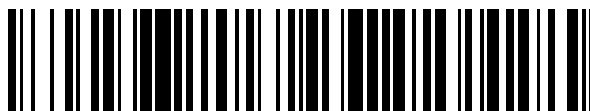


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 455**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2013 PCT/JP2013/075978**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14050926**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2013 E 13842222 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2902787**

54 Título: **Método para evaluar la reacción de coagulación sanguínea**

30 Prioridad:

28.09.2012 JP 2012217925

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

18.05.2018

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (50.0%)
5-1, Ukima 5-chome
Kita-ku, Tokyo 115-8543, JP y
PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION NARA
MEDICAL UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SOEDA, TETSUHIRO;
KITAZAWA, TAKEHISA y
SHIMA, MIDORI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 668 455 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 para evaluar la reacción de coagulación sanguínea

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a métodos para evaluar la reacción de coagulación sanguínea mediada por una sustancia que tiene una actividad de sustitución funcional para el factor de coagulación VIII (FVIII). Además, la presente invención se refiere a reactivos para evaluar la reacción de coagulación sanguínea que contienen el factor de coagulación XI activado (FXIa); y kits que contienen dicho reactivo, para evaluar la reacción de coagulación sanguínea mediada por una sustancia que tiene una actividad de sustitución funcional del factor de coagulación VIII.

Antecedentes de la invención

- 10 La hemofilia es una enfermedad hemorrágica causada por deficiencia congénita o disfunción del factor de coagulación VIII (FVIII) o factor de coagulación IX (FIX). La primera se conoce como hemofilia A y la segunda como hemofilia B. Sus genes se encuentran en el cromosoma X y sus anomalías genéticas se transmiten por herencia recesiva ligada al sexo. Por lo tanto, más del 99% de los pacientes que desarrollan la enfermedad son hombres. Se sabe que la tasa de prevalencia es de aproximadamente uno de cada 10.000 nacidos vivos, y la relación entre la hemofilia A y la hemofilia B es de aproximadamente 5:1.

- 15 En pacientes con hemofilia, los principales sitios de hemorragia son, por ejemplo, intraarticular, intramuscular, subcutáneo, intraoral, intracraneal, tracto digestivo e intranasal. En particular, la hemorragia intraarticular repetida podría desarrollar trastornos articulares o artropatía hemofílica que acompañan a la dificultad para caminar y, en algunos casos, eventualmente requerir una cirugía de reemplazo articular. Por lo tanto, este es un factor importante que disminuye la calidad de vida de los pacientes con hemofilia.

- 20 La gravedad de la hemofilia se correlaciona bien con la actividad de FVIII o FIX en la sangre. Los pacientes con actividad inferior al 1% se clasifican como graves, los pacientes con actividad del 1% o más y menos del 5% se clasifican como moderados, y los pacientes con una actividad del 5% o más y menos del 40% se clasifican como leves. Los pacientes graves, que representan aproximadamente la mitad de los pacientes con hemofilia, presentan síntomas de sangrado varias veces al mes, lo que es notablemente frecuente en comparación con pacientes moderados y leves. Por lo tanto, en pacientes con hemofilia grave, mantener la actividad de FVIII o FIX en la sangre al 1% o más mediante la terapia de reemplazo con FVIII o FIX puede ser efectiva para prevenir la manifestación de los síntomas de sangrado (Documento no de patente 1).

- 25 Además de la hemofilia y la hemofilia adquirida, la enfermedad de von Willebrand, que es causada por la disfunción o deficiencia del factor de von Willebrand (vWF), se conoce como una anomalía hemorrágica relacionada. El vWF es necesario para que las plaquetas no solo se adhieran adecuadamente a los tejidos subendoteliales en un sitio dañado en la pared de los vasos sanguíneos, sino también para formar un complejo con FVIII y mantener el nivel sanguíneo normal de FVIII. Estas funciones disminuyen en los pacientes con la enfermedad de von Willebrand, causando disfunción de la hemostasia.

- 30 Para prevenir y/o tratar hemorragias en pacientes con hemofilia, se utilizan principalmente factores de coagulación sanguínea purificados a partir del plasma o producidos por técnicas de recombinación genética.

- 35 Los métodos conocidos para controlar la eficacia de los factores de coagulación sanguínea tales como FVIII incluyen el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), el método de coagulación de una etapa basado en APTT y el ensayo de generación de trombina (TGA). El APTT y el método de coagulación en una etapa se han usado ampliamente durante mucho tiempo como métodos para controlar la eficacia de las formulaciones de FVIII. APTT es un método para medir el tiempo requerido para la conversión de fibrinógeno a fibrina insoluble después de agregar un reactivo APTT y luego CaCl_2 a un plasma de prueba; es decir, el tiempo hasta el inicio de la coagulación. El método de coagulación de una etapa es un método para medir el tiempo de coagulación por el mismo método que el APTT en un plasma deficiente en FVIII al que se ha agregado un plasma de prueba diluido con un tampón a una cierta relación, y determinar la actividad del FVIII en la prueba del plasma en base a una curva de calibración que se ha obtenido mediante el uso de diluciones en serie de plasma normal en lugar del plasma de prueba. TGA es un ensayo para medir la cantidad de trombina generada a lo largo del tiempo a medida que progresa la reacción de coagulación, donde la cantidad de trombina se mide como la actividad enzimática usando un sustrato fluorogénico para trombina (Documento no de patente 2). TGA permite la evaluación de una serie de reacciones de coagulación, desde el inicio de la generación de trombina en la reacción de coagulación hasta la generación de trombina en la fase de amplificación de la reacción de coagulación. Además, para los reactivos de iniciación de la coagulación para TGA, existen informes de reactivos en los que se usa una solución de fosfolípidos de baja concentración (4 μM) como base y se combina con un factor tisular de baja concentración (Documento no de patente 2), combinado con FIXa (Documentos no de patente 3 y 4), combinado con agente activador de FXII (ácido elágico) (Documento no de patente 5), o combinado con una solución mixta del factor tisular de baja concentración y un agente activador de FXII (ácido elágico) (Documento no de patente 5).

Recientemente, se encontraron anticuerpos biespecíficos que se unen tanto al factor de coagulación IX activado (FIXa) como al factor de coagulación X (FX) y sustituyen la función del cofactor del FVIII; es decir, la función de promover la activación del FX por FIXa (Documentos de patente 1 a 3). Se describe el reactivo para determinar APTT que comprende el factor XI de coagulación activado (Documentos de patente 4 a 5).

- 5 Sin embargo, aunque dichos anticuerpos biespecíficos sustituyen funcionalmente al FVIII, el mecanismo de manifestación de sus acciones no es completamente el mismo que el del FVIII. Por ejemplo, el FVIII muestra la actividad del cofactor solo cuando se activa por FXa o trombina; sin embargo, los anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente no necesitan tal proceso de activación para mostrar la actividad del cofactor. Por lo tanto, no fue necesariamente posible aplicar los métodos existentes para controlar la eficacia del FVIII a tales anticuerpos.

[Documentos de la técnica anterior]

[Documentos no de patente]

[Documento no de patente 1] Astermark J. Haemophilia. 2003 9(Supl.1) 32

[Documento no de patente 2] Pathophysiol Haemost Thromb. 2003;33(1): 4

- 15 [Documento no de patente 3] J Thromb Haemost. 2011 Aug; 9 (8): 1549-55.

[Documento no de patente 4] J Thromb Haemost. 2003 May; 1 (5): 1005-11.

[Documento no de patente 5] Int J Hematol. 2009 Dec; 90 (5): 576-82.

[Documentos de patente]

[Documento de patente 1] WO2005/035756

- 20 [Documento de patente 2] WO2006/109592

[Documento de patente 3] WO2012/067176

[Documento de patente 4] WO9844352

[Documento de patente 5] JP2746386

Sumario de la invención

- 25 [Problemas a resolver por la invención]

La presente invención se logró a la vista de las circunstancias anteriores. Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para evaluar la eficacia de una sustancia en una reacción de coagulación sanguínea en la que la sustancia tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII (FVIII); reactivos de iniciación de la coagulación sanguínea para ser usados en tales métodos; y kits que contienen dicho reactivo.

