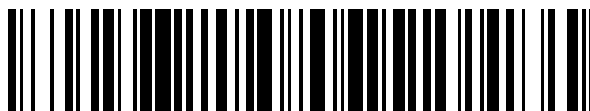


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 850**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2011 PCT/IN2011/000863**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12085933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2011 E 11851346 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2654770**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de tenecteplasa**

30 Prioridad:

23.12.2010 IN 3516MU2010

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

29.10.2018

73 Titular/es:

**GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD.
(100.0%)
P-1 IT-BT Park MIDC Phase-2
Hinjawadi, Pune - 411057, IN**

72 Inventor/es:

**SINGH, SANJAY;
MISHRA, MAHESHWARI KUMAR y
BHANDARI, PRITIRANJAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 687 850 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

Composiciones farmacéuticas de tenecteplasa

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a las composiciones farmacéuticas de un derivado del activador del plasminógeno tisular humano conocido como tenecteplasa (TNK) para el tratamiento del bloqueo de las arterias cerebrales que causan ictus de tipos mayores o menores tales como ictus isquémico agudo (IIA). La invención también se refiere a las formulaciones que tienen eficacia y seguridad óptimas en comparación con los agentes de terapia conocidos identificados en ensayos clínicos de dichas composiciones con cantidades específicas de TNK como principio activo.

Antecedentes de la invención

10 El activador del plasminógeno tisular (APT) está involucrado en la descomposición de coágulos de sangre no específicos en el sistema de circulación sanguínea. TNK es un derivado de APT en el que se modifican siete aminoácidos de la secuencia nativa de modo que la nueva molécula ha cambiado la especificidad a la proteína de fibrina y ha cambiado las propiedades farmacocinéticas que conducen a cambios en los efectos farmacodinámicos. TNK es una glicoproteína de 527 aminoácidos de peso molecular de 70 KDa. Ha sido aprobada para su uso en los
15 medicamentos para el tratamiento del infarto agudo de miocardio y algunas otras trombosis y la rotura de los vasos sanguíneos relacionada con la embolia en diferentes órganos. Recientemente, se ha considerado para el tratamiento del ictus isquémico agudo y se han realizado varios ensayos clínicos para esta indicación, pero estos ensayos no han aportado ninguna prueba concluyente sobre la dosis segura y eficaz de TNK para IIA.

20 Los activadores de plasminógeno son enzimas que activan el plasminógeno para generar la serina proteasa plasmina que a su vez degrada la fibrina. Entre los activadores de plasminógeno usados como fármacos se encuentran: a) estreptoquinasa [una proteína bacteriana], b) uroquinasa, [una enzima sintetizada en el riñón] y c) activador del plasminógeno tisular humano [una enzima producida por el endotelio vascular]. También hay otras enzimas en desarrollo que son candidatos potenciales como fármacos fibrinolíticos. Los mecanismos de acción de estos activadores son diferentes: la estreptoquinasa forma un complejo con plasminógeno que genera actividad de
25 plasmina, la uroquinasa escinde plasminógeno directamente y el APT forma un complejo ternario con fibrina y plasminógeno que conduce a la activación del plasminógeno y a la disolución del coágulo *in situ*. El APT humano natural tiene una semivida plasmática de 8-10 minutos. Sin embargo, se deseaba que tuviera una semivida aumentada de modo que la terapia fibrinolítica pueda administrarse de manera eficaz en un corto período de tiempo, con resultados de eficacia más beneficiosos. Por lo tanto, se crearon y se probaron varios aminoácidos y mutantes de delección de la proteína para los caracteres mejorados sobre APT. TNK tiene seis mutaciones que duplicaron la semivida [a 20-24 min.] en comparación con APT y caracteres mejorados, como una mayor especificidad del coágulo de fibrina con una afinidad menos concurrente por el inhibidor del activador del plasminógeno-I.

30 TNK se desveló por primera vez en el documento US5385732 en el que se producía mediante tecnología de ADN recombinante usando una línea celular de mamífero establecida. Muchas otras patentes incluyen diferentes aspectos de la producción y uso de TNK, a saber, los documentos US5728567, US5714145, US5366886, US5094953, US5407819 y US6506598. El documento US5407819 desvela un procedimiento para la preparación de una variante de APT mediante el desplazamiento de un aminoácido particular en la secuencia de aminoácidos. El documento US5612029 desvela una variante de APT, que está glicosilada en cualquier posición en 103-105 y desprovista de estructura de carbohidrato funcional en la posición 117 de la secuencia de APT humana de tipo silvestre. El documento US5520911 desvela la preparación de secuencias de ADN para codificar la variante de APT. El documento US5424198 desvela un procedimiento para la producción de ATP transformando las células con genes DHFR mutantes o de tipo silvestre en combinación con genes APT. Estos y muchos otros documentos también incluyen las diversas afecciones médicas o indicaciones en las que se puede usar TNK como fármaco para el
40 tratamiento relacionado con la formación de coágulos. Una de las afecciones incluidas por el documento US20080107641 es IIA. Sin embargo, esta solicitud no desvela ningún procedimiento para identificar una dosis segura y eficaz de TNK para el tratamiento de IIA en personas humanas. En su lugar, predice el uso de una dosis segura basándose en modelos teóricos de matrices de datos existentes sin proporcionar ningún procedimiento específico de prueba y sin calificar las dosis eficaces identificadas. Por lo tanto, la técnica anterior actual no logra abordar la necesidad insatisfecha de identificación de dosis seguras y eficaces de TNK para el tratamiento de IIA y composiciones farmacéuticas eficaces (formulaciones) para el tratamiento de IIA. La presente invención aborda la necesidad anteriormente mencionada y proporciona formulaciones mejoradas y más eficaces de TNK para el
50 tratamiento de IIA en sujetos humanos, que es segura y fácil de administrar en un corto período de tiempo.

Existen algunos estudios que mencionan el uso de TNK para el tratamiento de IIA, sin embargo, no logran desvelar ninguna formulación de TNK con las cantidades de TNK que son seguras y eficaces como se desvela en el presente documento frente a sus efectos secundarios. Además, el TNK usado para la preparación de formulaciones se prepara usando la nueva tecnología del sistema de fermentación continua basada en perfusión que no se ha usado previamente para preparar la proteína TNK.

