproteína monocatenaria de 48 kD. El FVIIa comparte con todas las glicoproteínas de serina proteasa dependientes de la vitamina K una estructura de dominio de proteína similar, que consiste en un dominio de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla) amino-terminal con 9-12 residuos, responsable de la interacción de la proteína con las membranas lipídicas, un dominio de serina proteasa carboxi-terminal (dominio catalítico) y dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico que contienen un sitio de unión de iones calcio que media en la interacción con el factor tisular.

55 La gamma-glutamyl-carboxilasa cataliza la carboxilación de los residuos Gla en la porción amino-terminal de la molécula. La carboxilasa depende de una forma reducida de la vitamina K para desarrollar su acción, que se oxida en la forma epoxidada. La epóxido reductasa de vitamina K es necesaria para convertir la forma epoxidada de la vitamina K de vuelta a la forma reducida.

60 La mayoría del FVII circula en el plasma en forma de zimógeno, y la activación de esta forma da como resultado la escisión del enlace peptídico entre la arginina 152 y la isoleucina 153. El FVIIa activado resultante consiste en una cadena ligera derivada de NH<sub>2</sub> (20 kD) y una cadena pesada derivada de COOH terminal (30 kD) unidas por un único enlace disulfuro (Cys 135 a Cys 262). La cadena ligera contiene el dominio Gla de unión a membrana, mientras que la cadena pesada contiene el dominio catalítico.

65 La concentración de FVII en plasma determinada por factores genéticos y ambientales es de aproximadamente

0,5 mg/ml (Pinotti *et al.*, Blood. 2000,95:3423-8). Diferentes genotipos de FVII pueden dar como resultado diferencias varias veces mayores en los niveles medios de FVII. El nivel de FVII en plasma es elevado durante el embarazo en mujeres sanas y también aumenta con la edad, y es más alto en mujeres y en personas con hipertrigliceridemia. El FVII tiene la semivida más corta de todos los factores de procoagulación (3-6 h). La concentración media de FVIIa en plasma es de 3,6 ng/ml en individuos sanos y la semivida del FVIIa en circulación es relativamente larga (2,5 h) en comparación con otros factores de coagulación.

La deficiencia de FVII hereditaria es un trastorno hemorrágico recesivo autosómico raro, con una prevalencia estimada de 1 caso por 500.000 personas en la población general (Acharya *et al.*, J Thromb Haemost. 2004; 2248-56). La deficiencia de FVII adquirida de inhibidores es también muy rara. También se ha informado sobre casos donde la deficiencia se produce en asociación con fármacos tales como cefalosporinas, penicilinas y anticoagulantes orales. Además, se ha informado de deficiencias de FVII adquiridas producidas espontáneamente o con otras enfermedades, como mieloma, sepsis, anemia aplásica, con terapia de interleuquina-2 y globulina antitrombocítica.

La terapia de sustitución es el pilar principal del tratamiento de pacientes con deficiencia de FVII (Mariani *et al.*, Semin Hematol. 2006; 43 (supl. 1): S42-7). Esto se ha llevado a cabo tradicionalmente usando plasma fresco congelado (*fresh frozen plasma* - FFP), concentrados de complejo protrombínico (*prothrombin complex concentrates* - PCC) o concentrados de FVII derivados de plasma. Sin embargo, actualmente se usa ampliamente FVIIa recombinante (rFVIIa) para la terapia de estos pacientes.

También se ha desarrollado rFVIIa para el tratamiento de hemorragias en pacientes con hemofilia A y B con inhibidores, comprobándose que induce una hemostasia incluso durante cirugías mayores, como cirugía mayor ortopédica (Hedner, J Biotechnol. 2006; 124: 747-57). Actualmente se está produciendo rFVIIa en cultivos de células BHK y se ha comprobado que es muy similar al FVIIa derivado de plasma. El uso de rFVIIa en el tratamiento de la hemofilia se basa en la unión de baja afinidad del FVIIa con la superficie de plaquetas activadas con trombina. Mediante la administración de dosis farmacológicas de rFVIIa exógeno se aumenta la generación en la superficie plaquetaria en el sitio de la lesión, independientemente de la presencia de FVIII/FIX. Debido a la mayor y rápida formación de trombina, se forma un fuerte coágulo hemostático de fibrina.

Aunque originalmente se desarrolló para el tratamiento de la deficiencia de FVII y la hemofilia A y B complicada con inhibidores, nuevas indicaciones para el rFVIIa (basadas en informes de casos y ensayos clínicos menores) incluyen el uso en pacientes con enfermedad hepática, trombocitopenia o disfunción plaquetaria cualitativa, así como en pacientes sin trastornos de coagulación que están sangrando como resultado de una cirugía extensa o de un traumatismo importante.

Los fármacos de polipéptidos terapéuticos, tales como proteínas de coagulación sanguínea que incluyen FVIIa, se degradan rápidamente mediante enzimas proteolíticas y se neutralizan mediante anticuerpos. Esto reduce su semivida y tiempo de circulación, limitando así su eficacia terapéutica. Para lograr y mantener el efecto terapéutico o profiláctico deseado del FVIIa se requieren dosis relativamente altas y una administración frecuente. Como consecuencia, es difícil obtener una regulación adecuada de las dosis y la necesidad de administraciones intravenosas frecuentes impone restricciones al modo de vida del paciente. Por tanto, una molécula de FVIIa mejorada con una semivida en circulación más larga disminuiría el número de administraciones necesarias.

Principalmente existen cuatro opciones generales para prolongar la semivida de las proteínas en la circulación sanguínea:

- Modificación química o enzimática directa.
- Uso de moléculas portadoras para proteger las proteínas en la circulación.
- Construcción de mutantes para prolongar la semivida.
- Modificación de la vía de degradación.

La presente invención enseña una mejora de las proteínas de coagulación sanguínea, especialmente la molécula de FVIIa, mediante modificación química. En el pasado se han usado varios métodos para la modificación química de polipéptidos terapéuticos.

La pegilación de fármacos de polipéptidos los protege y mejora sus perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos (Harris y Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003; 2: 214-21). El proceso de pegilación añade unidades repetitivas de polietilenglicol (PEG) a un fármaco de polipéptidos. Las moléculas de PEG tienen un gran volumen hidrodinámico (5-10 veces el tamaño de las proteínas globulares), son altamente solubles en agua e, hidratadas, muy móviles, no tóxicas y no inmunógenas, y se eliminan rápidamente del cuerpo. La pegilación de moléculas puede conducir a una mayor resistencia de los fármacos frente a la degradación enzimática, a una mayor semivida *in vivo*, a una menor frecuencia de dosificación, a una menor inmunogenicidad, a una mayor estabilidad física y térmica, a una mayor solubilidad, a una mayor estabilidad líquida y a una menor agregación. Los primeros fármacos pegilados fueron

aprobados por la FDA a principios de la década de 1990. Mientras tanto, la FDA ha aprobado varios fármacos pegilados para la administración oral, inyectable y tópica.

La tecnología de GlycoPEGylation™ incluye métodos que proporcionan un conjugado peptídico entre un polímero PEG y un péptido, con el PEG unido de forma covalente al péptido a través de un grupo enlazante de glicosilo intacto.

También se han usado liposomas para encapsular diversas moléculas, tales como ADN, ARN antisentido, antibióticos, fármacos anticancerígenos y antifúngicos, inhibidores/activadores, anticuerpos (inmunoliposomas) y antígenos (para vacunas).

También es posible conjugar fosfolípidos con PEG (PEG-liposoma), por ejemplo mediante un enlace amida, carboxi-PEG y fosfatidiletanolamina (PE) de soja purificada, ésteres y derivados de carbamato, siendo el derivado de carbamato el más usado en la actualidad (patente estadounidense nº 6.593.294). Los pesos moleculares de los PEG usados con mayor frecuencia son 2.000 y 5.000, pero también se emplean PEG que oscilan entre 600 y 12.000.

Las proteínas sustituidas por monosacáridos ácidos fueron dadas a conocer por primera vez en la patente estadounidense nº 3.847.890. En esta patente, se sustituyeron monosacáridos ácidos, es decir, ácido *n*-acetilneuramínico y gluconato, en grupos  $\alpha$ -amino o  $\epsilon$ -amino de insulina, hormona del crecimiento humano o albúmina para reducir la antigenicidad de los polipéptidos.

El ácido polisialílico (PSA), también designado como ácido colomínico (CA), es un polisacárido que se produce de manera natural. Es un homopolímero de ácido *N*-acetilneuramínico con enlace  $\alpha(2\rightarrow8)$  cetosídico y contiene grupos diol vecinos en su extremo no reductor. Está cargado negativamente y es un constituyente natural del cuerpo humano. Puede producirse fácilmente a partir de bacterias en grandes cantidades y con características físicas predeterminadas (patente estadounidense nº 5.846.951). Al ser química e inmunológicamente idéntico al ácido polisialílico del cuerpo humano, el ácido polisialílico bacteriano no es inmunógeno, aunque esté acoplado a proteínas. A diferencia de otros polímeros (por ejemplo PEG), el ácido polisialílico es biodegradable. La unión covalente del ácido colomínico a catalasa y asparaginasa condujo a un aumento de la estabilidad enzimática en presencia de enzimas proteolíticas o plasma sanguíneo. Estudios comparativos *in vivo* con asparaginasa polisialilada y no modificada revelaron que la polisialilación aumentaba la semivida de la enzima (Fernandes y Gregoriadis, *Int J Pharm.* 2001; 217: 215-24).

Sin embargo, hasta la fecha no está comercialmente disponible ningún compuesto terapéutico que consiste en un polipéptido conjugado con un monosacárido ácido tal como se describe en la patente estadounidense nº 3.847.890. En cambio, la patente estadounidense nº 5.846.951 indica que la porción de polisacárido del compuesto debería tener al menos 5, y en otras realizaciones al menos 20 o 50, residuos de ácido siálico en la cadena polimérica. Dado que los polisacáridos se producen normalmente en bacterias que implican el riesgo inherente de copurificar endotoxinas, la purificación de cadenas poliméricas de ácido siálico largas puede aumentar la probabilidad de que aumente el contenido en endotoxinas. También es posible preparar sintéticamente moléculas de PSA cortas con 1-4 unidades de ácido siálico (Kang *et al.*, *Chem Commun.* 2000; 227-8; Ress y Linhardt, *Current Organic Synthesis.* 2004; 1: 31-46), reduciendo así el riesgo de altos niveles de endotoxinas.

El documento WO 98/32466 A1 sugiere que el FVII, entre muchas otras proteínas, puede pegilarse, pero no incluye ningún ejemplo de trabajo que respalde la descripción.

El documento WO 01/58935 A3 enseña conjugados que comprenden al menos un resto no polipeptídico unido de forma covalente a un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido difiere de la del FVII o FVIIa en que se ha introducido o eliminado al menos un residuo de aminoácido que comprende un grupo de unión para dicho resto no polipeptídico. Para los restos no polipeptídicos se sugirió especialmente PEG.

El documento US 20050113565 A1 divulga un polipéptido de FVII o un polipéptido relacionado con FVII, comprendiendo el polipéptido una o más cadenas de oligosacárido unidas a asparagina y/o unidas a serina, y estando al menos uno de dichos grupos de oligosacárido unido de forma covalente con al menos un grupo polimérico (PEG, "glicopegilación").