- 30 [Medios para resolver los problemas]

Para resolver los problemas mencionados anteriormente, los presentes inventores estudiaron diversos métodos para evaluar el efecto hemostático y diversos reactivos de iniciación de la coagulación sanguínea para construir un método para evaluar la reacción de coagulación sanguínea mediada por una sustancia que tiene una actividad de sustituir al factor de coagulación VIII (FVIII). Como resultado, los presentes inventores encontraron que, usando un reactivo de iniciación de coagulación sanguínea que contiene el factor de coagulación XI activado (FXIa), el efecto de una sustancia que tiene actividad de sustitución del factor de coagulación VIII (FVIII) en la reacción de coagulación sanguínea puede evaluarse con la sensibilidad apropiada usando la cantidad de trombina generada en una muestra de sangre como indicador. Además, los presentes inventores descubrieron con éxito un método para el ensayo de generación de trombina usando un reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea que contiene el factor de coagulación XI activado (FXIa). La presente invención se basa en estos hallazgos, y se refiere a lo siguiente:

[1] un método para evaluar la reacción de coagulación sanguínea mediada por una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII, en donde el método comprende los pasos de:

- 45 (i) añadir un reactivo de inicio de coagulación sanguínea que comprende el factor de coagulación XI activado a una muestra derivada de sangre aislada de un sujeto, en el que la muestra comprende la sustancia que tiene una actividad de sustituir al factor de coagulación VIII; y

(ii) medir la cantidad de trombina generada en la muestra derivada de sangre obtenida en la etapa (i);

en el que la sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII es un anticuerpo biespecífico que se une al factor de coagulación IX o al factor de coagulación IX activado, y al factor de coagulación X;

[2] el método de [1], en el que el sujeto es un paciente con enfermedad hemorrágica;

5 [3] el método de [2], en el que la enfermedad hemorrágica es una enfermedad causada por la actividad disminuida o deficiente del factor de coagulación VIII o el factor de coagulación VIII activado;

[4] el método de [2] o [3], en el que la enfermedad hemorrágica es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hemofilia, hemofilia adquirida y enfermedad de von Willebrand causada por disfunción o deficiencia del factor de von Willebrand (vWF);

10 [5] el método de uno cualquiera de [1] a [4], en el que el reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea es un reactivo que comprende el factor de coagulación XI activado y un fosfolípido;

[6] el uso de un reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea que comprende el factor de coagulación XI activado para evaluar la reacción de coagulación sanguínea mediada por una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII, que es un anticuerpo biespecífico que se une al factor de coagulación IX o al factor de coagulación IX activado, y al factor de coagulación X, en una muestra derivada de sangre aislada de un sujeto.

[7] El uso de [6], en el que el reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea, que comprende el factor de coagulación XI activado, comprende además un fosfolípido.

[8] El uso de [6] o [7], en donde el sujeto es como se define en cualquiera de [2] a [4]; y

20 [9] Un kit para su uso en el método de cualquiera de [1] a [5], que comprende el reactivo de iniciación de coagulación sanguínea comprendido por [6] o [7] y una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII, que es un anticuerpo biespecífico que se une al factor de coagulación IX o factor de coagulación IX activado, y al factor de coagulación X.

[Efectos de la invención]

25 La presente invención proporciona métodos para evaluar la reacción de coagulación sanguínea mediada por una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII, en la que se usa la cantidad de trombina generada en una muestra derivada de sangre como indicador. Las sustancias que tienen una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII, en particular, anticuerpos biespecíficos que se unen al factor de coagulación IX o al factor de coagulación IX activado y al factor de coagulación X, expresan la actividad del cofactor por un mecanismo que no es completamente igual al del factor de coagulación VIII. Por lo tanto, en el tratamiento de enfermedades hemorrágicas tales como la hemofilia con un anticuerpo biespecífico, no es necesariamente posible aplicar métodos de evaluación de eficacia ampliamente utilizados y, por lo tanto, la evaluación apropiada del efecto del anticuerpo biespecífico puede no ser posible. La presente invención permite una evaluación precisa incluso de los anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente por su efecto en el tratamiento de enfermedades hemorrágicas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la actividad de sustitución de la función de FVIII de hBS23, que es uno de los anticuerpos biespecíficos que se unen al factor de coagulación IX activado y al factor de coagulación X. hBS23 mostró actividad de potenciación de la generación de FXa en presencia de FIXa/FX/fosfolípidos.

40 La Fig. 2 muestra los efectos de hBS23 y del factor de coagulación VIII humano recombinante (rhFVIII) sobre los parámetros del ensayo de generación de trombina (altura máxima (A) y ETP (B)) de plasma deficiente en FVIII o plasma deficiente en FVIII con inhibidor. Cada lote de plasma se obtuvo de un solo donante confirmado que tenía hemofilia A grave (Plasma 1, 2, 3) o hemofilia A grave inhibidora (Plasma con inhibidor 1, 2). Los títulos de inhibidor fueron 292 y 148 unidades Bethesda para el plasma con inhibidor 1 y 2, respectivamente. En el plasma deficiente en FVIII y en el plasma deficiente en FVIII con inhibidor, hBS23 aumentó la altura máxima y ETP de una manera dependiente de la concentración bajo condiciones inducidas por FXIa/fosfolípido reactivo.

Modo de llevar a cabo las invenciones

La presente invención se refiere a métodos para evaluar la reacción de coagulación sanguínea mediante una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII, en la que el método comprende las etapas de:

50 (i) añadir un reactivo de inicio de coagulación sanguínea que comprende el factor de coagulación XI activado a una muestra derivada de sangre aislada de un sujeto, en la que la muestra comprende la sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII; y

(ii) medir la cantidad de trombina generada en la muestra derivada de sangre obtenida en la etapa (i), en donde la sustancia que tiene una actividad de sustituir al factor de coagulación VIII es un anticuerpo biespecífico que se une al factor de coagulación IX o al factor de coagulación IX activado y al factor de coagulación X.

Utilizando los métodos de la presente invención, la actividad del cofactor de una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII puede evaluarse apropiadamente. En particular, en comparación con los métodos basados en el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) o el ensayo de generación de trombina basado en la inducción por un reactivo de iniciación de la coagulación que contiene una baja concentración del factor tisular, que convencionalmente se han utilizado como métodos para controlar la eficacia del factor de coagulación sanguínea, los métodos de la presente invención permiten monitorizar el efecto hemostático con una sensibilidad más apropiada.

En la presente invención, "un método para evaluar la reacción de coagulación sanguínea mediada por una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII" puede reformularse como "un método para evaluar la actividad del cofactor de una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII". También se puede reformular como "un método para evaluar el efecto terapéutico de una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII en enfermedades hemorrágicas". Alternativamente, se puede reformular como "un método para evaluar el efecto profiláctico de una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII en enfermedades hemorrágicas". Además, el "método para evaluar" también se puede expresar como "método para determinar" o "método para medir".

El factor de coagulación VIII es uno de una serie de moléculas involucradas en la coagulación sanguínea. Exhibe actividad de cofactor cuando se activa por la trombina o por el factor de coagulación X activado, y promueve la reacción de activación del factor de coagulación X por el factor de coagulación IX activado. Las sustancias que tienen una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII de la presente invención son similares al factor de coagulación VIII porque promueven la activación del factor de coagulación X por el factor de coagulación IX activado; sin embargo, son diferentes del factor de coagulación VIII porque, por ejemplo, no requieren la activación por trombina o por el factor de coagulación X activado.

Una "sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII" de la presente invención puede reformularse como una "sustancia que tiene actividad similar al factor de coagulación VIII". En la presente invención, la frase "funcionalmente sustituye el factor de coagulación VIII" significa que una sustancia reconoce el factor de coagulación IX (FIX) o factor de coagulación IXa (FIXa) y el factor de coagulación X (FX) y promueve la activación de FX por FIXa (promueve la generación de FXa por FIXa). La actividad promotora de la generación de FXa se puede evaluar utilizando, por ejemplo, un sistema de medición compuesto por FIXa, FX, sustrato sintético S-2222 (sustrato sintético de FXa) y fosfolípidos. Tal sistema de medición muestra una correlación con la gravedad de la enfermedad y los síntomas clínicos en los casos de hemofilia A (Rosen S, Andersson M, Blomback M et al. Clinical applications of a chromogenic substrate method for determination of FVIII activity. *Thromb Haemost* 1985; 54: 811-23).

Las realizaciones preferidas de la sustancia que tiene una actividad de sustitución funcional del factor de coagulación VIII en la presente invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos que se unen al factor de coagulación IX o al factor de coagulación IX activado y al factor de coagulación X. Tales anticuerpos pueden obtenerse de acuerdo con los métodos descritos en, por ejemplo, los documentos WO2005/035756, WO2006/109592 y WO2012/067176. Específicamente, los anticuerpos pueden prepararse usando técnicas de recombinación genética conocidas por los expertos en la técnica en base a las secuencias de un anticuerpo contra el factor de coagulación IX y/o el factor de coagulación IX activado y un anticuerpo contra el factor de coagulación X. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede ser construido en base a las secuencias de un anticuerpo contra el factor de coagulación IX y/o el factor de coagulación IX activado y un anticuerpo contra el factor de coagulación X, y luego ser insertado en un vector de expresión y posteriormente ser expresado en una célula hospedadora apropiada (ver, por ejemplo, Co, MS y col., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976; Better, M. y Horwitz, A. H., *Methods Enzymol.* (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. y Skerra, A., *Methods Enzymol.* (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., *Methods Enzymol.* (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., *Methods Enzymol.* (1986) 121, 663 - 669; y Bird, R. E. y Walker, B. W., *Trends Biotechnol.* (1991) 9, 132-137).

Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención se pueden aislar a partir del interior de las células huésped o desde el exterior de las células (medio, o similares) y purificarse hasta una pureza y homogeneidad sustanciales. La separación y purificación de anticuerpos se puede realizar mediante métodos rutinariamente usados para separar y purificar anticuerpos, y no están limitados a métodos particulares. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden separar y purificar seleccionando y combinando apropiadamente cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, precipitación salina, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, isoelectroenfoque, diálisis, recristalización, y similares. Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención incluyen los anticuerpos descritos en, por ejemplo, los documentos WO2005/035756, WO2006/109592 y WO2012/067176.

Un anticuerpo biespecífico contiene un primer sitio de unión a antígeno y un segundo sitio de unión a antígeno que puede unirse específicamente a al menos dos antígenos diferentes. El primer sitio de unión a antígeno y el segundo

- sitio de unión a antígeno no están particularmente limitados siempre que tengan una actividad de unión al factor de coagulación IX y/o factor de coagulación IX activado y al factor de coagulación X, respectivamente, pero incluyen, por ejemplo, sitios necesarios para la unión al antígeno que están presentes en anticuerpos, moléculas estructurales (moléculas similares a anticuerpos), péptidos y similares, o fragmentos que contienen tales sitios. Las moléculas
- 5 estructurales son moléculas que muestran su función al unirse a las moléculas diana. Se pueden usar cualesquiera polipéptidos siempre que sean polipéptidos conformacionalmente estables que puedan unirse a al menos un antígeno diana. Los ejemplos de tales polipéptidos incluyen regiones variables de anticuerpos, fibronectina (documento WO 2002/032925), dominio de proteína A (documento WO 1995/001937), dominio A del receptor de LDL (documento WO 2004/044011, documento WO 2005/040229), anquirina (documento WO 2002/020565), y tal, y
- 10 también las moléculas descritas en Nygren et al. (Current Opinion in Structural Biology, 7: 463 - 469 (1997); y Journal of Immunol Methods, 290: 3 - 28 (2004)), Binz et al. (Nature Biotech 23: 1257-1266 (2005)), y Hosse et al. (Protein Science 15: 14 - 27 (2006)). Además, como se menciona en Curr Opin Mol Ther. 2010 Ago; 12 (4): 487-95 y Drugs. 2008; 68 (7): 901 - 12, también se pueden usar moléculas peptídicas que pueden unirse a antígenos diana.
- Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse, por ejemplo, usando técnicas de recombinación genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck CAK y Larrick JW, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Los anticuerpos recombinantes pueden obtenerse clonando
- 15 ADN que los codifican a partir de hibridomas o células productoras de anticuerpos tales como linfocitos sensibilizados que producen anticuerpos, insertándolos en vectores adecuados, y luego introduciéndolos en huéspedes (células hospedadoras) para producir los anticuerpos.
- Los anticuerpos biespecíficos pueden incluir no solo anticuerpos completos sino también fragmentos de anticuerpos y anticuerpos de bajo peso molecular (minicuerpos) y anticuerpos modificados.
- Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo o minicuerpos incluyen diacuerpos (Dbs), anticuerpos lineales y moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (de aquí en adelante, también denominadas en este documento scFvs). En este documento, un fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo más pequeño que contiene un sitio de
- 25 reconocimiento de antígeno completo y un sitio de unión.
- Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata, y otros, y sus orígenes no están limitados. También pueden ser anticuerpos genéticamente modificados, tales como los anticuerpos quiméricos o humanizados.
- Los métodos para obtener anticuerpos humanos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los animales transgénicos que llevan todo el repertorio de genes de anticuerpos humanos se pueden inmunizar con los antígenos
- 30 deseados para obtener los anticuerpos humanos deseados (ver la Solicitud de Patente Internacional WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, y WO 96/33735).
- Los anticuerpos genéticamente modificados también se pueden producir usando métodos conocidos. Específicamente, por ejemplo, los anticuerpos quiméricos están compuestos por las regiones variables de la cadena
- 35 H y de la cadena L de un anticuerpo animal inmunizado, y las regiones constantes de la cadena H y la cadena L de un anticuerpo humano. Los anticuerpos quiméricos pueden obtenerse uniendo los ADN que codifican las regiones variables del anticuerpo derivado del animal inmunizado con ADN que codifica las regiones constantes de un anticuerpo humano, insertándolo en un vector de expresión y luego introduciéndolo en las células huésped para producir los anticuerpos.
- Los anticuerpos humanizados son anticuerpos modificados también denominados anticuerpos humanos reconfigurados. Un anticuerpo humanizado se construye transfiriendo las CDR de un anticuerpo derivado de un animal inmunizado a las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo humano. Se conocen técnicas de recombinación genética convencionales para tales fines (véase la publicación de solicitud de patente europea n° EP 239400; publicación internacional n° WO 96/02576; Sato K et al., Cancer Research 1993, 53: 851-
- 40 856; publicación internacional n° WO 99/51743).
- En la presente invención, una muestra derivada de sangre que contiene una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII se aísla de un sujeto. Dicha muestra de sangre se puede obtener de un sujeto al que se le ha administrado una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII. Los sujetos incluyen pacientes con síntomas hemorrágicos en cualquier parte del cuerpo (pacientes con
- 50 enfermedad hemorrágica). Los principales sitios de hemorragia incluyen, por ejemplo, sitios intraarticular, intramuscular, subcutáneo, intraoral, intracraneal, del tracto digestivo e intranasal, pero no están limitados a los mismos. Los pacientes con enfermedad hemorrágica preferiblemente incluyen pacientes con una enfermedad hemorrágica causada por actividad disminuida o deficiente del factor de coagulación VIII y/o factor de coagulación VIII activado. Ejemplos de pacientes con una enfermedad hemorrágica causada por una actividad disminuida o
- 55 deficiente del factor de coagulación VIII y/o el factor de coagulación VIII activado incluyen pacientes con un síntoma hemorrágico que tienen actividad congénita o adquirida, disminuida o deficiente, de uno o ambos factor de coagulación VIII y factor de coagulación VIII activado. La actividad disminuida del factor de coagulación VIII y el factor de coagulación VIII activado se refiere, por ejemplo, a un paciente en el que la actividad de estos factores es preferiblemente menor del 40% (por ejemplo, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, o menos del 10%),

más preferiblemente menos del 10% (por ejemplo, menos del 10%, menos del 9%, menos del 8%, menos del 7% y menos del 6%), incluso más preferiblemente menos de 5% (por ejemplo, menos de 5%, menos de 4%, menos de 3% o menos de 2%), y particularmente preferiblemente menos de 1% que la de un individuo sano, pero no se limita a eso. Los métodos para determinar la actividad del factor de coagulación VIII y el factor de coagulación VIII activado son bien conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, "Minna ni yakudatsu ketsuyuubyou no kiso to rinshou (Fundamentos y clínica de la hemofilia ampliamente útiles)" Shirahata, A., *Iyaku (Medicine and Drugs) Journal*, 2009).

Más específicamente, un ejemplo de tales enfermedades se selecciona de la hemofilia (hemofilia A y hemofilia B), hemofilia adquirida y enfermedad de von Willebrand causada por disfunción o deficiencia del factor de von Willebrand (vWF), pero no se limita a esto. Las muestras derivadas de sangre incluyen suero, plasma o sangre completa. En la presente invención, se usan preferiblemente muestras de plasma. Los métodos para obtener muestras derivadas de sangre de sujetos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En la presente invención, el factor de coagulación XI activado, o un reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea que contiene el factor de coagulación XI activado, se agrega a muestras derivadas de sangre obtenidas de los sujetos mencionados anteriormente.

El factor de coagulación XI activado de la presente invención puede purificarse y prepararse activando el factor de coagulación XI usando el factor de coagulación XII activado, trombina, o similares, y purificándolo por cromatografía, tal como cromatografía de intercambio iónico, fase inversa o filtración en gel, o mediante cromatografía de afinidad con una columna sobre la que se inmoviliza un anticuerpo anti-factor de coagulación XI activado, o combinando adicionalmente una pluralidad de estas columnas.

La secuencia de aminoácidos del factor de coagulación XI humano y la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico que codifica esta secuencia de aminoácidos se conocen como GenBank: NP_000119 (SEQ ID NO: 2) y NM_000128 (SEQ ID NO: 1), respectivamente. Sin embargo, el factor de coagulación XI mencionado en este documento no se limita al factor de coagulación XI humano, y puede ser de otras especies animales (por ejemplo, caballo, bovino, cerdo, conejo, rata o ratón). El factor de coagulación XI puede ser una proteína de origen natural, o puede prepararse como una proteína recombinante usando técnicas conocidas de recombinación genética. Las proteínas recombinantes se pueden preparar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se puede preparar una proteína recombinante, por ejemplo, insertando un ácido nucleico que codifica el factor de coagulación XI en un vector de expresión adecuado, introduciéndolo en una célula huésped adecuada y recogiendo un transformante resultante, obteniendo un extracto y luego purificándolo por cromatografía tal como por cromatografía de intercambio iónico, de fase inversa o de filtración en gel, o mediante cromatografía de afinidad con una columna sobre la que se inmoviliza un anticuerpo del factor X de anticoagulación, o combinando adicionalmente una pluralidad de estas columnas.