Se conocen varias formulaciones que usan TNK para el tratamiento del IIA. Sin embargo, hasta ahora ninguno ha

sido aprobado por ningún regulador de fármacos que sea seguro y eficaz cuando se analiza el análisis de riesgo-beneficio. Habiendo identificado este hueco, se desvelan en el presente documento algunas formulaciones de TNK que tienen las propiedades deseadas requeridas de un fármaco seguro y eficaz para el tratamiento de IIA. Algunos aspectos del procedimiento usado en la presente divulgación para la preparación del TNK de alta pureza son conocidos en la técnica anterior. Sin embargo, en este ejemplo se usan varios elementos nuevos que no se conocen en la técnica para la producción, preparación, selección, prueba y especialmente calificación clínica de las formulaciones de TNK para el tratamiento de IIA.

Objetos de la invención

El objeto principal de la invención es identificar la cantidad eficaz y segura de TNK para el tratamiento de IIA en sujetos humanos. Otro objeto de la invención es desarrollar las formulaciones de TNK que son seguras y eficaces en el tratamiento de IIA en sujetos humanos. Otro objeto más de la invención es realizar ensayos clínicos para identificar la cantidad de TNK que es segura y eficaz para el tratamiento de IIA. Un objeto adicional de la invención es usar tecnología de fermentación basada en perfusión para la producción recombinante de TNK usada para conseguir los objetos anteriores. La presente invención se define en las reivindicaciones.

Sumario

La producción de TNK se realizó mediante tecnología de ADN recombinante en células de ovario de hámster chino (OHC) en un sistema de fermentación continua basada en perfusión. Este procedimiento permite una producción a gran escala de la proteína con mayor calidad y cantidad, además de ser escalable para aplicaciones industriales. La línea celular recombinante que produce TNK como una proteína secretada se preparó y se seleccionó para la naturaleza deseada de TNK, y se usó para las formulaciones de TNK para el tratamiento de IIA en sujetos humanos. Estas formulaciones que tienen diferentes cantidades de TNK se probaron en un entorno clínico para identificar la cantidad segura y eficaz de TNK requerida para el tratamiento óptimo de IIA en sujetos humanos. Los datos del ensayo clínico que proporcionaron la cantidad de TNK que es segura y eficaz para el tratamiento de IIA se desvelan en la intervención. Y el TNK se prepara usando un sistema de fermentación continua basada en perfusión. En la primera parte, se prepararon líneas celulares de mamífero (OHC) usando técnicas moleculares y de biología celular. A continuación, estas líneas celulares se exploraron para determinar el nivel de expresión de TNK secretado y se aisló una línea celular que expresaba altamente TNK para el desarrollo del procedimiento adicional para la producción de TNK de calidad farmacéutica. En la segunda parte, las células productoras de TNK se cultivaron en un sistema de fermentación continua basada en perfusión para la producción a gran escala de TNK y los medios agotados recogidos se almacenaron para su posterior procesamiento. En la tercera parte, la cosecha se sometió a las etapas cromatográficas para obtener TNK a granel altamente puro y potente como principio activo para la preparación posterior de las formulaciones para aplicaciones clínicas. En la cuarta parte, se prepararon un conjunto de formulaciones del TNK y se estudiaron para determinar diversos parámetros como la estabilidad, la potencia y otras propiedades farmacológicas en bioensayos. En la quinta parte, las formulaciones de TNK preparadas se examinaron en pruebas clínicas para identificar la cantidad segura y eficaz de TNK requerida para el tratamiento de IIA en personas afectadas bajo determinadas condiciones. Estos estudios identificaron un conjunto de parámetros necesarios para el uso seguro y eficaz de TNK para el tratamiento de IIA en forma de formulaciones inyectables.

Descripción detallada

El experto en medicina y farmacología sabe que con el fin de obtener composiciones farmacéuticas seguras y eficaces, es una buena estrategia desarrollar varias formulaciones de la concentración del principio activo con diferentes excipientes y probarlas en las condiciones deseadas de modo que una dosis segura y eficaz de un nuevo fármaco para indicación específica puede ser identificado. El papel de los excipientes es importante ya que proporcionan caracteres adicionales como estabilidad, facilidad de entrega, volumen, etc. El objeto principal de la presente invención es desarrollar una preparación mejorada de TNK para su uso como composiciones farmacéuticas para el tratamiento del ictus isquémico agudo en sujetos humanos que es seguro y eficaz con respecto a formulaciones conocidas. Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de pruebas clínicas que usan cantidades específicas de TNK para determinar la cantidad segura y eficaz de TNK en el tratamiento de IIA. Además, sigue existiendo una falta de comprensión sobre muchos aspectos de la tecnología del ADN recombinante, el desarrollo de procedimientos y la producción que afectan la productividad y las características de los productos finales. Por lo tanto, existe una necesidad de nuevos procedimientos de preparación de productos de tecnología de ADN que se mejoren con respecto a los procedimientos y tecnologías existentes. El objetivo de la presente invención es desarrollar composiciones/formulaciones farmacéuticas seguras y eficaces para el tratamiento del ictus isquémico agudo en seres humanos, en las que TNK se produce a partir de una línea celular OHC desarrollada *de novo* y usada en un sistema de fermentación continuo basado en perfusión para la producción a gran escala de TNK.

En la primera parte, se preparó la línea celular OHC que expresa TNK como una proteína secretada a un nivel superior. La biología molecular, la bioquímica y las técnicas analíticas usadas son convencionales en la técnica y se han usado de forma habitual. El plásmido de expresión de mamífero usado para la creación de la línea celular de expresión contenía un elemento promotor/potenciador de CMV antes de un gen artificial de TNK seguido de una cola poli-A SV40 para la terminación de la transcripción. El mismo plásmido también contenía un gen DHFR bajo el

control del promotor SV40, que terminaba con una cola poli-A de SV40. Este plásmido se transfectó a células OHC negativas para el gen DHFR nativo (línea celular OHC-DHFR). Se aisló una línea celular con niveles más altos de expresión de TNK y se usó adicionalmente [Ejemplo 1 y 2].

5 En la segunda parte, las células OHC que expresan TNK se usaron para la preparación a gran escala de TNK en un sistema de fermentación continua basada en perfusión. Aproximadamente $6-12 \times 10^9$ células se inmovilizaron en el núcleo del reactor del biorreactor de perfusión. Estas células se dejaron desarrollar en medio IMDM con SFB durante unos cuantos días hasta que se desarrolló la masa celular requerida bajo una concentración constante de glucosa de aproximadamente 1-2 gm/l en modo quimiostático. Durante la fase de producción, el medio se cambió a CHO-S-SFM II sin SFB, y la fermentación continuó durante varios meses bajo condiciones de glucosa alimentada mientras se producía una determinada concentración de producto bruto de TNK en el medio cosechado para un posterior procesamiento aguas abajo. El medio de recolección se recogió en recipientes estériles y se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior en las etapas de purificación posteriores [Ejemplos 3, 5 y 7].