El documento WO 2004/000366 divulga un conjugado de FVII de PEG a través de restos de hidrato de carbono en dicho FVIIa.

Así, en la técnica sigue existiendo una necesidad de composiciones y métodos que proporcionen preparaciones de proteínas de coagulación incluyendo derivado de plasma mejorado o rFVII, FVII modificado o polipéptido relacionado con FVII.

## Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los objetos que no abarca el alcance de las

reivindicaciones no forman parte de la invención reivindicada en la presente.

La presente invención proporciona un constructo proteínico que comprende factor VIIa plasmático o recombinante (FVIIa), estando unidos dicho FVIIa o dichos derivados biológicamente activos del mismo a una cadena de 1-4 unidades de ácido siálico, donde la semivida *in vivo* del constructo proteínico se prolonga sustancialmente en la sangre de un mamífero, en particular un humano, en comparación con FVIIa que carece de una cadena de 1-4 unidades de ácido siálico. Adicionalmente, de acuerdo con la presente invención se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen dicho constructo proteínico, así como dicho constructo proteínico para su uso en métodos para prolongar la semivida *in vivo* de FVIIa en la sangre de un mamífero que tiene un trastorno hemorrágico asociado a defectos funcionales o deficiencias de al menos uno de los factores FVIIa, FVIII y FIX. El constructo proteínico de la invención también puede administrarse para controlar hemorragias en caso de traumatismo o cirugía en un mamífero con niveles normales de factores de coagulación.

En una realización de la invención, se proporciona un constructo proteínico que comprende (a) una molécula de factor VII activado (FVIIa) seleccionada del grupo que consiste en FVIIa plasmático y FVIIa recombinante (rFVIIa); y (b) al menos un resto de hidrato de carbono fisiológicamente aceptable que comprende 1-4 unidades de ácido siálico unido a dicha molécula de FVIIa; en el que se prolonga la semivida *in vivo* de dicho constructo en la sangre de un mamífero en comparación con la semivida *in vivo* de una molécula de FVIIa que no está unida a dicho resto de hidrato de carbono.

En otra realización de la invención, se proporciona el constructo proteínico mencionado anteriormente, aumentándose la semivida *in vivo* de dicho constructo en al menos un factor de aproximadamente dos en comparación con la semivida *in vivo* de una molécula de FVIIa que no está unida a dicho resto de hidrato de carbono. En otra realización, se proporciona el constructo proteínico mencionado anteriormente, aumentándose la semivida *in vivo* de dicho constructo en al menos un factor de aproximadamente tres en comparación con la semivida *in vivo* de una molécula de FVIIa que no está unida a dicho resto de hidrato de carbono.

En todavía otra realización, se proporciona el constructo proteínico en el que el resto de hidrato de carbono fisiológicamente aceptable es un ácido polisialico o un derivado del mismo.

En una realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del constructo proteínico mencionado anteriormente y uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un vehículo, diluyente, sal, tampón y excipiente farmacéuticamente aceptables.

En otra realización de la invención, se proporciona el constructo proteínico mencionado anteriormente para su uso en un método para controlar hemorragias en un mamífero que tiene un trastorno hemorrágico asociado a defectos funcionales o deficiencias de al menos uno de los factores FVIIa, FVIII y FIX, que comprende la administración del constructo proteínico mencionado anteriormente. En aún otra realización, se proporciona el constructo proteínico mencionado anteriormente para su uso en un método para controlar hemorragias en un mamífero durante cirugías o traumatismos, que comprende la administración del constructo proteínico mencionado anteriormente.

En todavía otra realización de la invención, se proporciona un kit que comprende una cantidad eficaz del constructo proteínico mencionado anteriormente envasada en un recipiente, conteniendo el kit opcionalmente un segundo agente terapéutico, y que además comprende una etiqueta unida al recipiente o envasada con éste, etiqueta que describe el contenido del recipiente y proporciona indicaciones y/o instrucciones con respecto al uso del contenido del recipiente para controlar hemorragias en un mamífero. En otra realización más, se proporciona el kit mencionado anteriormente, consistiendo el recipiente en un vial o botella o jeringa precargada.

### Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención consiste en que ésta se refiere a un constructo proteínico que comprende un miembro de la cascada de coagulación sanguínea, FVIIa plasmático (es decir, derivado de plasma) y/o FVIIa recombinante (también designado en adelante como "conjugado de "PSA-FVIIa"), estando unido dicho FVII a de uno a cuatro restos de ácido siálico, prolongándose la vida útil *in vivo* de dicho FVIIa en la sangre de un mamífero. Tal como se usa en el presente documento, el término "constructo proteínico" se refiere a una molécula de factor VII activado (FVIIa) seleccionada del grupo que consiste en FVIIa plasmático y FVIIa recombinante (rFVIIa); y (b) al menos un resto de hidrato de carbono fisiológicamente aceptable que comprende de 1-4 unidades de ácido siálico unidas a dicha molécula de FVIIa. Tal como se usa en el presente documento, el término "plasmático" se refiere a "derivado de plasma".

Polinucleótidos y polipéptidos de FVIIa

Las moléculas de FVIIa útiles para la presente invención incluyen la proteína de longitud completa, precursores de la proteína, subunidades o fragmentos biológicamente activos o funcionales de la proteína y derivados funcionales de la misma. La referencia a FVIIa se ha de interpretar incluyendo todas las formas potenciales de estas proteínas.

De acuerdo con la presente invención, el término "factor FVIIa recombinante" (rFVIIa) no está sometido a ninguna restricción específica y puede incluir cualquier rFVIIa, heterólogo o que se produce de manera natural, obtenido a través de tecnología de ADN recombinante, o un derivado biológicamente activo del mismo. En determinadas realizaciones, el término incluye proteínas y ácidos nucleicos, por ejemplo genes, preARNm, ARNm y polipéptidos, variantes polimórficas, alelos, mutantes y homólogos interespecie que: (1) presentan una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos superior a aproximadamente un 60%, una identidad de secuencia de aminoácidos de un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más, en una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 300, 400 o más aminoácidos (hasta la secuencia de longitud completa de 406 aminoácidos de la proteína madura), con un polipéptido codificado por un ácido nucleico de referencia o una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento; (2) se unen específicamente a anticuerpos, por ejemplo anticuerpos policlonales, cultivados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de referencia tal como se describe en el presente documento, fragmentos inmunógenos de ésta y variantes de la misma modificadas de forma conservativa; (3) se hibridan específicamente bajo condiciones de hibridación estrictas con un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de referencia tal como se describe en el presente documento, y variantes de la misma modificadas de forma conservativa; (4) presentan una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una identidad de secuencia de nucleótidos superior a aproximadamente un 95%, superior a aproximadamente un 96%, 97%, 98%, 99% o más, en una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1.000 o más nucleótidos (hasta la secuencia completa de 1.218 nucleótidos de la proteína madura), con una secuencia de ácidos nucleicos de referencia tal como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "FVIIa endógeno" incluye FVIIa procedente de dicho mamífero. También incluye FVIIa transcrito de un transgén u otro ADN extraño presente en dicho mamífero. Tal como se usa en el presente documento, "FVIIa exógeno" incluye FVIIa que no procede de dicho mamífero.

Los polipéptidos variantes (o análogos) incluyen variantes de inserción, en las que uno o más residuos de aminoácido complementan una secuencia de aminoácidos de FVIIa. Las inserciones pueden localizarse en cualquiera de los dos extremos de la proteína o en ambos, o pueden situarse dentro de regiones interiores de la secuencia de aminoácidos del FVIIa. Las variantes de inserción, con residuos adicionales en cualquiera de los dos extremos o en ambos, pueden incluir, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen marcas o etiquetas de aminoácidos. Por ejemplo, la molécula de FVIIa puede contener opcionalmente un Met N-terminal, especialmente cuando la molécula se expresa de forma recombinante en una célula bacteriana tal como *E. coli*.

En las variantes de delección, se eliminan uno o más residuos de aminoácido en un polipéptido de FVIIa. Las delecciones pueden realizarse en uno de los dos extremos del polipéptido de FVIIa o en ambos, o con eliminación de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos de FVIIa. Por consiguiente, las variantes de delección incluyen todos los fragmentos de una secuencia polipeptídica de FVIIa.

En las variantes de sustitución, se eliminan uno o más residuos de aminoácido en un polipéptido de FVIIa y se reemplazan por residuos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son de naturaleza conservativa, las sustituciones conservativas de este tipo son bien conocidas en la técnica. Alternativamente, la invención también abarca sustituciones no conservativas. Se describen sustituciones conservativas a modo de ejemplo en Lehninger [Biochemistry, 2ª edición; Worth Publishers, Inc., Nueva York (1975), págs. 71-77] y se presentan a continuación.

45 Sustituciones conservativas

Características de la cadena lateral	Aminoácido
no polar (hidrófoba):	
a. alifática	A L I V P
b. aromática	F W
c. con contenido de azufre	M
d. frontera	G
polar - sin carga:	
a. hidroxilo	S T Y
b. amidas	N Q
c. sulfhidrilo	C
d. frontera	G
con carga positiva (básica)	K R H
con carga negativa (ácida)	D E

Alternativamente, a continuación se presentan ejemplos de sustituciones conservativas.

50 Sustituciones conservativas II

Residuo original	Sustitución a modo de ejemplo
Ala (A)	Val, Leu, Ile

Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

Una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos procede normalmente de un mamífero, incluyendo, primates, por ejemplo humanos; roedores, por ejemplo rata, ratón, hámster; vaca, cerdo, caballo, oveja o cualquier mamífero. Los ácidos nucleicos y proteínas de la invención pueden ser moléculas recombinantes (por ejemplo, heterólogas y codificadoras de la secuencia de tipo natural o una variante de la misma, o que no se producen de manera natural). Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de referencia incluyen, por ejemplo, los números de registro GenBank J02933 en el caso de la secuencia genómica, M13232 para el ADNc (Hagen *et al.* PNAS 1986; 83: 2412-6) y P08709 para la secuencia de polipéptidos. Se han descrito diversos polimorfismos del FVII, véase, por ejemplo, Sabater-Lleal *et al.* (Hum Genet. 2006; 118: 741- 51).

Tal como se usa en el presente documento, el término “derivado biológicamente activo” o “variante biológicamente activa” incluye cualquier derivado o variante de una molécula que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas de dicha molécula, tal como propiedades de unión, y/o la misma base estructural, tal como un esqueleto peptídico o una unidad polimérica básica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “FVIIa derivado de plasma” o “plasmático” incluye todas las formas de la proteína halladas en la sangre y obtenidas de un mamífero con la propiedad de activar la vía de coagulación.

Tal como se usa en el presente documento, el término “FVIIa recombinante” incluye rFVIIa obtenido a través de tecnología de ADN recombinante. Puede producirse mediante cualquier método conocido en la técnica. En la patente estadounidense nº 4.784.950 se divulga un ejemplo específico. Un ejemplo de tal rFVIIa es el producto NovoSeven producido y comercializado por Novo Nordisk.