Además, cuando el factor de coagulación XI se expresa en una célula hospedadora (por ejemplo, células animales o *Escherichia coli*) como un polipéptido de fusión con proteína glutatión S-transferasa, o como un polipéptido recombinante con varias histidinas adicionales, el polipéptido recombinante expresado puede purificarse usando una columna de glutatión o una columna de níquel.

Cuando se usa *E. coli* como huésped, por ejemplo, el vector mencionado anteriormente no está particularmente limitado siempre que tenga "ori" para la amplificación en *E. coli*, de modo que el vector se amplifica y prepara a gran escala en *E. coli* (tal como JM109, DH5 α , HB101, XL1Blue), y además tiene un gen para la selección de *E. coli* transformada (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos que permite el cribado con un determinado fármaco (ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol). Los ejemplos de tales vectores incluyen vectores M13, vectores pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, y otros. Alternativamente, cuando se pretende subclonar y escindir ADNc, los vectores incluyen, por ejemplo, pGEM-T, pDIRECT, pT7, y similares, además de los vectores descritos anteriormente. Los vectores de expresión son particularmente útiles cuando se usan vectores para producir el factor de coagulación XI. Por ejemplo, cuando se apunta a la expresión en *E. coli* tales como JM109, DH5 α , HB101 y XL1-Blue, los vectores de expresión no solo tienen las características que permiten la amplificación del vector en *E. coli*, sino que también deben tener un promotor que permita la expresión eficiente en *E. coli*, por ejemplo, el promotor lacZ (Ward et al., *Nature* (1989) 341: 544 - 546; FASEB J. (1992) 6: 2422 - 2427), promotor araB (Better et al., *Science* (1988) 240: 1041-1043), promotor T7 o similar. Tales vectores incluyen pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen), pEGFP, pET, y similares, además de los vectores descritos anteriormente.

Los vectores también pueden contener una secuencia señal para la secreción de polipéptidos. Como secuencia señal para la secreción de polipéptidos, se puede usar una secuencia señal pelB (Lei, S.P. et al., *J. Bacteriol.* (1987) 169: 4379) cuando se secreta un polipéptido en el periplasma de *E. coli*. La introducción de un vector en células hospedadoras puede realizarse por métodos de cloruro de calcio o de electroporación, por ejemplo.

Además de vectores para *E. coli*, los vectores incluyen vectores de expresión de mamíferos (por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen), pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18 (17): p5322), pEF y pCDM8), vectores de expresión derivados de células de insectos (por ejemplo, el "sistema de expresión de baculovirus Bac-to-BAC" (Gibco-BRL) y pBacPAK8), vectores de expresión derivados de plantas (por ejemplo, pMH1 y pMH2), vectores de expresión

derivados de virus animales (por ejemplo, pHSV, pMV y pAdexLcw), vectores de expresión retrovirales (por ejemplo, pZIPneo), vectores de expresión de levadura (por ejemplo, "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11 y SP-Q01), y vectores de expresión de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pPL608 y pKTH50), por ejemplo.

5 Cuando se pretende la expresión en células animales tales como células CHO, COS y NIH3T3, los vectores deben tener un promotor esencial para la expresión en células, por ejemplo, el promotor SV40 (Mulligan et al., *Nature* (1979) 277: 108), promotor MMLV-LTR, promotor EF1 α (Mizushima et al., *Nucleic Acids Res.* (1990) 18: 5322), promotor de CMV y similares, y más preferiblemente tienen un gen para seleccionar células transformadas (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos que permite el cribado usando un fármaco (neomicina, G418, o similar)). Los vectores con tales características incluyen pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13, por ejemplo.

10 Los sistemas para producir un polipéptido in vivo incluyen, por ejemplo, sistemas de producción que usan un animal o planta. Un ácido nucleico que codifica el factor de coagulación XI se introduce en un animal o planta, y el factor de coagulación XI se produce en el cuerpo del animal o planta y luego se recoge.

15 Cuando se usa un animal, se pueden usar sistemas de producción que usan un mamífero o un insecto. Los mamíferos que se pueden usar incluyen cabras, cerdos, ovejas, ratones y ganado (Vicki Glaser, *SPECTRUM Biotechnology Applications*, 1993). Cuando se usa un mamífero, se puede usar un animal transgénico.

20 El factor de coagulación XI obtenido como se describió anteriormente se puede aislar a partir del interior de las células huésped o desde el exterior de las células (el medio, o similares), y purificarse como un polipéptido sustancialmente puro y homogéneo. El aislamiento y la purificación de un péptido se puede realizar mediante métodos usados rutinariamente para aislar y purificar polipéptidos, y no está particularmente limitado. Por ejemplo, los polipéptidos pueden aislarse y purificarse seleccionando y combinando de manera apropiada cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, precipitación salina, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, isoelectroenfoque, diálisis, recristalización, y similares.

25 También es posible la modificación opcional o la eliminación parcial de péptidos permitiendo que una enzima de modificación de proteínas apropiada actúe sobre el factor de coagulación XI antes o después de la purificación. Los ejemplos de enzimas de modificación de proteínas que pueden usarse incluyen tripsina, quimotripsina, lisil endopeptidasa, proteína quinasa y glucosidasa.

30 Además, el factor de coagulación XI también incluye proteínas que tienen una o más alteraciones de aminoácidos y son potencialmente capaces de activar el factor de coagulación IX en el factor de coagulación IX activado. Hasta este punto, también se incluyen fragmentos del factor de coagulación XI.

35 Cuando se altera un residuo de aminoácido, el aminoácido preferiblemente se muta para un aminoácido(s) diferente(s) que conserva las propiedades de la cadena lateral de aminoácido. Ejemplos de propiedades de la cadena lateral de aminoácidos son: aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y y V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S y T), aminoácidos que contienen cadenas laterales alifáticas (G, A, V, L, I y P), aminoácidos que contienen cadenas laterales que contienen grupos hidroxilo (S, T e Y) aminoácidos que contienen cadenas laterales que contienen azufre (C y M), aminoácidos que contienen cadenas laterales que contienen ácido carboxílico y amida (D, N, E y Q), aminoácidos que contienen cadenas laterales básicas (R, K y H), y aminoácidos que contienen cadenas laterales aromáticas (H, F, Y y W) (los aminoácidos están representados por códigos de una letra entre paréntesis). Las sustituciones de aminoácidos dentro de cada grupo se llaman sustituciones conservativas. Ya se sabe que un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos modificada en la que uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ó 100 residuos) en una secuencia de aminoácidos determinada se eliminan, se agregan y/o se sustituyen con otros aminoácidos, pueden retener la actividad biológica original (Mark, DF et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; (1984) 81: 5662 - 6; Zoller, M. J. y Smith, M., *Nucleic Acids Res.* (1982) 10: 6487-500; Wang, A. et al., *Science* (1984) 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982) 79: 6409 - 13). Dichos mutantes tienen una identidad de aminoácidos de al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, incluso más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95%, con el factor de coagulación XI o el factor de coagulación XI antes de la alteración del aminoácido. En este documento, la identidad de secuencia se define como el porcentaje de residuos idénticos a los de la secuencia de aminoácidos original de la región variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera, determinada después de que las secuencias están alineadas y se introducen los espacios apropiados para maximizar la identidad de secuencia según sea necesario.

55 La identidad de las secuencias de nucleótidos o las secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo BLAST de Karlin y Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264 - 2268, 1990; y *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873, 1993). Los programas llamados BLASTN y BLASTX se han desarrollado en base al algoritmo BLAST (Altschul SF et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403, 1990). Cuando las secuencias de nucleótidos se analizan utilizando BLASTN, los parámetros son, por ejemplo, puntaje = 100 y longitud de palabra = 12. Cuando las secuencias de aminoácidos se analizan usando BLASTX, los parámetros son, por ejemplo, puntaje = 50 y longitud de palabra = 3.

Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros predeterminados para cada programa. Las técnicas específicas para estos métodos de análisis son conocidas en la técnica.

Los métodos para preparar un ADN que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos modificada que son conocidos por los expertos en la técnica incluyen mutagénesis dirigida al sitio (Kramer, W. y Fritz, H.-J. (1987) 5 Oligonucleotide-directed construction of mutagenesis via gapped duplex DNA. *Methods in Enzymology*, 154: 350-367), técnicas de hibridación (Southern, EM (1975) *Journal of Molecular Biology*, 98, 503), y técnicas de PCR (Saiki, RK et al. (1985) *Science*, 230, 1350 - 1354; Saiki, R. K. et al. (1988) *Science*, 239, 487 - 491).

En la presente invención, se prefiere añadir fosfolípidos al factor de coagulación XI activado. Los fosfolípidos no están particularmente limitados en la presente invención. Los ejemplos de fosfolípidos incluyen fosfatidilserina, 10 fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y esfingomielina, y una combinación de dos o más de ellos, pero no están limitados a los mismos. En la presente invención, se prefiere la combinación de fosfatidilserina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

En la presente invención, el factor de coagulación XI activado se puede usar en forma de un reactivo y se puede añadir a muestras derivadas de sangre aisladas de sujetos. En la presente invención, dicho reactivo se denomina 15 "reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea". El "reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea" de la presente invención puede contener fosfolípidos y sales de calcio, magnesio y similares, además del factor de coagulación XI activado.