15 En la tercera parte, el medio cosechado que contenía TNK bruto se sometió a un conjunto de etapas cromatográficas en una serie. Esto incluía una etapa de captura de afinidad de colorante, seguido de una etapa de purificación de afinidad de lisina y una etapa final de pulido de intercambio iónico. La Tabla A representa diferentes etapas de la purificación cromatográfica que conducen a un aumento de varias veces en la cantidad de proteína purificada según se determina por densitometría SDS-PAGE/HPSEC. Antes de someter el caldo cosechado al procedimiento de purificación, contenía aproximadamente 80 % de proteína TNK. Al final de la etapa final de cromatografía de intercambio iónico (CII), la pureza de la proteína era al menos del 95 %. Los tipos de resinas usadas para las etapas de afinidad, intercambio iónico y filtración en gel usadas en el procedimiento descrito en el presente documento pueden reemplazarse por otras resinas de caracteres similares. Los procedimientos de purificación descritos en el presente documento son la representación de ejemplos de la estrategia de purificación usada para la preparación de TNK para el tratamiento de IIA, y no están limitados por el uso de tipos de resinas cromatográficas desveladas, ya que otros medios de separación similares pueden usarse igualmente eficazmente. El TNK a granel se almacenó a una concentración de aproximadamente 5 mg/ml a -80 °C [Ejemplos 4, 5 y 7].

Tabla A: Aumento en la pureza de TNK

Etapas de cromatografía	Cantidad de TNK(ML)	% pureza de TNK
Cosecha	10 µg	~80 %
DAC-1	0,5 µg	~90 %
LAC-2	2 µg	~92 %
IEC-3	5 µg	>95 %

30 En la cuarta parte, se prepararon diversas formulaciones de la solución de TNK a granel en el intervalo de 0,10 a 0,24 mg/ml por vial de 10 ml en forma liofilizada. En un tipo de formulaciones, la relación de los componentes era de 1 parte de TNK, 11 partes de L-arginina, 3,4 partes de ácido fosfórico y 0,086 partes de polisorbato-20 como polvo liofilizado. Estas formulaciones se sometieron a las pruebas habituales y se usaron en la evaluación clínica de TNK para el tratamiento de IIA [Ejemplo 6].

35 En la quinta parte, las pruebas clínicas y la eficacia de las formulaciones de TNK en el tratamiento de IIA se evaluaron en un estudio multicéntrico, sin enmascaramiento que involucraba aproximadamente 35 personas afectadas. A partir de los datos obtenidos en este estudio, se obtuvo la cantidad segura y eficaz de TNK requerida para el tratamiento de IIA [Ejemplo 8].

40 La invención detallada anteriormente se ilustra con los siguientes ejemplos con el fin de mostrar la utilidad de la invención. Las realizaciones a continuación no restringen la invención de ninguna manera a partir de aplicaciones más amplias para la preparación de composiciones/formulaciones de proteínas similares a TNK. Las enseñanzas de la presente invención también se pueden usar en la preparación de las proteínas que son análogas de APT. Las figuras son ilustrativas y no limitan la aplicación más amplia de la invención con respecto a la calidad y la pureza de la proteína preparada y formulada.

LISTA DE FIGURAS

45 **Figura 1:** Gramo de SDS-PAGE reducido con tinción de plata de contenido de TNK en fracciones purificadas: 1) marcador de peso molecular (desde abajo: 21, 31, 45, 66 y 96 kDa); 2) caldo cosechado; 3) E-1 después de DAC; 4) E-2 después de LAC; 5) E-3 después de IEC y 6) muestra convencional.

Figura 2: Gramo de SDS-PAGE no reducido con tinción de plata de contenido de TNK en fracciones purificadas: 1) marcador de peso molecular (desde abajo: 21, 31, 45, 66 y 96 kDa); 2) caldo cosechado; 3) E-1 después de DAC; 4) E-2 después de LAC; 5) E-3 después de IEC y 6) muestra convencional.

50 **Figura 3:** Un gráfico HPSEC ilustrativo de TNK no reducido después de la etapa final cromatográfica: péptido TNK (tiempo de retención: 26,653 min.) tiene más del 99 % de pureza.

Figura 4: Un gráfico HPSEC ilustrativo de TNK reducido después de la etapa cromatográfica final: péptido TNK, monocatenario (tiempo de retención: 25,093 min) y péptido TK, bicatenario (tiempo de retención: 29,247 min).

Figura 5: Una curva convencional ilustrativa para las mediciones de bioactividad de TNK.

Ejemplos

5 Ejemplo 1: Biología molecular, bioquímica y procedimientos analíticos.

La biología molecular general, la bioquímica y los procedimientos analíticos usados durante los procedimientos son conocidos en la técnica. Las técnicas habituales pueden anticiparse y no se describen ya que están disponibles en la literatura pública. Las cepas usadas como células huésped bacterianas se obtuvieron de *E. coli* K-12 y los plásmidos y elementos de ADN usados para la preparación de vectores de expresión se recuperaron de plásmidos comúnmente disponibles o se diseñaron y sintetizaron internamente y se integraron para crear los elementos requeridos. La secuencia peptídica usada para la preparación de gen TNK artificial es la secuencia de APT humana que tiene los cambios de aminoácidos como: Thr103Asn, Asn117Gln, Lys296Ala, His297Ala, Age298Ala y Age299Ala

10
15
20
25
[MDAMKRGLCCVLLCCGAVFVSPSQEIHARFRRGARSYQVICRDEKTKQMIYQQHQSWLRPVLRSNRVEYCW
CNSGRAQCHSVPVKSCSEPRCFNGGTCQQALYFSDFVCQCEPGFAGKCCEIDTRATCYEDQGISYRGTWSTA
ESGAECTNWSSALAQKPYSGRRPDAIRLGLGNHNYCRNPDRDSKPWCYVFKAGKYSSEFCSTPACSEGNS
DCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNSMILIGNVYTAQNPSAQAALGLGKHNYCRNPDGDAKPWCHVLKN
RRLTWEYCDVPCSTCGLRQYSQPQFRIGGLFADIASHPWQAIFAKHRRSPGERFLCGGILISSCWILSAAH
CFQERFPPHHLTVILGRYRVVPGEEEQKFEVEKYIVHKEFDDDTYDNDIALQLKSDSSRCAQESSVVRTVCLP
PADLQLPDWTECELSGYGKHEALSPFYSERLKEAHVRLYPSRCTSQHLLNRTVTDNMLCAGDTRSGGPQAN
LHDACQGDSSGGLVCLNDGRMTLVGIISWGLGCGQKDVPGVYTKVTNYLDWIRDNMRP]. Todos los elementos de
ADN sintético posteriores se basaron en esta secuencia y se integraron en los vectores de expresión de clonación y mamífero usando procedimientos convencionales. Para confirmar la identidad y la integridad de estos elementos, se realizó la secuenciación de ADN y las secuencias se curaron de forma manual.