#### Producción y expresión de FVIIa

La producción de rFVIIa puede incluir cualquier método conocido en la técnica (i) para producir ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo mediante transcripción inversa de ADN y/o amplificación de ADN, (ii) para introducir ADN recombinante en células procariotas o eucariotas por transfección, por ejemplo mediante electroporación o microinyección, (iii) para cultivar dichas células transformadas, por ejemplo de forma continua o discontinua, (iv) para expresar rFVIIa, por ejemplo de forma constitutiva o tras inducción, y (v) para aislar dicho FVIIa, por ejemplo del medio de cultivo o mediante recolección de las células transformadas para (vi) obtener rFVIIa purificado, por ejemplo por cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad.

El rFVIIa puede producirse mediante expresión en un sistema huésped procariota o eucariota adecuado caracterizado por producir una molécula de rFVIIa farmacológicamente aceptable. Ejemplos de células eucariotas son células de mamífero, por ejemplo CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2. No hay ninguna limitación particular para los reactivos o condiciones empleados para la producción o el aislamiento de rFVIIa de acuerdo con la presente invención, pudiendo emplearse cualquier sistema conocido en la técnica o comercialmente disponible.

Para la preparación del rFVIIa se puede usar una gran variedad de vectores, que pueden seleccionarse de entre vectores de expresión eucariota o procariota. Los ejemplos de vectores para la expresión procariota incluyen plásmidos tales como pRSET, pET, pBAD, etc., en los que los promotores usados en los vectores de expresión procariotas lac, trc, trp, recA, araBAD, etc. Los ejemplos de vectores para la expresión eucariota incluyen: (i) para expresión en levadura, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, usando promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii) para expresión en células de insecto, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., usando promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc.; y (iii) para expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas

virales tales como virus vaccinia, adenovirus asociados, virus del herpes, retrovirus, etc., usando promotores tales como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y  $\beta$ -actina.

#### Ácido siálico

5 Tal como se usa en el presente documento, "restos de ácido siálico" incluye monómeros o polímeros de ácido siálico que son solubles en disolución o suspensión acuosa y que no tienen ningún impacto negativo, por ejemplo efectos secundarios, para los mamíferos después de la administración del conjugado de PSA-FVIIIa en una cantidad farmacéuticamente eficaz. No hay ninguna limitación particular para la unidad de ácido siálico usada de acuerdo con la presente invención. En un aspecto, los polímeros se caracterizan porque tienen de 1 a 4 unidades. También es posible combinar diferentes unidades de ácido siálico en una cadena.

15 Las restos de ácido siálico pueden unirse al FVIIIa por ejemplo mediante el método descrito en la patente estadounidense nº 4.356.170. En una realización de la invención, el compuesto de polisacárido es un polisacárido que se produce de manera natural, un derivado de un polisacárido que se produce de manera natural o un derivado que se produce de manera natural de un polisacárido. Por regla general, todos los residuos sacáridos del compuesto son residuos de ácido siálico.

20 También se conocen otras técnicas para acoplar PSA a polipéptidos. Por ejemplo, la publicación estadounidense nº 2007/0282096 describe la conjugación de un derivado amina o hidrazida, por ejemplo PSA, en proteínas. Además, la publicación estadounidense nº 2007/0191597 describe derivados de PSA que contienen un grupo aldehído para la reacción con sustratos (por ejemplo proteínas) en el extremo terminal reductor.

25 En una realización de la invención, la porción de ácido polisialílico del compuesto polisacárido es altamente hidrófila, y en otra realización todo el compuesto es altamente hidrófilo. El carácter hidrófilo es conferido principalmente por los grupos carboxilo colgantes de las unidades de ácido siálico, así como por los grupos hidroxilo. La unidad de sacárido puede contener otros grupos funcionales, como grupos amina, hidroxilo o sulfato o combinaciones de los mismos. Estos grupos pueden estar presentes en los compuestos sacáridos que se producen de manera natural o pueden introducirse en los compuestos de polisacáridos derivados.

30 Los compuestos de polisacárido de uso particular para la invención son aquellos producidos por bacterias. Algunos de estos polisacáridos que se producen de manera natural son conocidos como glicolípidos. Resulta particularmente ventajoso que los compuestos de polisacárido estén sustancialmente libres de unidades galactosa terminales, que tienden a reconocerse por los receptores de galactosa de los hepatocitos y las células de Kupffer.

#### Enlace

35 El FVIIa puede unirse de forma covalente con los compuestos de polisacárido mediante diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia. En el texto incluido entre la columna 7, línea 15, y la columna 8, línea 5, de la patente estadounidense nº 5.846.951 se identifican diversos ejemplos.

40 Los ejemplos incluyen la unión a través del enlace peptídico entre un grupo carboxilo del FVIIa o del polisacárido y un grupo amino en el otro de estos componentes, o un enlace éster entre un grupo carboxilo de uno de estos componentes y un grupo hidroxilo del otro. Otro enlace mediante el cual el principio activo, por ejemplo FVIIa, podría estar unido de forma covalente con el compuesto de polisacárido es mediante una base de Schiff entre un grupo amino libre del principio activo que se hace reaccionar con un grupo aldehído formado en el extremo no reductor del polímero mediante oxidación de peryodato (Jennings y Lugowski, J Immunol. 1981; 127: 1011-8; Fernandes y Gregoriadis, Biochim Biophys Acta. 1997; 1341; 26-34). La base de Schiff generada puede estabilizarse mediante reducción específica con  $\text{NaCNBH}_3$  para formar una amina secundaria. Un enfoque alternativo consiste en la generación de grupos amino terminales libres en el ácido polisialílico (PSA) mediante aminación reductora con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  después de una oxidación previa. Para unir dos grupos amino o dos grupos hidroxilo pueden usarse reactivos bifuncionales. Por ejemplo, un PSA que contiene un grupo amino puede acoplarse con grupos amino de la proteína con reactivos como  $\text{BS}^3$  (bis(sulfosucinimidil)suberato / Pierce, Rockford, IL). Además pueden usarse reactivos de reticulación heterobifuncionales como Sulfo-EMCS (N- $\epsilon$ -maleimidocaproiloxi) sulfosuccinimida éster/ Pierce), por ejemplo para unir grupos amina y tiol.

55 Un grupo amino libre de la proteína terapéutica puede someterse a reacción con el grupo 1-carboxilo del residuo de ácido siálico para formar un enlace peptídico, o puede formarse un enlace éster entre el grupo ácido 1-carboxílico u otro grupo activo adecuado en un principio activo. Alternativamente, un grupo carboxilo puede formar un enlace peptídico con un grupo 5-amino desacetilado. En una realización de la invención, se prepara una hidrazida de PSA y se acopla al resto de hidrato de carbono de la proteína antes de la oxidación y generación de funciones aldehído. Un grupo aldehído de una molécula de un compuesto farmacéuticamente activo puede formar una base de Schiff con el grupo 5-amino N-acetilado de un residuo de ácido siálico.

65 El compuesto farmacéuticamente activo puede estar unido de forma covalente directamente con el compuesto polisacárido en cantidades estequiométricas (por ejemplo, 1:1). Alternativamente, dos o más moléculas de

compuesto de polisacárido pueden estar unidas con una molécula de principio activo.

#### Uso

5 La presente invención se refiere a aumentar la semivida *in vivo* de proteínas de coagulación sanguínea, especialmente de FVIIa o derivados biológicamente activos del mismo, que presentan un trastorno hemorrágico asociado con defectos funcionales o deficiencias de FVIIa, en comparación con la semivida *in vivo* de FVIIa no unido con al menos un resto de ácido siálico fisiológicamente aceptable. Además, el conjugado PSA-FVIIa de la presente invención puede usarse para el tratamiento de trastornos hemorrágicos asociados a defectos funcionales o  
10 deficiencias congénitas o adquiridas de al menos uno de los factores FVIII y FIX.

De acuerdo con el estado actual de la técnica terapéutica y de acuerdo con directrices y regulaciones internacionales, la farmacocinética del FVIIa administrado por infusión es aceptada como un sustituto válido de  
15 marcador de eficacia (Björkman y Berntrop, Clin Pharmacokinet. 2001; 40: 815-32).

Esto se basa en la suposición validada de que un producto de FVIIa administrado por infusión que ha sido caracterizado en cuanto a la actividad funcional mediante ensayos normalizados se encontrará en el torrente sanguíneo, donde actuará del modo previsto como un componente de la cascada de coagulación. Por consiguiente, cualquier análisis farmacocinético en modelos animales servirá como predicción de la eficacia prevista en pacientes  
20 tratados con productos de FVIIa.

#### Semivida

En una realización de la presente invención se prolonga la semivida *in vivo* del constructo proteináceo. En una  
25 realización relacionada, la semivida *in vivo* del constructo proteináceo se prolonga al menos al doble, mientras que en otra realización la semivida *in vivo* se prolonga al menos al triple, en comparación con FVIIa que no está unido a ácido siálico. La prolongación de la semivida del FVIIa puede evaluarse midiendo la farmacocinética en ratas, tal como se describe más abajo en los ejemplos.

#### Administración

La vía de administración no presenta ninguna limitación particular y en una realización el constructo proteináceo de la presente invención puede administrarse mediante inyección, tal como inyección intravenosa, intramuscular o  
35 intraperitoneal.

En un aspecto, para administrar composiciones que comprenden un constructo proteináceo de la presente invención a humanos o animales de ensayo, las composiciones comprenden uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los términos “farmacéuticamente” o “farmacológicamente aceptable” se refieren a entidades y composiciones moleculares que son estables, que inhiben la degradación proteínica tal como productos de  
40 agregación y disociación y que además no producen reacciones alérgicas u otras reacciones adversas al administrarse usando vías bien conocidas en la técnica, tal como se describe más abajo. Los “vehículos farmacéuticamente aceptables” incluyen todos y cada uno de los disolventes clínicamente útiles, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares, incluyendo los agentes arriba descritos.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” incluye una dosis adecuada para tratar a un mamífero que tiene una alteración hemorrágica tal como se resume más arriba.

Las composiciones pueden administrarse por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, mediante aerosol de inhalación, vía vaginal, rectal o mediante inyección intracraneal. Tal como se usa en el presente documento, el  
50 término “parenteral” incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intracisternal, o técnicas de infusión. También está prevista una administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar o implante quirúrgico en un sitio particular. En general, las composiciones están sustancialmente libres de pirógenos y de otras impurezas que podrían ser nocivas para el receptor.

Es posible llevar a cabo administraciones simples o múltiples de las composiciones, seleccionando el médico que realiza el tratamiento los niveles de dosis y el patrón de administración. Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosis apropiada dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal como se describe más arriba, de la  
60 gravedad y del curso de la enfermedad, de si el fármaco se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta al fármaco, así como del criterio del médico tratante.

#### Composiciones farmacéuticas

65 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un constructo proteináceo tal como se define más arriba. La composición farmacéutica puede comprender además un

vehículo, diluyente, sal, tampón o excipiente farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede usarse para tratar los trastornos hemorrágicos arriba definidos. La composición farmacéutica de la invención puede consistir en una disolución o un producto liofilizado. Existen muchos métodos conocidos para formar disoluciones estables de proteínas, y específicamente de FVIIa. En la patente estadounidense n° 5.874.408 se divulga un ejemplo. Las disoluciones de la composición farmacéutica pueden someterse a cualquier proceso de liofilización adecuado.