Se pueden añadir el factor de coagulación XI activado y/o fosfolípidos a una muestra derivada de sangre en una cantidad suficiente para medir la cantidad de generación de trombina que se describirá más adelante. El factor de 20 coagulación XI activado se puede agregar, por ejemplo, en una cantidad de 0,00001 pmol a 1000 nmol por ml de muestra de plasma, sin limitarse a ello. Además, se pueden añadir fosfolípidos, por ejemplo, a una cantidad entre 0,001 nmol y 10000 nmol por ml de muestra de plasma, sin limitarse a ello.

En la presente invención, se mide la cantidad de trombina generada en una muestra derivada de sangre obtenida a través de tales etapas. Los presentes inventores elucidaron que la actividad del cofactor de un anticuerpo 25 biespecífico que se une al factor de coagulación IX o al factor de coagulación IX activado y al factor de coagulación X puede evaluarse usando la cantidad de trombina generada en una muestra derivada de sangre como indicador. Es decir, la presente invención proporciona un método para evaluar la reacción de coagulación sanguínea mediada por una sustancia que tiene la actividad de sustituir al factor de coagulación VIII (preferiblemente un anticuerpo biespecífico que se une al factor de coagulación IX o al factor de coagulación IX activado y al factor de coagulación 30 X) usando la cantidad de trombina generada en una muestra derivada de sangre como indicador. La cantidad de trombina generada en una muestra derivada de sangre puede medirse por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede medir añadiendo un reactivo para convertir la cantidad de trombina en una muestra y calcular la cantidad máxima de trombina (altura del pico) y la cantidad total de trombina (ETP) mediante un aparato disponible comercialmente, sin limitación.

En la presente invención, la actividad del cofactor de un anticuerpo biespecífico que se une al factor de coagulación IX o al factor de coagulación IX activado y al factor de coagulación X puede evaluarse con la sensibilidad apropiada usando la cantidad de trombina generada en una muestra derivada de sangre como indicador. La actividad del 35 cofactor necesaria para la acción hemostática se puede evaluar basándose, por ejemplo, en la correlación entre el efecto clínico de una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII y la cantidad de generación de trombina en un método de la presente invención, o en la comparación entre la cantidad de trombina generada en una muestra derivada de sangre que contiene una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor VIII y la cantidad de trombina generada en una muestra derivada de sangre que contiene actividad del factor de coagulación VIII, en un método de la presente invención. Por ejemplo, en la presente invención, si las 40 concentraciones del factor de coagulación XI activado y los fosfolípidos en el reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea se ajustan de manera que pueda verse el nivel detectable más bajo de reacción de generación de trombina en una muestra derivada de sangre que tiene una actividad del factor de coagulación VIII (FVIII:C) de 1% o en una muestra derivada de sangre suplementada con el factor de coagulación VIII para alcanzar un FVIII:C de 1%, una sustancia que tiene actividad de sustitución del factor de coagulación VIII administrada a un sujeto puede 45 evaluarse como teniendo actividad de inducir la reacción de coagulación sanguínea, es decir, que tiene un efecto hemostático, por la presencia de una reacción de generación de trombina. Alternativamente en la presente invención, por ejemplo, cuando la cantidad de trombina generada en una muestra derivada de sangre aislada de un sujeto (paciente con hemofilia A grave) que ha recibido una sustancia que tiene actividad de sustitución del factor de coagulación VIII es aproximadamente la misma o más que la cantidad de trombina generada en una muestra preparada añadiendo 0,01 U/ml del factor de coagulación VIII a una muestra derivada de sangre del mismo sujeto 50 que no contiene la sustancia que tiene actividad de sustitución del factor de coagulación VIII o está en tal estado que la acción de la sustancia no se muestra (muestra comparativa), la sustancia que tiene actividad de sustitución del factor de coagulación VIII administrada al sujeto puede evaluarse como que tiene una actividad de inducir reacción de coagulación sanguínea, es decir, que tiene un efecto hemostático. La expresión "la cantidad de trombina generada es aproximadamente la misma" puede significar que la cantidad de trombina generada en una muestra derivada de sangre de un sujeto que ha recibido una sustancia que tiene actividad de sustitución del factor de coagulación VIII es, por ejemplo, más o menos 100% o menos, preferiblemente 50% o menos, particularmente 60

preferiblemente 20% o menos de la cantidad de trombina generada en una muestra comparativa, pero no se limita a la misma. La cantidad de trombina generada puede determinarse usando, por ejemplo, la cantidad máxima de trombina (altura del pico) y la cantidad total de trombina (ETP) como indicadores.

Además, la presente invención proporciona reactivos de iniciación de la coagulación sanguínea que se usarán para la evaluación de la reacción de coagulación sanguínea de la presente invención. Los reactivos de iniciación de la coagulación sanguínea de la presente invención contienen el factor de coagulación XI activado. Los reactivos de iniciación de la coagulación sanguínea de la presente invención pueden contener además fosfolípidos. Los ejemplos de los fosfolípidos se describen anteriormente. Los reactivos de iniciación de la coagulación sanguínea de la presente invención pueden incluir adicionalmente sales de calcio, magnesio y similares.

El "reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea a usar para evaluar la reacción de coagulación sanguínea de la presente invención" puede reformularse como el "uso del factor de coagulación XI activado o factor de coagulación XI activado y fosfolípidos, en la producción de un reactivo de inicio de la coagulación sanguínea para ser utilizado para evaluar la reacción de coagulación sanguínea". Además, se puede reformular como "factor de coagulación XI activado, o factor de coagulación XI activado y fosfolípidos para uso en la evaluación de la reacción de coagulación sanguínea". Además, el reactivo de iniciación de coagulación sanguínea de la presente invención puede expresarse como "un método para producir un reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea para evaluar la reacción de coagulación sanguínea, que comprende la etapa de formular el factor de coagulación XI activado o el factor de coagulación XI activado y fosfolípidos, con un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable". En este documento, el factor de coagulación XI activado incluye el factor de coagulación XI siempre que se añada externamente a una muestra derivada de sangre. El factor de coagulación XI activado de la presente invención puede ser cualquiera de los disponibles comercialmente, purificados a partir de plasma o producidos mediante técnicas de recombinación genética. Los métodos para obtenerlos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Diversos reactivos tales como los reactivos de iniciación de la coagulación sanguínea necesarios para un método para evaluar la reacción de coagulación sanguínea de la presente invención pueden envasarse con anticipación y proporcionarse como un kit. Un kit de la presente invención puede incluir, además de un reactivo de iniciación de coagulación sanguínea, un control positivo de muestra de plasma aislado de un ser humano cuya actividad del factor de coagulación VIII y actividad del factor de coagulación IX en la sangre son normales, una sustancia que tiene una actividad de sustituir al factor de coagulación VIII, y materiales que pueden usarse en un ensayo de generación de trombina (por ejemplo, un sustrato fluorógeno para trombina, un reactivo para convertir la cantidad de trombina en una muestra, y similares). Además, los diversos reactivos incluidos en el kit pueden estar en forma de polvo o líquido de acuerdo con el modo de su uso. Además, pueden almacenarse en contenedores apropiados y usarse cuando sea adecuado.

Todas las referencias de la técnica anterior citadas en este documento se incorporan por referencia en esta descripción.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los Ejemplos, pero no debe interpretarse como limitada a los mismos.

Preparación de anticuerpos biespecíficos anti-FIXa/FX que tienen actividad de sustitución de la función de FVIII y medición de la actividad de sustitución de la función de FVIII

Los anticuerpos biespecíficos anti-FIXa/FX que tienen actividad de sustitución de la función de FVIII se obtuvieron por los métodos descritos en los documentos WO2005/035756, WO2006/109592 y WO2012/067176. Los genes de anticuerpos descritos en los documentos WO2005/035756, WO2006/109592 y WO2012/067176 se incorporaron en un vector de expresión de células animales, y se transfectaron en células HEK293 para expresar transitoriamente los anticuerpos biespecíficos. Luego, los anticuerpos biespecíficos contenidos en el sobrenadante del cultivo celular se purificaron usando Proteína A y filtración en gel.

La medición de la actividad de sustitución de la función de FVIII de los anticuerpos biespecíficos así purificados se llevó a cabo mediante el siguiente ensayo enzimático. A temperatura ambiente, se mezclaron FIXa humano 1 nM (Enzyme Research Laboratories), FX humano 140 nM (Enzyme Research Laboratories), fosfolípidos 20 μ M (fosfatidilserina al 10%, fosfatidilcolina al 60% y fosfatidiletanolamina al 30%) y un anticuerpo biespecífico en una solución salina fisiológica tamponada con Tris acuosa que contiene 5 mM de CaCl_2 y 0,1% de albúmina de suero bovino, y se incubó durante dos minutos para permitir que prosiguiera la reacción de activación de FX por FIXa. Esta reacción se terminó mediante la adición de EDTA. A continuación, se añadió la solución de sustrato cromogénico específica de FXa S-2222 (CHROMOGENIX) y se midieron los cambios de absorbancia a 405 nm usando SpectraMax 340PC³⁸⁴ (Molecular Devices). Se produjo una curva de calibración a partir de los cambios de la absorbancia usando concentraciones conocidas de FXa humano (Enzyme Research Laboratories), y se evaluaron los anticuerpos biespecíficos para la actividad de promoción de la generación de FXa.