25 Ejemplo 2: Preparación de una línea celular de mamífero para la expresión de TNK.

Una secuencia de ADN TNK artificial del gen APT humano con las seis mutaciones anteriores se sintetizó artificialmente. Esta secuencia se clonó en un vector plasmídico que tiene los elementos para la sobreexpresión eficiente de la proteína en células de ovario de hámster chino (OHC) como una proteína secretada en el medio. En el vector, el elemento potenciador/promotor CMV fue seguido del gen artificial TNK seguido de un elemento de terminación de la transcripción poliA SV40. El mismo plásmido también expresó el gen DHFR controlado por el promotor temprano SV40 y el terminador poliA SV40 como un cistrón separado. El gen DHFR también se usó como el marcador de expresión en las células OHC recombinadas para la detección de células positivas para TNK. El vector se transfeció en la línea celular OHC negativa para dihidrofolato reductasa (DHFR) (DUKxBII) y se aislaron clones estables genómicamente integrados con expresión robusta de TNK secretada. Los niveles de expresión de TNK en diversos clones seleccionados se probaron con análisis de transferencia de Western y SDS-PAGE, seguido de procedimientos cuantitativos de RT-PCR para establecer las líneas celulares con la expresión estable y robusta de la proteína. Se usó una línea celular con una buena productividad de TNK para crear el banco de células maestro, a partir del cual se preparó el banco de células de trabajo y se usó en los procedimientos de fermentación de perfusión a gran escala aguas arriba. EL TNK secretado por cada clon se probó para la integridad y la calidad de la proteína; también se realizaron pruebas para determinar las actividades enzimáticas asociadas con esta proteína según las normas de la farmacopea para las aplicaciones medicinales.

35 Ejemplo 3: Sobreexpresión de TNK en células OHC.

La secuencia de aminoácidos de TNK se expresó bajo el control del sistema de expresión constitutiva del promotor/potenciador de CMV en células OHC. En este ejemplo se empleó una nueva tecnología de fermentación continua llamada biorreactor de perfusión para la producción a gran escala de la proteína. Las células OHC productoras de TNK se cultivaron en el medio IMDM [INVITROGEN] con suero bovino fetal (SBF). A partir de un cultivo de aproximadamente 1×10^6 células recombinantes, se consiguió una cantidad final de aproximadamente $6-12 \times 10^9$ células con la amplificación en serie de las células en matraces de cultivo tisular y frascos rotatorios durante un período de varios días. Las condiciones de cultivo mantenidas en todas las etapas durante la generación de masa celular fueron: temperatura: $36,5^\circ\text{C}$, CO_2 : 5 % y SFB: 10 %. La confluencia de la celda se mantuvo a >90 % del área superficial de cultivo en los matraces y frascos en todas las etapas antes de la recolección de las células para la siguiente etapa. Se realizaron pruebas microscópicas y bioquímicas periódicas para detectar la salud y la integridad de las células en crecimiento. A continuación, se eliminaron con tratamiento de tripsina suave para su transferencia al biorreactor, que estaba equipado con sondas de pH y OD y los medios de soporte celular en el núcleo del reactor para contener la célula en el reactor. El reactor de 5 l esterilizado se inoculó con $6-12 \times 10^9$ células y se dejó funcionar durante 3-4 días a una concentración de glucosa de aproximadamente 1-2 gm/l. Este procedimiento condujo a la sedimentación de las células en el reactor en condiciones saludables. Los parámetros del reactor fueron: temperatura: $36,6^\circ\text{C}$, aireación: 1,0 l/min, pH: entre 7,2-7,4 [mantenido usando CO_2 y solución saturada de bicarbonato de sodio], agitación: 100 rpm, oxígeno disuelto: 30 %. Una vez que las células se colocaron

en la matriz de soporte, el medio se cambió de IMDM con SFB a OHC-S-SFM II [INVITROGEN] sin SFB. Este medio se usó en toda la fase del producto. Al comienzo de la fase del biorreactor, se recogieron y desecharon aproximadamente 100 l de los medios iniciales. Posteriormente, la temperatura del reactor se mantuvo a 33,5 °C durante la fase de producción y se recogieron aproximadamente 100 l de la cosecha todos los días mientras se mantenía el nivel de glucosa del reactor entre 0,3-1,5 g/l. En estas condiciones, el biorreactor de perfusión se puede utilizar para recolectar hasta 10.000 l de la cosecha en un período de 3-4 meses. Los lotes de caldo cosechado se filtraron a través de filtros de 0,45 µm, se recogieron en recipientes estériles y se almacenaron a 2-8 °C hasta su posterior procesamiento. Los grupos de caldo cosechado se probaron periódicamente para determinar el contenido de TNK y la esterilidad con los procedimientos establecidos [Figuras 1 y 2].