#### Kits

Como un aspecto adicional, la invención incluye kits que comprenden una composición de la invención envasados de un modo que facilita su uso para la administración a un sujeto. En una realización, tal kit incluye un compuesto o una composición tal como se describe en el presente documento (por ejemplo una composición que comprende un constructo proteínico), envasado en un recipiente tal como una botella o recipiente sellado, con una etiqueta fijada al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o composición para poner en práctica el método. En una realización, el kit contiene un primer recipiente que tiene una composición que comprende un constructo proteínico y un segundo recipiente que tiene una disolución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición del primer recipiente. En un aspecto, el compuesto o composición está envasado en una forma de dosificación unitaria. El kit también puede incluir un dispositivo adecuado para administrar la composición de acuerdo con una vía de administración específica. Preferentemente, el kit incluye una etiqueta que describe el uso de la composición proteínica o peptídica terapéutica.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra un SDS-PAGE de rFVIIa después de conjugación con PSA.

Figura 2: muestra la farmacocinética del conjugado rFVIIa-PSA y rFVIIa no modificado en ratas.

Figura 3: muestra la farmacocinética del conjugado rFVIIa-PSA y rFVIIa no modificado en ratas (nivel de antígeno).

Figura 4: muestra un SDS-PAGE de rFVIIa después de conjugación N-terminal con PSA.

Figura 5: muestra una electroforesis capilar de mono-SA rFVIIa y Tri-SA-rFVIIa.

Figuras 6A y B: muestran la farmacocinética de conjugados rFVIIa-PSA y rFVIIa no modificado en ratas. A: mono-SA-rFVIIa. B: Tri-SA-rFVIIa.

Figura 7: muestra una electroforesis capilar de trímero de ácido N-acetilneuramínico.

La presente invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos.

#### Ejemplos

Ejemplo 1 (ejemplo de referencia):

Modificación de residuos lisina en rFVIIa con ácido colomínico

La modificación de residuos de lisina con ácido siálico (ácido colomínico, CA) se llevó a cabo de acuerdo con la descripción de Jennings y Lugowski (J Immunol. 1981; 127; 1011-8). Para este procedimiento se usó CA de Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis; MO). Una disolución acuosa de CA (concentración: 20 mg/ml) que contenía NaIO<sub>4</sub> 0,1 M se agitó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente para oxidar el CA. Después se añadieron dos ml de etilenglicol por ml de la disolución de CA activado y la mezcla se agitó durante otros 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La disolución se dializó a lo largo de la noche contra tampón de fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,2 en oscuridad a una temperatura entre 2 y 8°C.

A continuación se añadió una alícuota de esta disolución a una disolución de rFVIIa (30 µg/ml) en tampón de fosfato de sodio 0,0 1 M, pH 7,2 para obtener una concentración final de 100 mg de CA activado por mg de rFVIIa. Esta mezcla se agitó durante 180 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se añadió NaCNBH<sub>3</sub> (concentración final rFVIIa 10 mg/mg) y la mezcla se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave. Después se añadieron 2,5 ml de una disolución acuosa de TRIS 1 M, pH 7,2, por ml de esta mezcla y la combinación se agitó durante 60 minutos para terminar la reacción.

Los reactivos libres se separaron del conjugado de rFVIIa-ácido CA por cromatografía de intercambio iónico usando una resina QHyperD F 50 µm (Pall BioSeptra, Cergy, Francia) y una columna Pharmacia XK-10 (Pharmacia XK 10; h = 15 cm). La proteína de CA conjugada se sometió a elución con tampón de elución (HEPES 20mM /NaCl 1 M, pH 8,0). En un paso final, el eluato se concentró mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) usando una membrana de 30 kD (celulosa regenerada/Millipore) contra tampón HEPES 20 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 150 mM y un 0,5%

de sacarosa.

Ejemplo 2 (ejemplo de referencia):

5 Caracterización bioquímica del rFVIIa polisialilado

La actividad enzimática de rFVIIa-PSA se determinó mediante un ensayo de coagulación en el que se añadió FVIIa a un plasma con deficiencia de FVII y la coagulación se activó mediante un factor de tejido truncado que reacciona con FVIIa pero no con FVII (Staclot, Diagnostica Stago, Asnières, Francia).

10 La actividad de derivación de FVIII de rFVII-PSA se midió mediante un ensayo de generación de trombina (TGA), en el que se añadió FVIIa a un plasma con hemofilia A grave, que contenía un alto título de inhibidor anti-FVIII en presencia de un sustrato de péptido de fluorescencia específico para trombina. La coagulación se activó con un complejo de factor tisular-fosfolípido y la generación de trombina se midió de forma continua mediante la tasa de disociación del fluoróforo del sustrato. La actividad de generación de trombina se calculó a partir del pico de trombina, es decir, la concentración máxima de trombina observada durante el ensayo. En ambos casos se usó una preparación de FVIIa recombinante NovoSeven (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca) como referencia.

20 Tal como se puede ver en la tabla 1, la actividad específica de PSA-rFVIIa disminuyó después de la modificación.

Tabla 1: Actividad específica de rFVIIa antes y después de la conjugación con PSA

	Actividad de FVIIa	
	STF (U/mg proteína)	TGA (U/mg proteína)
rFVIIa no modificado	45942	44296
rFVIIa-PSA	1003	22

25 La modificación se visualizó mediante SDS-PAGE realizado bajo condiciones no reductoras. Se llevó a cabo una inmunotinción con un anticuerpo anti-FVII policlonal (Affinity Biologicals; Ancaster, Canadá) y con un anticuerpo anti-PSA monoclonal (Chemicon International, Temecula, CA, EEUU). La modificación resultó en un aumento del PM de FVIIa demostrado mediante un área con una mancha en correlación con la proteína que contenía PSA (figura 1).

Ejemplo 3 (ejemplo de referencia):

30 Farmacocinética del conjugado rFVIIa-PSA en ratas

35 Cuatro ratas (CrI: CD(SD), Charles River Laboratories, Wilmington, MA) fueron anestesiadas y se les administró conjugado rFVIIa-PSA (16.500 U FVIIa/kg) en tampón (1,3 g/l de glicilglicina, 3 g/l de cloruro de sodio, 30 g/l de manitol, 1,5 µl de CaCl<sub>2</sub>.x 2H<sub>2</sub>O, 0,1 g/l de Tween 80, pH 5,5) mediante inyección intravenosa en la vena caudal, en una dosis volumétrica de 20 ml por kg. En 6 ratas normales se usó rFVIIa no modificado en una dosis de 18.000 U FVIIa/kg como control. Cinco minutos, 30 minutos, 1 hora, 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de la administración de la sustancia se tomaron muestras de sangre del plexo venoso retrobulbar, se preparó citrato de plasma y se congeló para análisis posteriores.

40 Después se midió la actividad de FVIIa (Staclot, Diagnostica Stago, Asnières, Francia) en plasma. La semivida del rFVIIa no modificado era de 1,1 horas, y en el conjugado de rFVIIa había aumentado a 2,3 horas (figura 2).

45 La farmacocinética de los niveles de antígeno de FVIIa se midió en un experimento adicional. Seis ratas fueron anestesiadas y se les administró conjugado de rFVIIa-PSA (350 µg/kg) en tampón (1,3 g/l de glicilglicina, 3 g/l de cloruro de sodio, 30 g/l de manitol, 1,5 g/l de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,1 g/l de Tween 80, pH 5,5) por inyección intravenosa en la vena caudal en una dosis volumétrica de 10 ml por kg. En 6 ratas normales se usó rFVIIa no modificado en una dosis de 390 µg/kg como control. Cinco minutos, 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas después de la administración de la sustancia se tomaron muestras de sangre del plexo venoso retrobulbar. Se preparó citrato de plasma y se congeló para análisis posteriores. Los niveles de antígeno de FVII en plasma se midieron con un ELISA (anticuerpo de FVII antihumano policlonal). El cálculo de la semivida por regresión lineal determinada con MS Excel dio como resultado 1,1 horas en el caso del rFVIIa nativo y 3,1 horas en el caso del conjugado de rFVIIa. Los datos del antígeno FVII se normalizan con respecto al nivel de plasma medio obtenido 5 minutos después de la administración (figura 3).

55 Ejemplo 4 (ejemplo de referencia):

Polisililación N-terminal de FVIIa

60 La conjugación de CA en el extremo N de FVIIa se llevó a cabo a pH 6,0. Para este procedimiento se usó CA de Sigma (Sigma-Aldrich), que se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharose FF (GE Healthcare, Munich, Alemania). Una disolución acuosa de CA purificado (concentración: 23

mg/ml), que contenía  $\text{NaIO}_4$  0,04M, se agitó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente para oxidar el CA. A continuación, una parte alícuota de esta disolución se añadió a una disolución de rFVIIa (740  $\mu\text{g/ml}$ ) en tampón de fosfato de sodio 0,05M, pH 6,0, para obtener una concentración final de 60 mg de CA activado por mg de rFVIIa (aproximadamente 150 exceso molar). Esta mezcla se agitó durante 180 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se añadió  $\text{NaCNBH}_3$  (25 mg/mg rFVIIa) y la mezcla se incubó durante 24 horas a 4°C en oscuridad con agitación suave. Luego se añadieron 2,5 ml de una disolución acuosa de TRIS 1 M, pH 7,2, por cada ml de esta mezcla y se agitó en oscuridad a 4°C durante 60 minutos para finalizar la reacción.

Los reactivos libres se separaron del conjugado de rFVIIa-CA mediante cromatografía de intercambio iónico usando una resina QHyperD F 50  $\mu\text{m}$  (Pall BioSeptra, Cergy, Francia) y una columna Pharmacia XK-16 (Pharmacia XK 16; h = 14 cm). Después, la proteína conjugada con CA se sometió a elución con tampón de elución (HEPES 20 mM / NaCl 0,5M, pH 8,0). En un paso final, el eluato se concentró mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD (celulosa regenerada Millipore) contra tampón HEPES 20 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 150 mM. La cromatografía de intercambio iónico y el paso de UF/DF se llevaron a cabo a 4°C.

La actividad enzimática de rFVIIa-PSA modificado en el extremo N se determinó mediante un ensayo de coagulación y un ensayo de generación de trombina, tal como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Actividad específica de rFVIIa antes y después de la conjugación N-terminal con PSA

	Actividad de FVIIa	
	STF (U/mg proteína)	TGA (U/mg proteína)
rFVIIa no modificado	52749	56814
rFVIIa-PSA - (N-terminal)	25030	12564

La actividad específica de PSA-rFVIIa conjugado en el extremo N disminuyó a aproximadamente un 50% de acuerdo con la medición mediante el ensayo STF, y al 25% mediante TGA.

La modificación se visualizó mediante SDS-PAGE realizado bajo condiciones no reductoras desarrolladas por inmunotinción con un anticuerpo anti-FVII policlonal y con un anticuerpo anti-PSA policlonal tal como se describe en el Ejemplo 2. La modificación resultó en un ligero aumento del PM de FVIIa en correlación con las bandas mostradas en inmunotransferencia con tinción anti-PSA (figura 4).