Medición de APTT

La medición se realizó mediante el uso de Trombocheck APTT-SLA (Sysmex) como un reactivo de APTT y siguiendo un protocolo de medición APTT estándar. A 50 µl de plasma humano deficiente en el factor VIII (FVIII) (producto comercial de George King Bio-Medical) o plasma deficiente en FVIII con inhibidor (producto comercial de George King Bio-Medical) que contiene un anticuerpo biespecífico o FVIII humano recombinante (rhFVIII, Bayer), se añadieron 50 µL del reactivo APTT. Después de la incubación durante tres minutos, se añadieron 50 µL de solución de cloruro de calcio 0,02 mol/L para iniciar la reacción de coagulación, y se midió el APTT usando un analizador de coagulación sanguínea automático (KC4 Delta, Trinity Biotech).

Ensayo de generación de trombina

Se obtuvo un trombograma mediante trombografía automatizada calibrada utilizando un fluorómetro de placa de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Instruments) equipado con un conjunto de filtros de longitud de onda de excitación 390 nm/longitud de onda de fluorescencia de 460 nm, dispensador y un software de análisis (software de trombinoscopia, versión 3.0.0.29, Thrombinoscope BV). A cada pocillo se añadieron 80 µl del plasma humano deficiente en el factor VIII (FVIII) o plasma deficiente en FVIII con inhibidor (George King Bio-Medical) que contenía un anticuerpo biespecífico o FVIII humano recombinante (rhFVIII, Bayer). A continuación, se añadieron 20 µl de un reactivo de iniciación de coagulación (reactivo FXIa/fosfolípido) que contenía factor humano XIa 0,47 nM (Enzyme Research Laboratories) y fosfolípidos 20 µM, o PPP-reactivo LOW (Thrombinoscope BV). Para la conversión a la cantidad de trombina, se añadieron 20 µL de Calibrador de Trombina (Trombinoscopia BV) en lugar del reactivo de iniciación de la coagulación. Para iniciar la reacción, se dispensaron automáticamente 20 µL de reactivo FluCa preparado a partir del kit FluCa (Thrombinoscope BV) desde un aparato programado. El trombograma, la altura máxima (cantidad máxima de trombina) y ETP (cantidad total de trombina) se calcularon usando el software del aparato.

Modelo de hemofilia A

Los hibridomas se produjeron a partir de ratones inmunizados con FVIII humano, y luego se identificó un anticuerpo neutralizante anti-FVIII que reaccionaba de forma cruzada con el mono cynomolgus pero no con el cerdo. La reactividad cruzada con el mono cynomolgus y el cerdo se confirmó mediante la adición del anticuerpo al plasma citrado de cada animal, y determinando si la coagulación es inhibida por el APTT o el ensayo de generación de trombina. Este anticuerpo anti-FVIII se administró a monos cynomolgus a una dosis que puede extender el APTT en dos veces, para producir una condición de hemofilia A adquirida. A continuación, como fármaco de prueba, se administraron por vía intravenosa 0,3 mg/kg de hBS23 (n = 3), que es uno de los anticuerpos biespecíficos, o 1 U/kg de FVIII de cerdo (n = 3) por vía intravenosa a los animales. El FVIII de cerdo se preparó y se purificó por métodos convencionales usando técnicas de recombinación genética. Un grupo sin administración del fármaco (n = 6) también se estableció como control. El sangrado fue inducido artificialmente en animales bajo anestesia (los músculos del antebrazo, la parte superior del brazo y el muslo son pinchados con una aguja 18G), y luego los animales fueron observados hasta tres días después. En el grupo al que se administró 1 U/kg de FVIII de cerdo, se administró adicionalmente 1 U/kg de FVIII de cerdo por vía intravenosa al animal dos veces al día (seis veces en total, sin administración en el último día de observación). Este es un régimen diseñado para mantener la actividad de FVIII en plasma a 0,01 U/mL o más. Como indicadores de sangrado, se emplearon los valores de hemoglobina (que reflejan la anemia debida a la pérdida de sangre) y el área de color púrpura de la piel (marcas de sangrado).

Resultados

<Actividad de sustitución de la función de FVIII del anticuerpo biespecífico>

Uno de los anticuerpos biespecíficos, hBS23, mostró actividad promotora de la generación de FXa en presencia de FIXa/FX/fosfolípidos, demostrando que tiene actividad de sustitución de la función de FVIII (Fig. 1).

<Actividad de la hemostasia in vivo de anticuerpos biespecíficos>

En los animales control, se observó una disminución progresiva en el valor de la hemoglobina y una ampliación del área de color púrpura de la piel hasta tres días después. Estos se suprimieron mediante una única administración intravenosa de hBS23 o mediante administración intravenosa repetida (dos veces al día) de 1 U/kg de FVIII de cerdo. El grado de supresión fue aproximadamente el mismo en ambos casos.

La concentración plasmática de hBS23 durante el período experimental fue de aproximadamente 30 nM (de 40 a 18 nM en promedio en un grupo), lo que sugiere que hBS23, alrededor de esta concentración, tiene una actividad de hemostasia que es aproximadamente igual a la del régimen para mantener la actividad de FVIII en plasma a 0,01 U/ml (1% de actividad de FVIII) o más (administración intravenosa repetida (dos veces al día) de 1 U/kg de FVIII de cerdo).

<Actividad de anticuerpos biespecíficos en el ensayo de plasma>

Uno de los anticuerpos biespecíficos, hBS23, aumentó la altura máxima (cantidad máxima de trombina) y ETP (cantidad total de trombina), que son parámetros para la generación de trombina, de una manera dependiente de la concentración en condiciones inducidas por FXIa/fosfolípido en plasma deficiente de FVIII (Fig. 2). Según el análisis

de la altura del pico, 30 nM de hBS23 tiene una actividad correspondiente a 0,01 U/ml de rhFVIII (1% de actividad de FVIII), y 300 nM de hBS23 tiene una actividad cercana a 0,1 U/ml de rhFVIII (10% de actividad de FVIII). Como se describió anteriormente, en el ensayo in vivo, se obtuvo una actividad de hemostasia equivalente a la del régimen para mantener la actividad de FVIII en plasma a 0,01 U/ml (1% de actividad de FVIII) o más manteniendo la concentración de hBS23 a aproximadamente 30 nM. Por lo tanto, se sugirió que el ensayo de generación de trombina sería un método de monitorización que refleja la acción hemostática de hBS23 con la sensibilidad adecuada.

Por otro lado, cuando el ensayo de generación de trombina se realizó bajo condiciones inducidas con PPP-reactivo LOW (reactivo de iniciación de la coagulación que contiene una baja concentración de factor tisular), la sensibilidad de medición de la actividad de hBS23 y hFVIII fue baja en comparación con la de las condiciones inducidas por FXIa/reactivo fosfolípido, y, por lo tanto, la reflexión apropiada de la acción hemostática in vivo se consideró difícil. Además, cuando se utilizó el valor de APTT para evaluar la actividad específica de FVIII de hBS23, la actividad específica de hBS23 a 30 nM o más se calculó como 1 U/ml (100% de actividad de FVIII) o más de FVIII. Este resultado sugiere que la actividad de FVIII de hBS23 calculada a partir del valor de APTT puede ser mayor que la acción hemostática en el ensayo in vivo.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona un método para evaluar el efecto de un anticuerpo biespecífico que tiene una actividad de sustitución funcional de FVIII en la reacción de coagulación sanguínea. Usando los métodos de la presente invención, es posible determinar con la sensibilidad apropiada el efecto de dicho anticuerpo biespecífico en el tratamiento de una enfermedad hemorrágica tal como la hemofilia.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION NARA MEDICAL UNIVERSITY

5

<120> MÉTODOS PARA EVALUAR LAS REACCIONES DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA

<130> C1-A1213P

10

<150> JP 2012-217925

<151> 2012-09-28

<160> 2

15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 625

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ile Phe Leu Tyr Gln Val Val His Phe Ile Leu Phe Thr Ser Val
1 5 10 15

Ser Gly Glu Cys Val Thr Gln Leu Leu Lys Asp Thr Cys Phe Glu Gly
20 25 30

Gly Asp Ile Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser Ala Lys Tyr Cys Gln Val
35 40 45

Val Cys Thr Tyr His Pro Arg Cys Leu Leu Phe Thr Phe Thr Ala Glu
50 55 60

Ser Pro Ser Glu Asp Pro Thr Arg Trp Phe Thr Cys Val Leu Lys Asp
65 70 75 80

Ser Val Thr Glu Thr Leu Pro Arg Val Asn Arg Thr Ala Ala Ile Ser
85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Lys Gln Cys Ser His Gln Ile Ser Ala Cys Asn Lys
100 105 110