10 Ejemplo 4: Purificación de TNK.

Los lotes de caldo cosechado se probaron para determinar el contenido de TNK, su integridad y esterilidad [Figuras 1 y 2]. En un único lote de 1000 l para la purificación, se usó una serie de etapas de cromatografía. En la primera etapa, un lote de aproximadamente 1000 l de caldo cosechado con contenido de TNK de aproximadamente 10 mg/l se cargó en una columna del sistema de cromatografía líquida rápida (FLC) (300 mm X 500 mm) con 11 l de resina de afinidad de colorante activada (Resina Blue Sepharose 6 FF; GE Healthcare). La columna se equilibró con tampón-1 de equilibrio (EB-1, fosfato de sodio: 20 mM, NaCl: 0,15 M, pH 7,2) haciendo pasar 2 volúmenes de columna (VC) a un caudal de aproximadamente 100-150 cm/h. La cosecha se cargó en la columna con un caudal lineal de aproximadamente 100-150 cm/h, seguido por el paso de EB-1 de 2 VC a un caudal de aproximadamente 100 cm/h. Esto fue seguido por 2-3 VC del tampón de lavado (WB-1, fosfato de sodio: 20 mM, NaCl: 2 M, pH 7,2) a un caudal de 100-150 cm/h. La proteína diana unida se eluyó pasando aproximadamente 4 VC de tampón-1 de elución, (EUB-1, fosfato de sodio: 20 mM, NaCl: 1 M, urea: 3 M, H 7,2) y se recogió basándose en la absorbancia a 280 nm. El eluato (E-1) se analizó para determinar la cantidad y pureza de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE. En esta etapa, el contenido de TNK en la proteína total es aproximadamente del 90 %. En la segunda etapa, el tampón se intercambió usando cromatografía de filtración en gel. E-1 se cargó en una columna (300 mm X 750 mm) con 25 l de resina de filtración en gel (Sephadex G-25). La columna se lavó luego con 2 VC del tampón de intercambio (fosfato de sodio: 20 mM, pH 7,2) con un caudal lineal de aproximadamente 100-150 cm/h, y el eluato (E-2) se recogió en un recipiente estéril. En la tercera etapa, E-2 se cargó en una columna (200 mm X 500 mm) con 4,5 l de resina de afinidad de L-lisina activada (resina Lysine HyperD; Pall Corp.). La columna se equilibró luego con tampón-2 de equilibrio (EB-2, fosfato de sodio: 20 mM, polisorbato-20: 0,043 %, pH 7,2) haciendo pasar 2 volúmenes de columna (VC) a un caudal de aproximadamente 100-150 cm/h, seguido por el paso de 2 VC de WB-2 (fosfato de sodio: 20 mM, NaCl: 1 M, polisorbato-20: 0,043 %, pH 7,2) a un caudal de aproximadamente 100 cm/h. La proteína diana unida se eluyó pasando 2 VC de tampón 2 de elución (EUB-2, arginina: 0,5 M, AEAC (ácido epsilon-aminocaproico): 0,2 M, polisorbato-20: 0,043 %, pH 7,8 ajustado con ácido fosfórico) y se recogieron basándose en la absorbancia a 280 nm. El eluato (E-3) se analizó para determinar la cantidad y pureza de proteínas mediante electroforesis en SDS-PAGE [Figuras 1 y 2]. En esta etapa, el contenido de TNK de las proteínas totales es más del 95 %. Esto fue seguido por intercambio de tampón por GFC a tampón de almacenamiento a granel (L-arginina: 55 g/l, ácido fosfórico: 17 g/l, polisorbato -20: 430 mg/l, pH 7,6 ± 0,2). La concentración final de TNK en la solución fue de aproximadamente 2 mg/ml, y la solución se almacenó congelada hasta su uso posterior. Esta solución de TNK se concentró adicionalmente usando una resina intercambiadora de aniones (resina Capho Q., GE Healthcare) a 5 mg/ml antes de la preparación de las formulaciones.

Ejemplo 5: Ensayos analíticos.

Durante los procedimientos de producción y purificación, el contenido de TNK durante el proceso en las muestras se determinó mediante procedimientos convencionales SDS-PAGE reductores y no reductores [Figuras 1 y 2]. Se prepararon geles de SDS-PAGE al 10 % y se cargaron 50 µg de la muestra de proteína en cada pocillo. Para la determinación del contenido de monómero y cadena simple de las muestras, se usaron procedimientos de HPSEC [cromatografía de exclusión de tamaño de alto rendimiento] reductores y no reductores, respectivamente. Las columnas usadas para los procedimientos HPSEC fueron columna de cromatografía de exclusión de tamaño basada en sílice para un intervalo de separación de moléculas de 10-500 kDa [Figuras 4 y 5]. Las muestras convencionales y de prueba se realizaron en condiciones de análisis idénticas. También se realizaron ensayos periódicos de bioactividad durante el procedimiento para controlar la calidad y la integridad de la proteína.

Ejemplo 6: Formulaciones de TNK.

Las diversas formulaciones de TNK se prepararon para probar la seguridad y eficacia del TNK en el tratamiento de IIA. Las formulaciones se basaron en las relaciones como 1 parte de TNK, 11 partes de L-arginina, 3,4 partes de ácido fosfórico y 0,086 partes de polisorbato-20 como productos liofilizados. La concentración de la solución de TNK a granel usada para esta preparación fue de 5 mg/ml de TNK. Después de mezclar los componentes sin precipitación de TNK en la solución, las formulaciones se liofilizaron en formas en polvo estables. Se preparó un conjunto de formulaciones liofilizadas con una concentración de TNK que oscilaba entre 0,10, 0,14, 0,18, 0,20 y 0,24 TNK por ml por vial de 10 ml cuando se reconstituyó con 10 ml de agua para inyección, y se almacenó a aproximadamente 4 °C hasta su uso posterior. Estas formulaciones de prueba se sometieron a diferentes pruebas y estudios de estabilidad, y se encontró que es comparable en contenido y su estabilidad por un período de un año. Las formulaciones liofilizadas, cuando se reconstituyeron con 10 ml de agua estéril para inyección, proporcionaron la

cantidad anteriormente mencionada de TNK por ml en soluciones transparentes para la prueba en pruebas clínicas.

Ejemplo 7: Bioensayo de TNK.

La potencia biológica de TNK a granel y formulada se determinó mediante un ensayo de lisis de coágulos tubidimétrico rápido desarrollado a partir del protocolo de la monografía de la farmacopea europea para alteplasa. En una placa transparente de múltiples pocillos de 1,5 ml, se tomaron 20 µl de plasminógeno humano (1 mg/ml) y 1 ml de soluciones de fibrinógeno humano (2 mg/ml), se mezclaron y se guardaron a 0 °C. En una placa separada de múltiples pocillos de 1,5 ml, se prepararon 0,5 ml de trombina humana (33 UI/ml) y 0,5 ml de soluciones de prueba o de referencia de TNK (proteínas totales 1 mg/ml), se mezclaron y se llevaron a 37 °C. Todas las diluciones se prepararon con el tampón disolvente como se desvela. Se añadieron 200 µl de mezclas de referencia/prueba a las mezclas de plasminógeno/fibrinógeno y se incubaron a 37 °C. Después de la formación del coágulo visiblemente turbio en 30 segundos, se formaron posteriormente burbujas en los tubos a medida que avanzaba la lisis del coágulo. Se registraron los momentos en los que se añadieron las mezclas de trombina y ascendió la última burbuja en el tubo, lo que proporcionó tiempos de lisis del coágulo en segundos. Se determinaron los tiempos de lisis del coágulo de las muestras TNK de prueba y referencia y se calculó la prueba de bioactividad del TNK a granel en unidades internacionales (UI) por ml para el lote usado en este ejemplo, de acuerdo con el protocolo EP. La Figura 5 muestra una curva convencional ilustrativa para mediciones de la bioactividad de TNK. La bioactividad del lote usado en este ejemplo fue de 203 UI/mg. Las tablas B y C representan los números para las muestras de referencia y las muestras de prueba de TNK obtenidas en el ensayo de bioactividad de lisis del coágulo.