Ejemplo 5 (ejemplo de referencia):

Conjugación de FVIIa con ácido N-acetilneuramínico sintético activado con CNBr

El rFVIIa se conjugó con ácido N-acetilneuramínico tal como se describe en el documento US 3.487.890. Trescientos cincuenta mg de ácido N-acetilneuramínico sintético (Sigma-Aldrich) se disolvieron en 10 ml de tampón HEPES 0,1 M, pH 9,0. Después se añadieron a esta disolución 430 mg de CNBr (Fluka, Steinhamm, Alemania) y el pH se ajustó a 9,5 con NaOH 0,5M durante el procedimiento de activación. Después de 30 minutos el pH era de 9,5. Luego, el pH se ajustó a 8,4 mediante adición de HCl 0,1 M. Durante todo el procedimiento de activación, la temperatura se controló usando de un baño de hielo y se mantuvo a 20 - 25°C. Para la conjugación del ácido N-acetilneuramínico activado con rFVIIa se añadió una disolución de rFVIIa (50 ml / 0,44 mg de rFVIIa/ml) en tampón de fosfato 50 mM, pH 7,2 y la mezcla se incubó con agitación suave a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se añadieron 20 ml de tampón de Tris 0,2M para finalizar la reacción y bloquear los ésteres cianato libres y la mezcla se incubó con agitación suave durante 15 minutos. Finalmente, la disolución se concentró mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD (celulosa regenerada/ Millipore) contra tampón fosfato 50 mM, pH 7,2.

Ejemplo 6 (ejemplo de referencia):

Conjugación de FVIIa con trímero de ácido N-acetilneuramínico sintético activado con CNBr

El rFVIIa se conjugó con un trímero de ácido N-acetilneuramínico sintético obtenido de TimTec, LLC (Newark, EEUU) tal como se describe en el documento US 3.487.890 para ácido N-acetilneuramínico. Trescientos cincuenta mg del trímero de ácido N-acetilneuramínico se disolvieron i en 10 ml de tampón HEPES 0,1 M, pH 9,0. Después se añadieron a esta disolución 430 mg de CNBr (Fluka) y el pH se ajustó a 9,5 con NaOH 0,5M durante el procedimiento de activación. Después de 30 minutos el pH era de 9,5. El pH se ajustó a 8,4 mediante adición de HCl 0,1 M. Durante todo el procedimiento de activación, la temperatura se controló usando de un baño de hielo y se mantuvo a 20 - 25°C. Después se llevó a cabo la conjugación del trímero activado con FVIIa tal como se describe en el Ejemplo 5.

Ejemplo 7 (ejemplo de referencia):

Caracterización bioquímica de Mono-SA-FVIIa y Tri-SA-FVIIa

La actividad de rFVIIa modificado conjugado con ácido N-acetilneuramínico (Mono-SA) descrito en el Ejemplo 5 o de trímero de ácido N-acetilneuramínico (Tri-SA) descrito en el Ejemplo 6 se determinó mediante un ensayo de coagulación y un ensayo de generación de trombina tal como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: Actividad específica de rFVIIa antes y después de la conjugación N-terminal con PSA

	Actividad de FVIIa	
	STF (U/mg proteína)	TGA (U/mg proteína)
rFVIIa no modificado	40579	57230
Mono-SA-rFVIIa	6064	21784
Tri-SA-rFVIIa	1743	4131

La actividad específica del rFVIIa conjugado con oligo-PSA disminuyó de acuerdo con la medida mediante el ensayo STF, pero el mono-SA-rFVIIa mantuvo aproximadamente un 50% de su actividad de derivación de FVIII de acuerdo con la medición por TGA.

Además se investigaron el Mono-SA-rFVIIa y el Tri-SA-rFVIIa mediante electroforesis capilar (CE) de acuerdo con la descripción de Klausen y Kornfelt (J Chromatogr A. 1995; 718: 195-202). La Figura 5 muestra los resultados. Éstos indican un claro desplazamiento a mayores tiempos de retención del Mono-SA-rFVIIa y el Tri-SA-rFVIIa debido a cargas negativas adicionales en comparación con el rFVIIa nativo.

Ejemplo 8 (ejemplo de referencia):

Farmacocinética de conjugado de rFVIIa-mono SA y rFVIIa-tri SA en ratas

Doce ratas fueron anestesiadas y se les administró conjugado de rFVIIa-mono SA (400 µg de proteína/kg) en tampón (1,3 g/l de glicilglicina, 3 g/l de cloruro de sodio, 30 g/l de manitol, 1,5 g/l de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,1 g/l de Tween 80, pH 5,5) por inyección intravenosa en la vena caudal en una dosis volumétrica de 10 ml por kg. Cuatro ratas fueron tratadas con conjugado de rFVIIa-tri SA (400 µg de proteína/kg). En 8 ratas normales se usó rFVIIa no modificado en una dosis de 400 µg de proteína/kg como control. Cinco minutos, 30 minutos, 1, 2, 4, 7, 10 y 22 horas después de la administración de la sustancia se tomaron muestras de sangre del plexo venoso retrobulbar, se preparó citrato de plasma y se congeló para análisis posteriores. Los niveles de antígeno de FVII en plasma se midieron con ELISA (anticuerpo de FVII antihumano policlonal). Los datos se normalizaron con respecto a la concentración hallada en plasma 5 minutos después de la administración. Siete horas después de la administración, los niveles de plasma de rFVIIa-mono-SA y tri-SA-rFVIIa eran mayores que los del control de rFVIIa nativo. Los resultados están ilustrados en la Figura 6A (rFVIIa-mono SA) y la Figura 6B (rFVIIa-tri SA).

Ejemplo 9 (ejemplo de referencia):

Acoplamiento de trímero de ácido N-acetilneuramínico con rFVIIa mediante aminación reductora

La conjugación de rFVIIa con trímero de ácido N-acetilneuramínico mediante aminación reductora se llevó a cabo de acuerdo con la descripción de Biessen et al. (Biochem J 1994; 299: 291-6). 350 mg de trímero de ácido N-acetilneuramínico (TimTec) se disolvieron en 10 ml de tampón HEPES 0,1 M, pH 7,0, y se añadieron a 32 ml de una disolución de FVIIa recombinante en HEPES 20 mM, 70 mM de NaCl, pH 7,4 (0,3 mg/ml). Después se añadió NaCNBH<sub>3</sub> para obtener una concentración final 50 mg/ml y el pH se corrigió a pH 7,0 mediante adición de HCl 0,1 M. La mezcla se incubó a 37°C con agitación suave durante 48 horas. La disolución se concentró mediante UF/DF usando una membrana de 10 kD (celulosa regenerada/Millipore) contra tampón Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4.

La conjugación del trímero de ácido N-acetilneuramínico con el rFVIIa se demostró mediante CE realizada de acuerdo con Klausen y Kornfelt (J Chromatogr A. 1995, 718: 195-202). Los resultados se indican en la Figura 7. Éstos indican un claro desplazamiento del derivado a mayores tiempos de retención en comparación con el rFVIIa nativo.

Ejemplo 10 (ejemplo de referencia):

Purificación y derivación de ácido colomínico

El CA se purificó por cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharose FF tal como se describe en el documento WO 0601616 A1. Cinco g de CA se disolvieron en 50 ml de tampón de trietanolamina 10 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 25 mM (= tampón inicial). Esta disolución se aplicó en una columna Pharmacia XK50 rellena de Q-Sepharose FF (GE Healthcare), que había sido equilibrada con tampón inicial. Después, la columna se lavó con 8 volúmenes de columna (CV) de tampón inicial y el CA unido se eluyó paso a paso con 3 CV de NaCl 200 mM, NaCl

350 mM y NaCl 500 mM en tampón inicial. La fracción eluida con NaCl 350 mM mostraba un peso molecular de 20 kDa según indicó una electroforesis en gel SDS. Esta fracción se concentró por ultrafiltración usando una membrana de 5 kD hecha de celulosa regenerada (Millipore) y a continuación se diafiltró contra tampón de fosfato de 50 mM, pH 7,2. Después, el CA se oxidó con NaIO<sub>4</sub> tal como se describe en el Ejemplo 1 y se introdujo un grupo amino primario terminal mediante aminación reductora tal como se describe en el ejemplo WO 05016973 A1. Para la aminación reductora, 11 ml de una disolución de NH<sub>4</sub>Cl se añadieron a 20 ml de una disolución que contenía 58 mg de PSA oxidado / ml en tampón de fosfato 50 mM, pH 7,2. Después se añadió una disolución de NaCNBH<sub>3</sub> 5M en NaOH 1 M para obtener una concentración final de 75 mM. La reacción se llevó a cabo durante 5 días a temperatura ambiente con un pH 8,0. Después, la mezcla se dializó contra una disolución de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mg/l) que contenía NaCl 10 mM y a continuación contra tampón de fosfato 50 mM, pH 8,0, que contenía EDTA 5 mM. Luego se introdujo un grupo sulfhidrilo mediante reacción del grupo amino primario terminal con 2-iminotiolano (reactivo de Traut / Pierce). La reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato 50 mM, pH 8,0, que contenía EDTA 5 mM con un exceso molar por un factor 20 de reactivo durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, la disolución de PSA que contenía un grupo SH terminal libre se sometió a ultrafiltración/diafiltración usando una membrana con una interrupción de 5 kD y hecha de celulosa regenerada (Millipore).

Ejemplo 11 (ejemplo de referencia):

Acoplamiento de PSA a rFVIIa empleando un reticulante heterobifuncional

Se purificó PSA (Sigma-Aldrich) mediante cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharose FF (GE-Healthcare) y se introdujo un grupo sulfhidrilo terminal mediante modificación química para formar PSA-SH tal como se describe en el Ejemplo 10. Para acoplar PSA-SH a rFVIIa se usó el reticulante heterobifuncional soluble en agua Sulfo-EMCS ((éster N-ε-maleimidocaproiloxi) sulfosuccinimida / Pierce), que contenía dos grupos reactivos: un grupo maleimido para la conjugación con grupos SH y un grupo éster sulfo-NHS para la conjugación con grupos amino libres. A 2 ml de una disolución de rFVIIa (1,6 mg/ml) en tampón HEPES 20 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 150 mM, se le añadió Sulfo-EMCS para obtener una concentración final de 0,07 mg de reticulante/mg de proteína). La reacción se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron, 130 mg de PSA-SH (exceso en un factor 100) preparados de acuerdo con el Ejemplo 10, y a continuación se llevó a cabo la reacción de acoplamiento del complejo de enlace intermedio/rFVIIa con el PSA-SH durante otras 2 horas a temperatura ambiente. Después, la mezcla se purificó mediante cromatografía por HIC en butil-Sepharose (GE-Healthcare). Luego se añadió una disolución de NaCl 5M a la mezcla para obtener una concentración final de NaCl 3M. Después, la mezcla se aplicó a la columna rellena de butil-Sepharose (GE-Healthcare) y la elución del conjugado de rFVIIa-PSA se llevó a cabo con tampón HEPES 50 mM, pH 7,4, que contenía CaCl<sub>2</sub> 6,7 mM. Después de la elución del conjugado, el pH se ajustó a pH 6,9.