Asp Ile Tyr Val Asp Leu Asp Met Lys Gly Ile Asn Tyr Asn Ser Ser
115 120 125

Val Ala Lys Ser Ala Gln Glu Cys Gln Glu Arg Cys Thr Asp Asp Val
130 135 140

His Cys His Phe Phe Thr Tyr Ala Thr Arg Gln Phe Pro Ser Leu Glu
145 150 155 160

25

ES 2 668 455 T3

His Arg Asn Ile Cys Leu Leu Lys His Thr Gln Thr Gly Thr Pro Thr
 165 170 175
 Arg Ile Thr Lys Leu Asp Lys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Lys Ser
 180 185 190
 Cys Ala Leu Ser Asn Leu Ala Cys Ile Arg Asp Ile Phe Pro Asn Thr
 195 200 205
 Val Phe Ala Asp Ser Asn Ile Asp Ser Val Met Ala Pro Asp Ala Phe
 210 215 220
 Val Cys Gly Arg Ile Cys Thr His His Pro Gly Cys Leu Phe Phe Thr
 225 230 235 240
 Phe Phe Ser Gln Glu Trp Pro Lys Glu Ser Gln Arg Asn Leu Cys Leu
 245 250 255
 Leu Lys Thr Ser Glu Ser Gly Leu Pro Ser Thr Arg Ile Lys Lys Ser
 260 265 270
 Lys Ala Leu Ser Gly Phe Ser Leu Gln Ser Cys Arg His Ser Ile Pro
 275 280 285
 Val Phe Cys His Ser Ser Phe Tyr His Asp Thr Asp Phe Leu Gly Glu
 290 295 300
 Glu Leu Asp Ile Val Ala Ala Lys Ser His Glu Ala Cys Gln Lys Leu
 305 310 315 320
 Cys Thr Asn Ala Val Arg Cys Gln Phe Phe Thr Tyr Thr Pro Ala Gln
 325 330 335
 Ala Ser Cys Asn Glu Gly Lys Gly Lys Cys Tyr Leu Lys Leu Ser Ser
 340 345 350
 Asn Gly Ser Pro Thr Lys Ile Leu His Gly Arg Gly Gly Ile Ser Gly
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Arg Leu Cys Lys Met Asp Asn Glu Cys Thr Thr Lys Ile
 370 375 380
 Lys Pro Arg Ile Val Gly Gly Thr Ala Ser Val Arg Gly Glu Trp Pro
 385 390 395 400
 Trp Gln Val Thr Leu His Thr Thr Ser Pro Thr Gln Arg His Leu Cys
 405 410 415

ES 2 668 455 T3

Gly Gly Ser Ile Ile Gly Asn Gln Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys
420 425 430

Phe Tyr Gly Val Glu Ser Pro Lys Ile Leu Arg Val Tyr Ser Gly Ile
435 440 445

Leu Asn Gln Ser Glu Ile Lys Glu Asp Thr Ser Phe Phe Gly Val Gln
450 455 460

Glu Ile Ile Ile His Asp Gln Tyr Lys Met Ala Glu Ser Gly Tyr Asp
465 470 475 480

Ile Ala Leu Leu Lys Leu Glu Thr Thr Val Asn Tyr Thr Asp Ser Gln
485 490 495

Arg Pro Ile Cys Leu Pro Ser Lys Gly Asp Arg Asn Val Ile Tyr Thr
500 505 510

Asp Cys Trp Val Thr Gly Trp Gly Tyr Arg Lys Leu Arg Asp Lys Ile
515 520 525

Gln Asn Thr Leu Gln Lys Ala Lys Ile Pro Leu Val Thr Asn Glu Glu
530 535 540

Cys Gln Lys Arg Tyr Arg Gly His Lys Ile Thr His Lys Met Ile Cys
545 550 555 560

Ala Gly Tyr Arg Glu Gly Gly Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly
565 570 575

Gly Pro Leu Ser Cys Lys His Asn Glu Val Trp His Leu Val Gly Ile
580 585 590

Thr Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Arg Glu Arg Pro Gly Val Tyr
595 600 605

Thr Asn Val Val Glu Tyr Val Asp Trp Ile Leu Glu Lys Thr Gln Ala
610 615 620

Val
625

<210> 2

<211> 3278

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 668 455 T3

aggcacacag gcaaaaatcaa gttctacatc tgtccctgtg tatgtcactt gtttgaatac	60
gaaataaaat taaaaaata aattcagtgt attgagaaag caagcaattc tctcaaggta	120
tattttctgac atactaagat tttacgact ttcacaaata tgctgtactg agagagaatg	180
ttacataaca ttgagaacta gtacaagtaa atattaaagt gaagtgacca tttcctacac	240
aagctcattc agaggaggat gaagaccatt ttggaggaag aaaagcacco ttattaagaa	300
ttgcagcaag taagccaaca aggtcttttc aggatgattt tcttatatca agtggtagat	360
ttcattttat ttacttcagt ttctgtgtaa tgtgtgactc agttgttgaa ggacacctgc	420
tttgaaggag gggacattac tacggtcttc acaccaagcg ccaagtactg ccaggtagtc	480
tgcacttacc acccaagatg tttactcttc actttcacgg cggaatcacc atctgaggat	540
cccacccgat ggtttacttg tgtcctgaaa gacagtgtta cagaaacact gccaaagatg	600
aataggacag cagcgatttc tgggtattct ttcaagcaat gctcacacca aataagcgct	660
tgcaacaaag acatttatgt ggacctagac atgaagggca taaactataa cagctcagtt	720
gccaaagatg ctcaagaatg ccaagaaaga tgcacggatg acgtccactg ccactttttc	780
acgtacgccca caaggcagtt tcccagcctg gagcatcgta acatttgtct actgaagcac	840
acccaaacag ggacaccaac cagaataacg aagctcgata aagtgggtgc tggattttca	900
ctgaaatcct gtgcactttc taatctggct tgtattaggg acattttccc taatacggtg	960
tttgacagaca gcaacatcga cagtgtcatg gctcccgatg cttttgtctg tggccgaatc	1020
tgcactcatc atcccggttg ottgtttttt acottctttt ccaggaatg gcccaaagaa	1080
tctcaaagaa atctttgtct ccttaaaaca tctgagagtg gattgccag tacaogcatt	1140
aaaaagagca aagctctttc tggtttcagt ctacaaagct gcaggcacag catcccagtg	1200
ttctgccatt cttcatttta ccatgacact gatttcttgg gagaagaact ggatattgtt	1260
gctgcaaaaa gtcacgaggc ctgccagaaa ctgtgcacca atgccgtccg ctgccagttt	1320
tttacctata cccagccca agcatcctgc aacgaaggga agggcaagtg ttacttaag	1380
ctttcttcaa acggatctcc aactaaaata cttcacggga gaggaggcat ctctggatac	1440
acattaaggt tgtgtaaaat ggataatgag tgtaccacca aaatcaagcc caggatcggt	1500
ggaggaactg cgtctgttcg tgggtgagtgg ccgtggcagg tgaccctgca cacaacctca	1560
cccactcaga gacacctgtg tggaggtccc atcattggaa accagtggat attaacagcc	1620
gctcactgtt tctatggggt agagtcacct aagattttgc gtgtctacag tggcatttta	1680
aatcaatctg aaataaaaga ggacacatct ttctttgggg ttcaagaaat aataatccat	1740
gatcagtata aaatggcaga aagcgggtat gatattgcct tgttgaaact ggaaaccaca	1800
gtgaattaca cagattctca acgacctata tgccctgctt ccaaaggaga tagaaatgta	1860
atatacactg attgctgggt gactggatgg gggtagagaa aactaagaga caaaatacaa	1920

ES 2 668 455 T3

aatactctcc agaaagccaa gataccctta gtgaccaacg aagagtgccga gaagagatac	1980
agaggacata aaataaccca taagatgatac tgtgccggct acaggaagg aggaaggac	2040
gcttgcaagg gagattcggg aggcctctctg tcctgcaaac acaatgaggt ctggcatctg	2100
gtaggcatca cgagctgggg cgaaggctgt gctcaaaggg agcgccagg tgtttacacc	2160
aacgtggtcg agtacgtgga ctggattctg gagaaaactc aagcagtgtg aatgggttcc	2220
caggggccat tggagtcctt gaaggaccca ggatttgctg ggagagggtg ttgagttcac	2280
tgtgccagca tgcttcctcc acagtaacac gctgaagggg cttggtgttt gtaagaaat	2340
gctagaagaa aacaaactgt cacaagttgt tatgtccaaa actcccgttc tatgatcgtt	2400
gtagtttgtt tgagcattca gtctctttgt ttttgatcac gcttctatgg agtccaagaa	2460
ttaccataag gcaatatttc tgaagattac tatataggca gatatagcag aaaataacca	2520
agtagtgga gtggggatca ggcagaagaa ctggtaaaag aagccaccat aaatagattt	2580
gttcgatgaa agatgaaaac tggaagaaag gagaacaaag acagtcttca ccattttgca	2640
ggaatctaca ctctgcctat gtgaacacat ttcttttgta aagaaagaaa ttgattgcat	2700
ttaatggcag attttcagaa tagtcaggaa ttcttgatcat ttccatttta aaatatatat	2760
taaaaaaaaat cagttcgagt agacacgagc taagagtga tgtgaagata acagaatttc	2820
tgtgtggaag aggattacaa gcagcaattt acctggaagt gataccttag gggcaatctt	2880
gaagatacac ttctctgaaa aatgatttgt gatggattgt atatttattt aaaatatctt	2940
gggaggggag gctgatggag ataggagca tgctcaaacc tccctaagac aagctgctgc	3000
tgtgactatg ggctcccaa gagctagatc gtatatattt ttgacaaaa tcaccataga	3060
ctgcatccat actacagaga aaaaacaatt agggcgcaaa tggatagtta cagtaaagtc	3120
ttcagcaagc agctgcctgt attctaagca ctgggatttt ctgtttcgtg caaatattta	3180
tctcattatt gttgtgatct agttcaataa cctagaattt gaattgtcac cacatagctt	3240
tcaatctgtg ccaacaacta tacaattcat caagtgtg	3278