Tabla B: Bioensayo de TNK: muestras de referencia

N.º PATRÓN	Conc. de proteína (ng/ml) de PATRÓN REF.	Tiempo (s) para la lisis del coágulo para el PATRÓN [prom. de 2]
1	100	4078,29
2	200	2978,02
3	400	2139,05
4	800	1529,98
5	1600	1086,62

Tabla C: Bioensayo de TNK: muestras de prueba

N.º de muestra de prueba	Conc. de proteína (ng/ml) de la muestra de prueba	Tiempo (s) para la lisis del coágulo para el PATRÓN [prom. de 2]	Cantidad calculada de TNK en la muestra (ng/ml) usando la curva PATRÓN
1	100	3930,16	96,4
2	200	2970,70	199,5
3	400	2135,70	399,4
4	800	1538,90	804,7
5	1600	1091,50	1607,2

Ejemplo 8: Prueba y eficacia de las formulaciones de TNK.

La prueba clínica de las formulaciones de TNK para IIA se realizó usando procedimientos establecidos usados en medicina clínica. En un ensayo clínico multi-céntrico sin enmascaramiento sobre la eficacia y la seguridad del TNK en el tratamiento del ictus isquémico agudo (IIA) en personas que informaron dentro de las 4,5 horas de inicio, se usaron dos dosis de TNK: 0,1 mg/kg (inyección intravenosa) en bolo IV y 0,2 mg/kg en bolo IV en un programa aleatorizado. La TNK se inyectó como una inyección en bolo IV después de la confirmación de la ausencia de hemorragia intracerebral mediante exploraciones por TC durante el período de 5-10 segundos. La dosis de 0,1 mg/kg IV fue recibida por 14 personas y la dosis de 0,2 mg/kg IV fue recibida por 21 personas. El NIH-SS (escala de ictus del Instituto Nacional de Salud) se consideró como el principal parámetro de eficacia. En ambos grupos hubo una mejora estadísticamente significativa en la puntuación media NIH-SS en las primeras 24 horas (Tablas 1-3). Esta mejora se mantuvo en los 7 días de evaluación. La mejora de la puntuación NIH-SS de ≥ 4 se consideró como una mejora clínicamente significativa (Tabla 2). El grupo de 0,2 mg/kg mostró una mayor incidencia de eficacia en este parámetro a las 24 horas (80,95 %) que aumentó a 95,24 % en el día 7. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de dosificación, estos datos sugirieron que la dosis de 0,2 mg/kg fue preferente. Usando los criterios más estrictos de la mejora de la puntuación NIH-SS de ≥ 8 , (Tabla 3), el grupo de 0,2 mg/kg mostró un aumento estadísticamente significativo en la incidencia de mejora en el día 7 ($p = 0,015$) que confirmó que la dosis de 0,2 mg/kg fue preferente. La eficacia de 0,2 mg/kg IV de TNK para NIH-SS > 4 se observó en 80,95 % de las personas en comparación con 49,51 % en el estudio JACT [Stroke 2006; 37 (7):1810-5] con 0,6 mg/kg IV de alteplasa ($p = 0,0087$), y 46,52 % en el estudio NINDS [NEJM 1995; 333(24): 1581-87] con 0,9 mg/kg IV de alteplasa ($p = 0,0043$) y 65,5 % en un estudio indio [Ann Indian Acad Neurol 2008;11:221-4] con alteplasa a 0,9

5 mg/kg IV (p = 0,0172). Estos datos mostraron que la dosis de 0,2 mg/kg IV de TNK tiene una eficacia significativamente mejor que la alteplasa. Con respecto a los criterios más estrictos de NIH-SS > 8, TNK mostró eficacia en 28,57 % de personas que fue numéricamente más alta que los datos de 0,2 mg/kg de TNK (24 %) de Haley 2005 [Stroke 2005; 36:607-612] y estadísticamente no significativa en comparación con datos de Haley 2010 [Stroke 2010; 41: 707-11] (35,5 %) con 0,25 mg/kg de TNK. No hubo HIC sintomáticas (hemorragia intracerebral) en ninguno de los grupos. La HIC asintomática se detectó mediante exploración por TC en 48 horas en una persona en el grupo de 0,1 mg/kg y en 2 personas en el grupo de 0,2 mg/kg. En total se informó de 3 incidentes de HIC asintomáticos (8,57 %). Se ha informado que la incidencia de HIC sintomática o asintomática es del 11,29 % (= 7/62) en el estudio Haley 2010 y del 20 % (= 10/50) en el estudio Haley 2005 con TNK. Estudios previos con alteplasa informaron de HIC sintomática en hasta 7 % de personas e HIC asintomáticas en hasta 31 % de personas (NEJM 1995, 333, 24, 1581-7). Los nuevos datos desvelados mostraron que la eficacia de la TNK es mejor que la informada con alteplasa en el tratamiento de IIA.

Tabla 1: Mejora en la puntuación media NIH-SS

	Grupos de estudio		Valor p #
	N = 14 de 0,1 mg/kg	N = 21 de 0,2 mg/kg	
Período basal (media ± D)	10,07 ± 3,89	12,95 ± 5,08	0,081
24 h después de la inyección (media ± DE)	6,43 ± 4,65	5,90 ± 4,06	0,72
48 h después de la inyección (media ± DE)	5,57 ± 4,48	4,24 ± 3,97	0,31
Día 7 después de la inyección (media ± DE)	4,29 ± 4,23	3,20 ± 4,13	0,45
valor p en comparación con el periodo basal@	0,0009	<0,0001	NA

#: valor p cuando se compara entre los grupos: se aplicó la prueba T.
 @: valor p cuando se compara con el periodo basal y valor del día 7 en el grupo: se aplicó la prueba T.
 P<0,05: estadísticamente significativo, NA: no aplicable N = número de pacientes

Tabla 2: Mejora NIH-SS ≥ 4 puntos

Mejora NIH-SS ≥ 4	Grupos de estudio		Valor p #
	0,1 mg/kg	0,2 mg/kg	
n a las 24 h (%)	8 (57,14)	17(80,95)	0,15
n a las 48 h (%)	10 (71,43)	20 (95,24)	0,133
n en el día 7 (%)	11 (78,57)	20 (95,24)	0,279
Valor p @	0,41	0,34	NA