Ejemplo 12:

Conjugación de PSA - hidrazida con el resto de hidrato de carbono de rFVIIa

Para la conjugación de PSA con la fracción de hidrato de carbono de rFVIIa se prepara una disolución de rFVIIa en tampón HEPES 20 mM, pH 6,0 (1,6 mg/ml). A 9 volúmenes de esta disolución se le añade 1 volumen de una disolución de NaIO<sub>4</sub> 5 mM y se mezcla suavemente. La reacción de oxidación se lleva a cabo durante 1 hora a 4°C en oscuridad para generar grupos aldehído libres. Después se añade bisulfito de sodio (concentración final 5 mM) para detener la reacción. A continuación se añade PSA-hidrazida (WO 0606168 A2) (concentración final 10 mM) y la reacción de acoplamiento con los grupos aldehído se lleva a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, el conjugado de PSA-rFVIIa se purifica mediante cromatografía de intercambio aniónico en QHyperD (Pall BioSeptra) tal como se describe en el Ejemplo 1.

## 50 Puntos

1. Un constructo proteínico químicamente modificado que comprende,

(a) una molécula de factor VII activado (FVIIa) seleccionada del grupo que consiste en FVIIa plasmático, FVIIa recombinante (rFVIIa) y un derivado biológicamente activo de FVIIa; y

(b) al menos un resto de hidrato de carbono fisiológicamente aceptable que comprende de 1 a 4 unidades de ácido siálico unidas a dicha molécula de FVIIa;

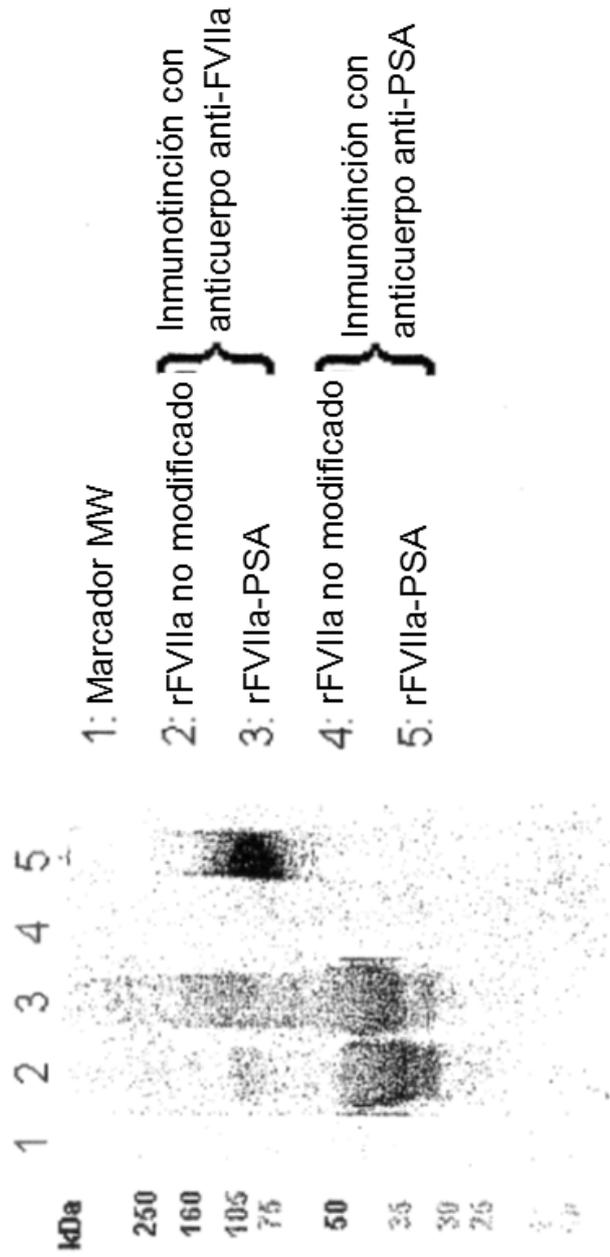
en el que la semivida *in vivo* de dicho constructo se prolonga en la sangre de un mamífero en comparación con la semivida *in vivo* de una molécula de FVIIa que no está unida a dicho resto de hidrato de carbono.

2. El constructo proteínico del punto 1, en el que la semivida *in vivo* de dicho constructo se aumenta en al menos un factor de aproximadamente dos en comparación con la semivida *in vivo* de una molécula de FVIIa que no está unida a dicho resto de hidrato de carbono.

3. El constructo proteínáceo del punto 1, en el que la semivida *in vivo* de dicho constructo se aumenta en al menos un factor de aproximadamente tres en comparación con la semivida *in vivo* de una molécula de FVIIa que no está unida a dicho resto de hidrato de carbono.
- 5 4. El constructo proteínáceo del punto 1, en el que el resto de hidrato de carbono fisiológicamente aceptable está unido de forma covalente directamente a al menos un residuo de aminoácido de dicha molécula de FVIIa.
5. El constructo proteínáceo del punto 1, en el que el resto de hidrato de carbono fisiológicamente aceptable no está unido de forma covalente a al menos un residuo de aminoácido de dicha molécula de FVIIa.
- 10 6. El constructo proteínáceo del punto 1, en el que dicho resto de hidrato de carbono fisiológicamente aceptable es un ácido polisiálico o un derivado del mismo.
- 15 7. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del constructo proteínáceo del punto 1, y uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un vehículo, diluyente, sal, tampón y excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 20 8. Un método para controlar hemorragias en un mamífero que tiene un trastorno hemorrágico asociado con defectos funcionales o deficiencias de al menos uno de FVIIa, factor VIII (FVIII) y factor IX (FIX), comprendiendo dicho método la administración del constructo proteínáceo del punto 1.
9. Un método para controlar hemorragias en un mamífero durante cirugías o traumatismos, comprendiendo dicho método la administración del constructo proteínáceo del punto 1.
- 25 10. Un kit que comprende una cantidad eficaz del constructo proteínáceo del punto 1, envasado en un recipiente, conteniendo dicho kit opcionalmente un segundo agente terapéutico, y que además comprende una etiqueta unida al recipiente o envasada con éste, etiqueta que describe el contenido del recipiente y proporciona indicaciones y/o instrucciones con respecto al uso del contenido del recipiente para controlar hemorragias en un mamífero.
- 30 11. El kit del punto 10, en el que el recipiente es un vial o botella o jeringa precargada.

## REIVINDICACIONES

1. Molécula de FVIIa químicamente modificada que comprende:
- 5 (a) una molécula de FVIIa seleccionada del grupo que consiste en FVIIa plasmático y FVIIa recombinante (rFVIIa); y
- 10 (b) al menos un resto de hidrato de carbono fisiológicamente aceptable que comprende de 1 a 4 restos de ácido siálico unido o ácido polisialico unidos a uno o más restos de hidrato de carbono oxidados en dicho FVIIa; y
- 15 en la que la semivida *in vivo* de dicha molécula de FVIIa químicamente modificada se prolonga en la sangre de un mamífero en comparación con la semivida *in vivo* de una molécula de FVIIa que no está químicamente modificada.
2. Molécula de FVIIa químicamente modificada según la reivindicación 1, en la que la semivida *in vivo* se aumenta en al menos un factor de aproximadamente dos en comparación con la semivida *in vivo* de una molécula de FVIIa que no está químicamente modificada.
- 20 3. Molécula de FVIIa químicamente modificada según la reivindicación 1, en la que la semivida *in vivo* se aumenta en al menos un factor de aproximadamente tres en comparación con la semivida *in vivo* de una molécula de FVIIa que no está químicamente modificada.
- 25 4. Molécula de FVIIa químicamente modificada según la reivindicación 1, en la que dicho resto de hidrato de carbono fisiológicamente aceptable es un ácido polisialico.
5. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la molécula de FVIIa químicamente modificada según la reivindicación 1, y uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un vehículo, diluyente, sal, tampón y excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 30 6. Molécula de FVIIa químicamente modificada según la reivindicación 1, para su uso en un método para controlar hemorragias en un mamífero que tiene un trastorno hemorrágico asociado con defectos funcionales o deficiencias de al menos uno de FVIIa, factor VIII (FVIII) y factor IX (FIX).
- 35 7. Molécula de FVIIa químicamente modificada según la reivindicación 1, para su uso en un método para controlar hemorragias en un mamífero durante cirugías o traumatismos.
8. Kit que comprende una cantidad eficaz de la molécula de FVIIa químicamente modificada según la reivindicación 1, envasada en un recipiente, conteniendo dicho kit opcionalmente un segundo agente terapéutico, y que además comprende una etiqueta unida al recipiente o envasada con éste, etiqueta que describe el contenido del recipiente y proporciona indicaciones y/o instrucciones con respecto al uso del contenido del recipiente para controlar hemorragias en un mamífero.
- 40 9. Kit según la reivindicación 8, en el que el recipiente es un vial o botella o jeringa precargada.
- 45 10. Método de preparación de una molécula de FVIIa químicamente modificada que comprende: poner en contacto un resto de hidrato de carbono oxidado con una molécula de FVIIa con el menos un resto de hidrato de carbono fisiológicamente aceptable que comprende de 1 a 4 restos de ácido siálico o ácido polisialico en condiciones que permiten la conjugación; en el que dicha molécula de FVIIa se selecciona del grupo que consiste en FVIIa plasmático y FVIIa recombinante (rFVIIa).
- 50 11. Método según la reivindicación 10, en el que el resto de hidrato de carbono fisiológicamente aceptable es PSA.