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar la reacción de coagulación sanguínea mediado por una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII, en donde el método comprende las etapas de:
 - 5 (i) añadir un reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea que comprende el factor de coagulación XI activado a una muestra derivada de sangre aislada de un sujeto, en el que la muestra comprende la sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII; y
 - (ii) medir la cantidad de trombina generada en la muestra derivada de sangre obtenida en la etapa (i),
10 en donde la sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII es un anticuerpo biespecífico que se une al factor de coagulación IX o al factor de coagulación IX activado y al factor de coagulación X.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el sujeto es un paciente con enfermedad hemorrágica.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la enfermedad hemorrágica es una enfermedad causada por la actividad disminuida o deficiente del factor de coagulación VIII o el factor de coagulación VIII activado.
- 15 4. El método de la reivindicación 2 ó 3, en el que la enfermedad hemorrágica es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hemofilia, hemofilia adquirida y enfermedad de von Willebrand causada por disfunción o deficiencia del factor de von Willebrand (vWF).
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea es un reactivo que comprende el factor de coagulación XI activado y un fosfolípido.
- 20 6. El uso de un reactivo de iniciación a la coagulación sanguínea, que comprende el factor de coagulación XI activado, para evaluar la reacción de coagulación sanguínea mediada por una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII, que es un anticuerpo biespecífico que se une al factor de coagulación IX o al factor de coagulación IX activado, y al factor de coagulación X, en una muestra derivada de sangre aislada de un sujeto.
- 25 7. El uso de la reivindicación 6, en el que el reactivo de iniciación a la coagulación sanguínea, que comprende el factor de coagulación XI activado, comprende además un fosfolípido.
8. El uso de la reivindicación 6 ó 7, en el que el sujeto es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
- 30 9. Un kit para usar en el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende el reactivo de iniciación de la coagulación sanguínea como se define en la reivindicación 6 ó 7 y una sustancia que tiene una actividad de sustitución del factor de coagulación VIII, que es un anticuerpo biespecífico que se une al factor de coagulación IX o al factor de coagulación IX activado, y al factor de coagulación X.

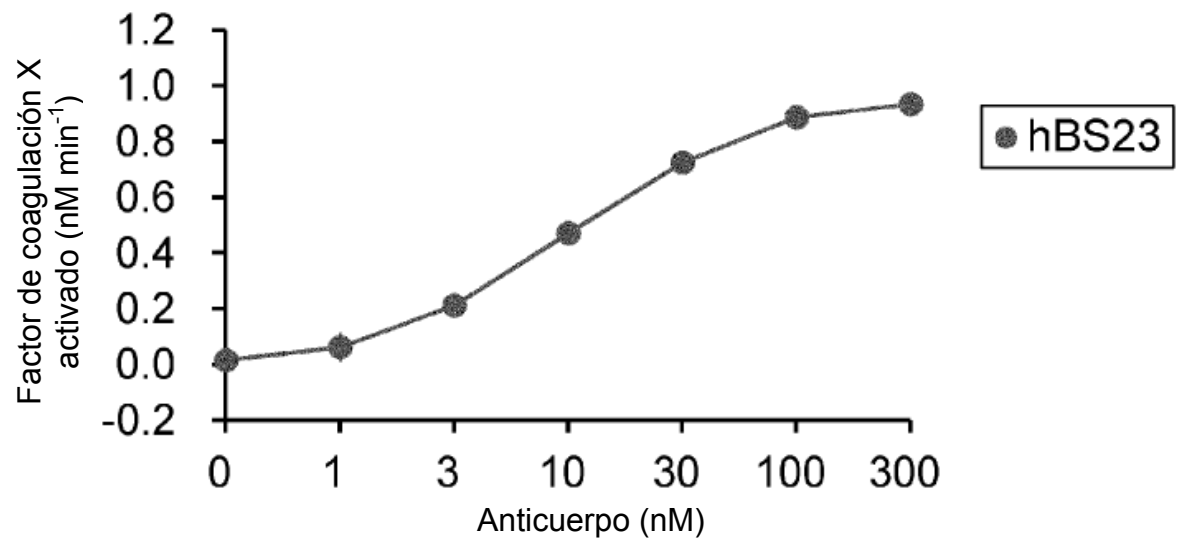
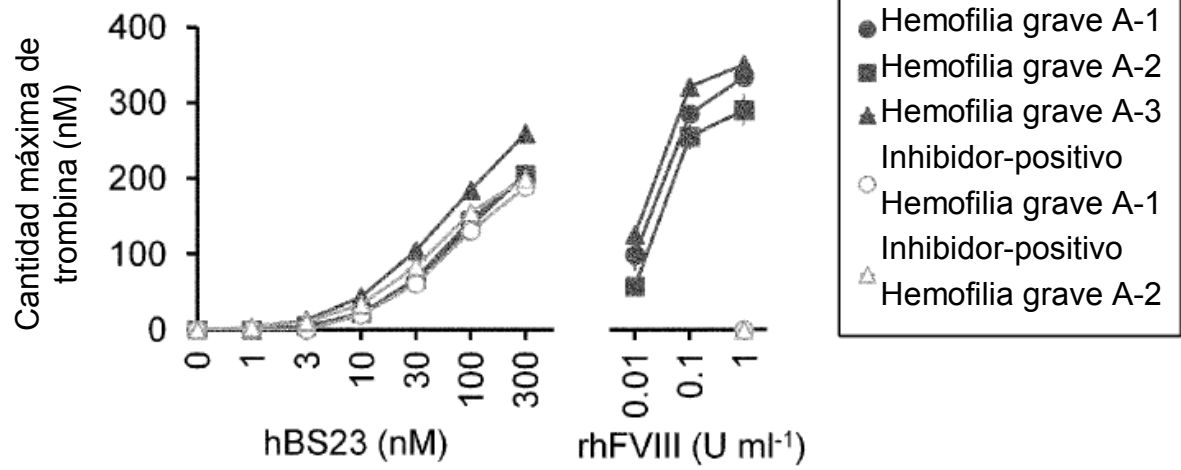


FIG. 1

(A)



(B)

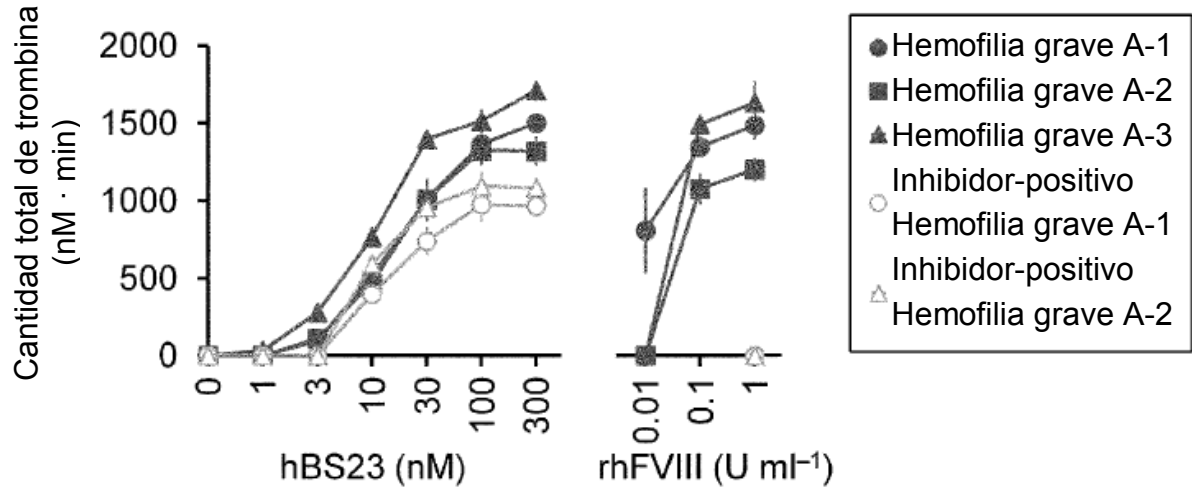


FIG. 2