#: valor p cuando se compara entre los grupos
 @: valor p cuando se compara a las 24 h y valor en el día 7 en el grupo
 P<0,05: estadísticamente significativo: NA: no aplicable. N= se aplicó el número de prueba exacta de Fisher a los pacientes para las proporciones. n: proporción de pacientes

15

Tabla 3: Mejora NIH-SS ≥ 8 puntos

Mejora NIH-SS ≥ 8	Grupos de estudio		Valor p #
	N = 14 de 0,1 mg/kg	N = 21 de 0,2 mg/kg	
n a las 24 h (%)	1 (7-14)	6 (28,57)	0,202
n a las 48 h (%)	2 (14,29)	9 (42,86)	0,136
n en el día 7 (%)	2 (14,29)	12 (57,14)	0,015
Valor p @	1	0,118	NA

#: valor p cuando se compara entre los grupos
 @: valor p cuando se comparan los datos a las 24 h y valor en el día 7 en el grupo
 P<0,05: estadísticamente significativo: NA: no aplicable. N= se aplicó el número de prueba exacta de Fisher a los pacientes para las proporciones. n: proporción de pacientes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica como una inyección en bolo intravenoso para su uso en el tratamiento del ictus isquémico agudo en sujetos humanos que comprende:

5 0,20 mg/kg de peso corporal de tenecteplasa cuando se administra, en la que dicha tenecteplasa se prepara mediante un procedimiento de fermentación continua basada en perfusión;
un tampón inorgánico farmacéuticamente aceptable;
agentes estabilizantes farmacéuticamente aceptables; y
opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable; y

10 en la que la dosis total de la composición se proporciona como un bolo intravenoso en 10 segundos dentro de las 6 horas del inicio del incidente del ictus.

2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la tenecteplasa se prepara en un sistema de fermentación de perfusión continua usando células de ovario de hámster chino.

3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tampón usado es ácido fosfórico/tampón de fosfato.

15 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente estabilizante usado es L-arginina.

5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que otro agente estabilizante usado es polisorbato.

20 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los componentes se liofilizan en forma de polvo para la reconstitución con agua para inyección antes de su uso.