**Figura 1**

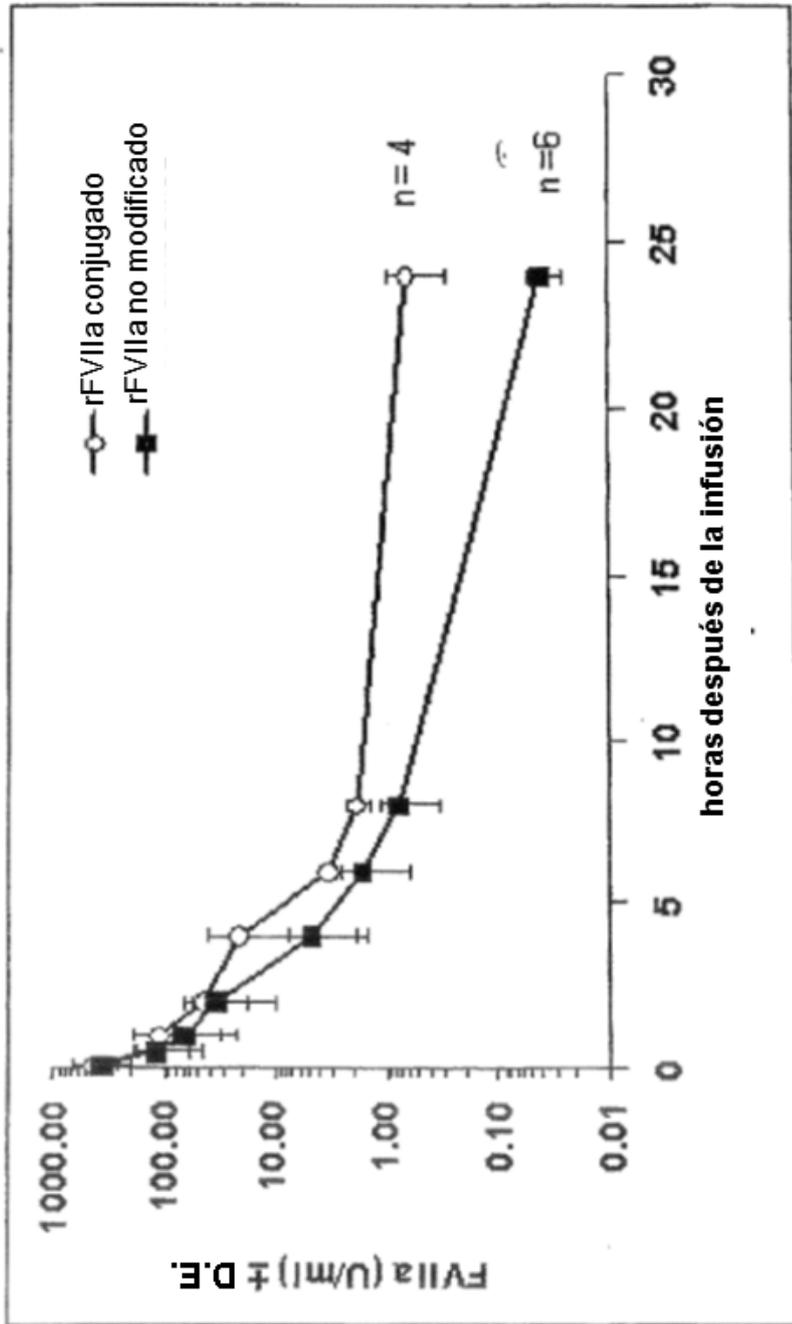


Figura 2

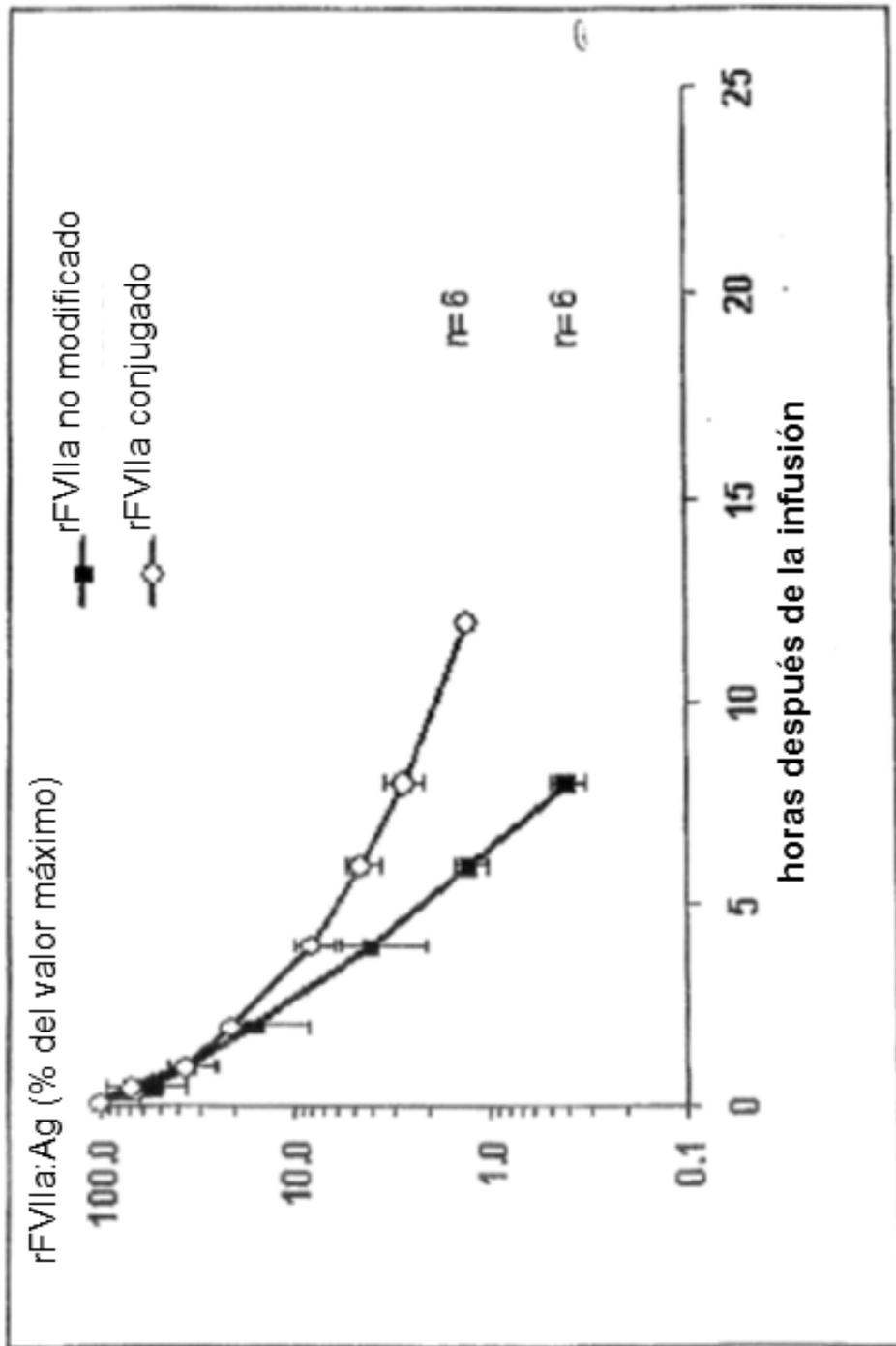
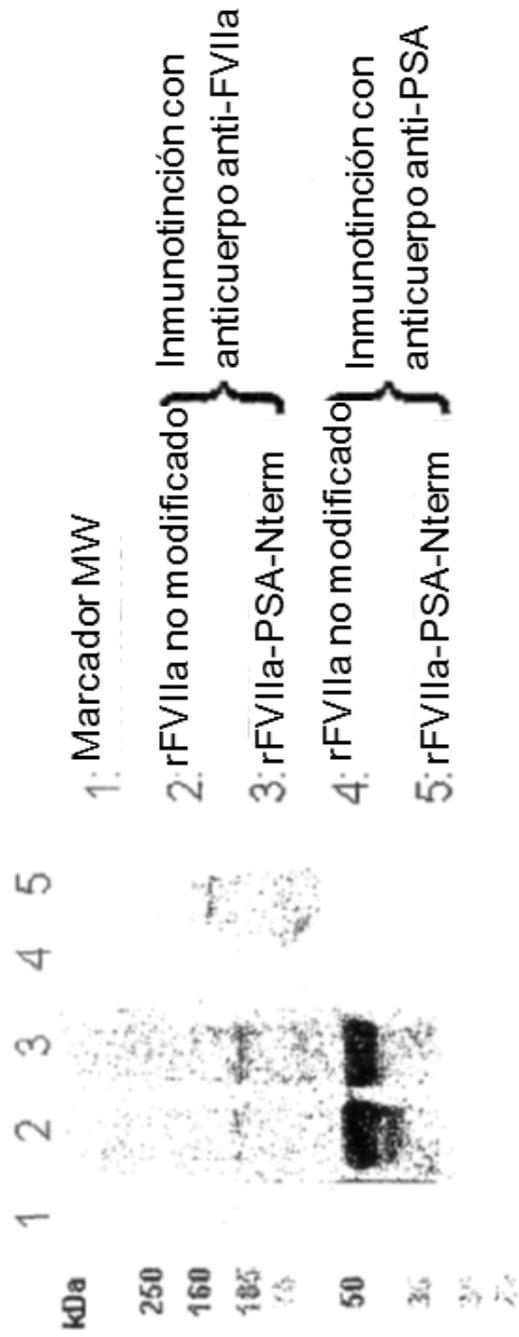


Figura 3



**Figura 4**

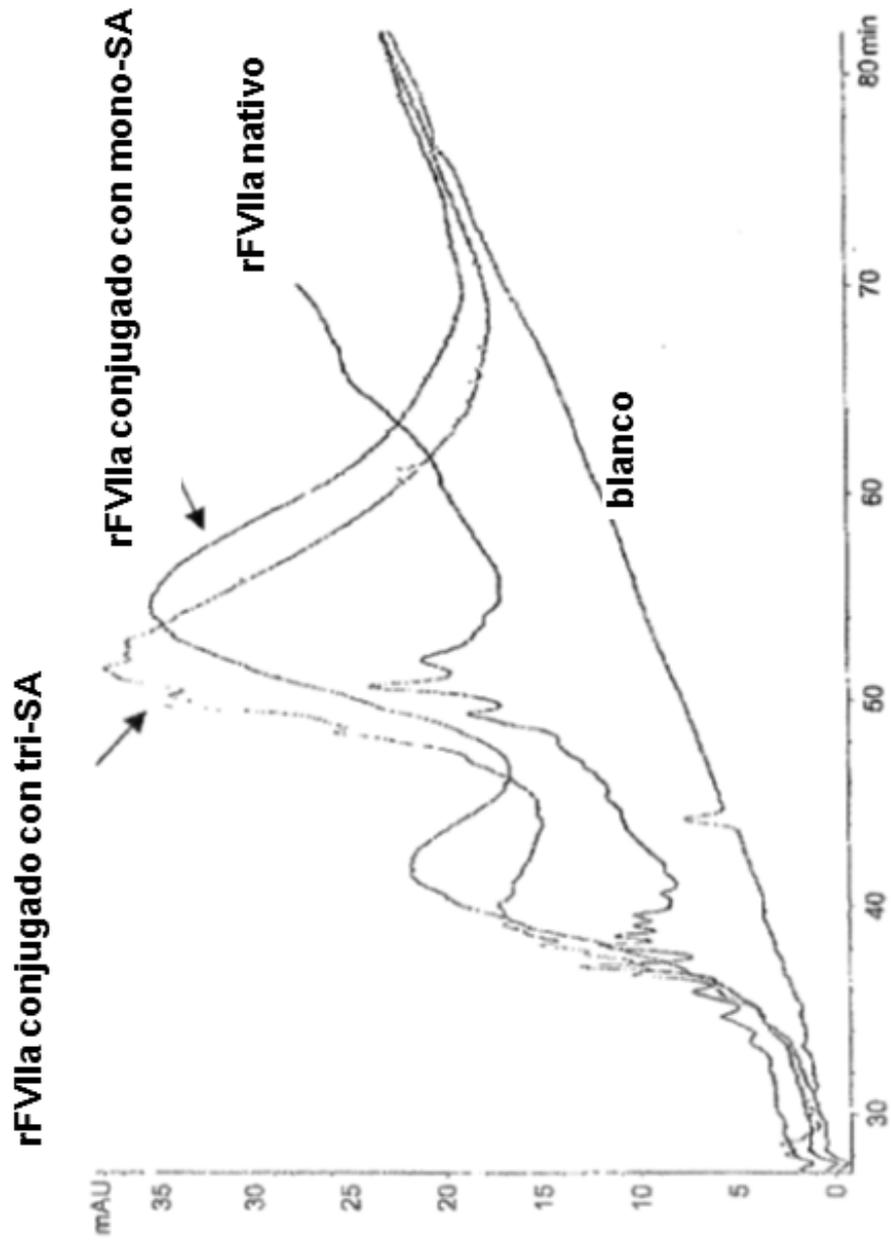


Figura 5

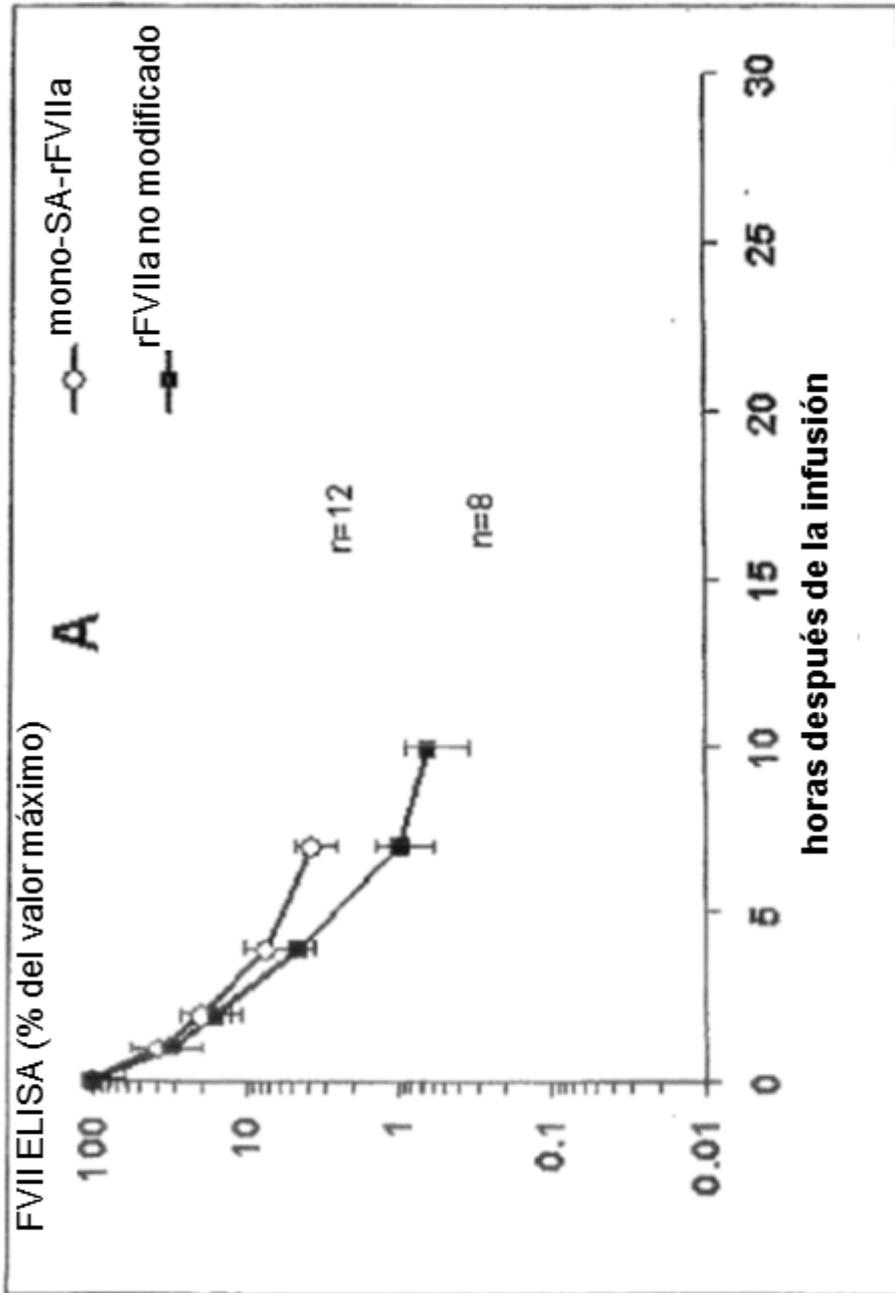


Figura 6A

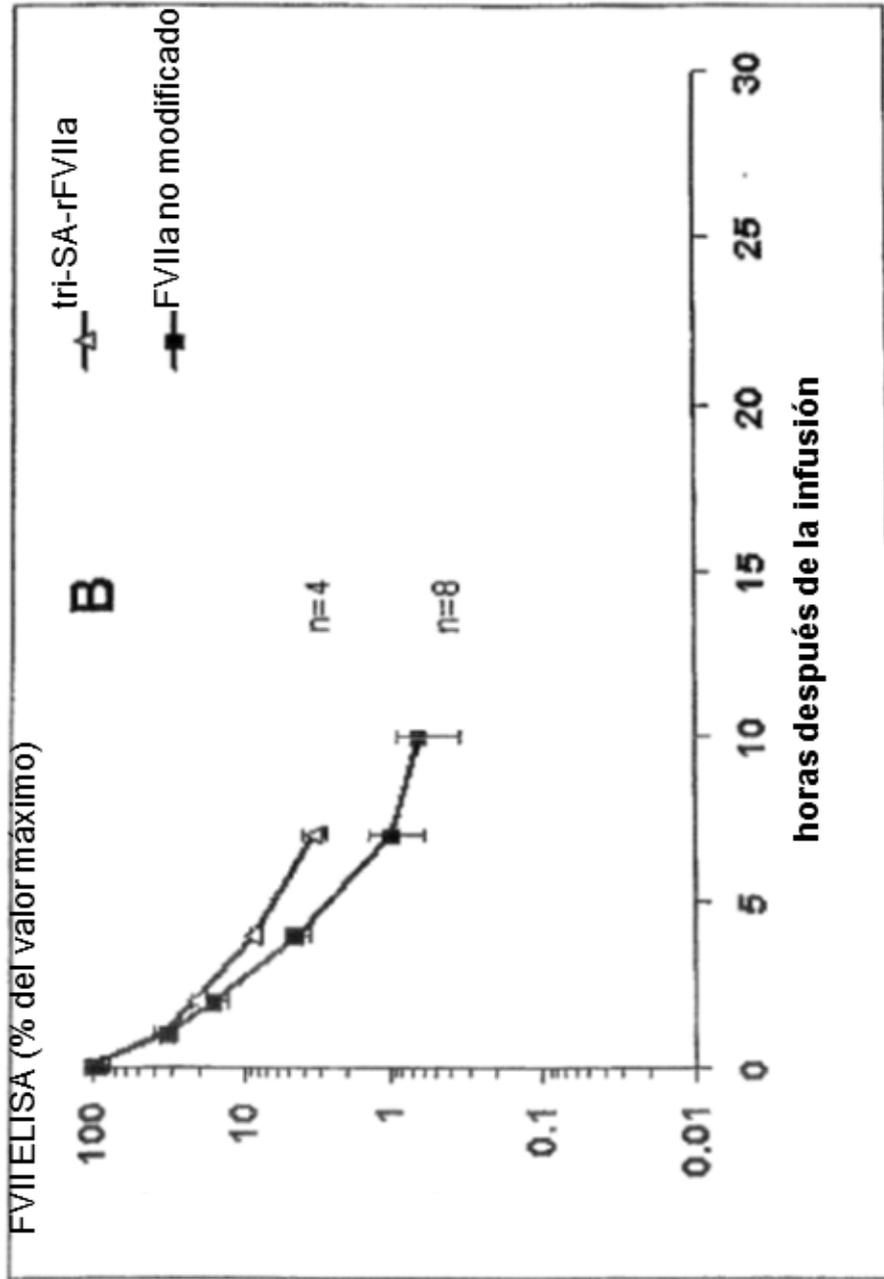


Figura 6B

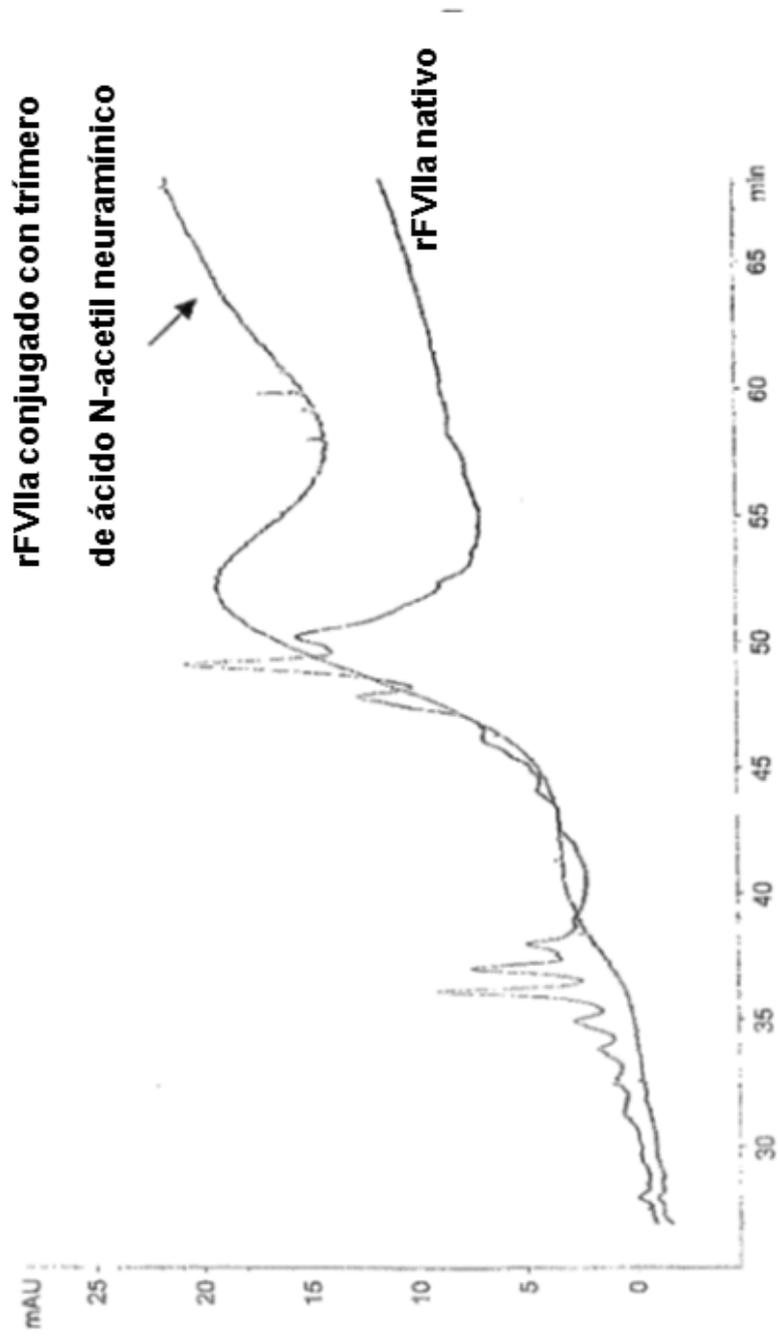


Figura 7