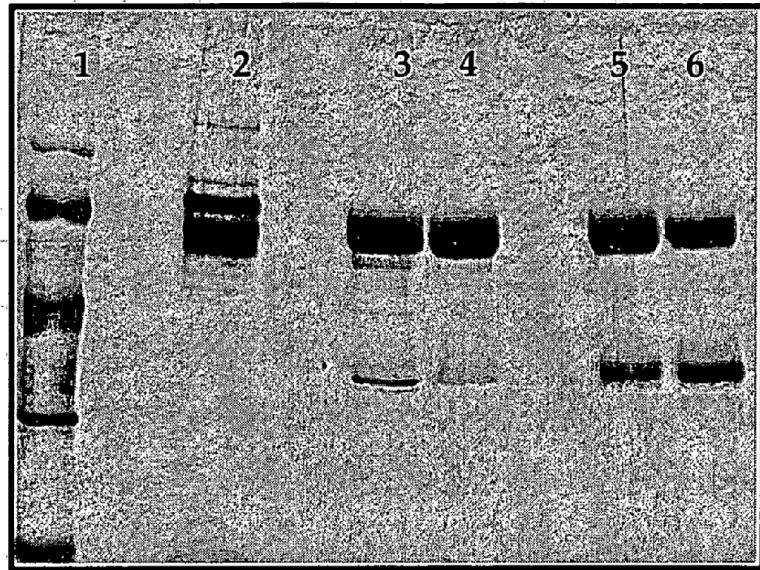


Figura 1

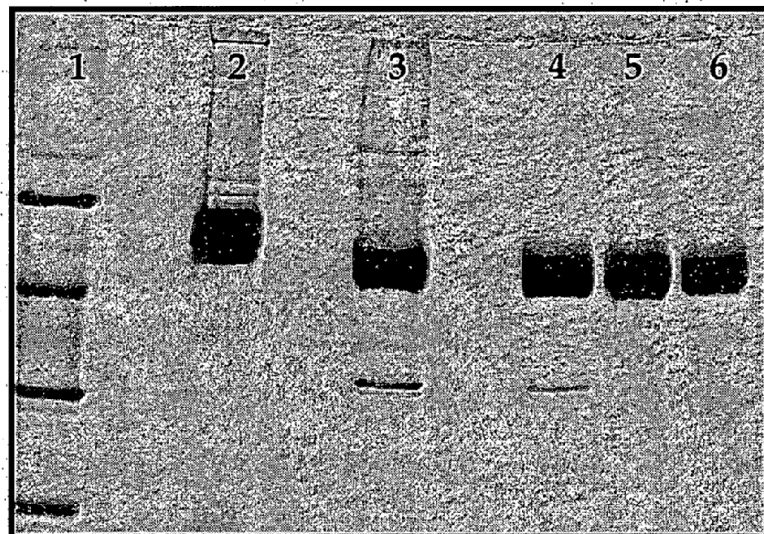


Figura 2

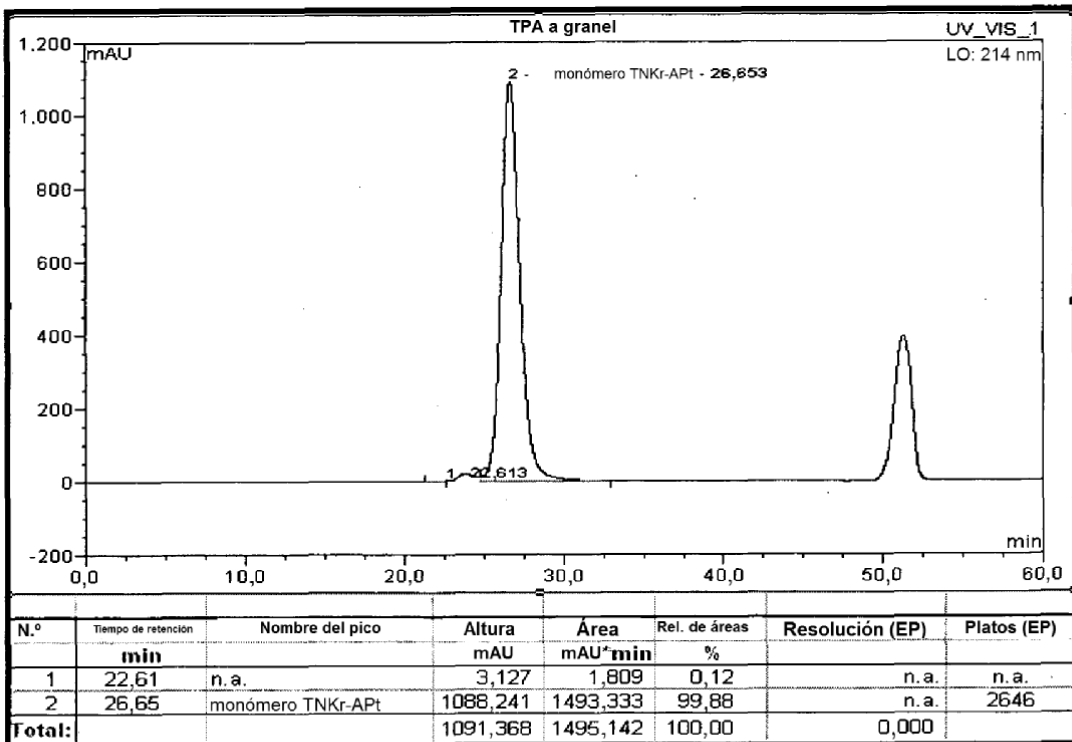
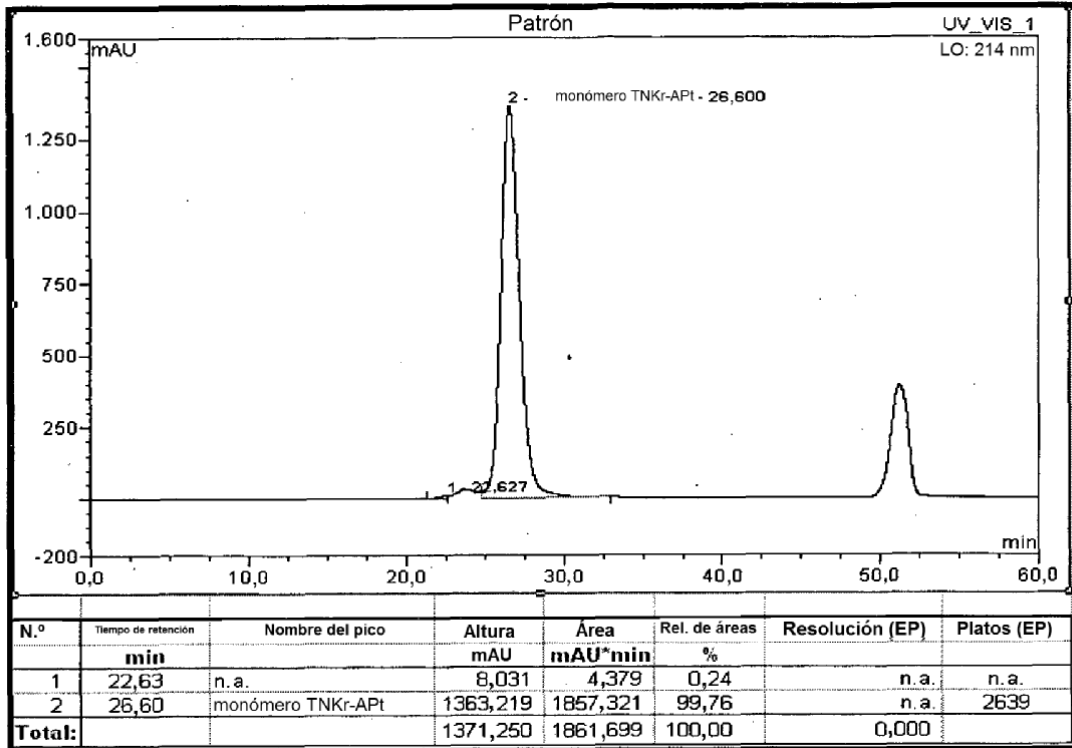


Figura 3

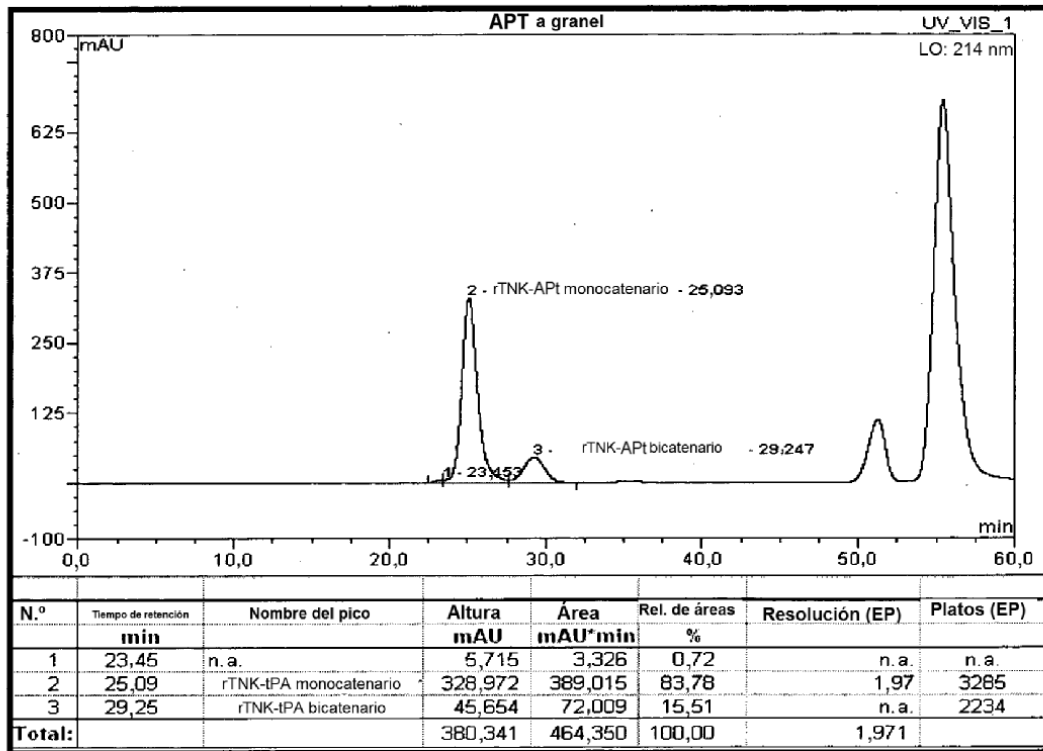
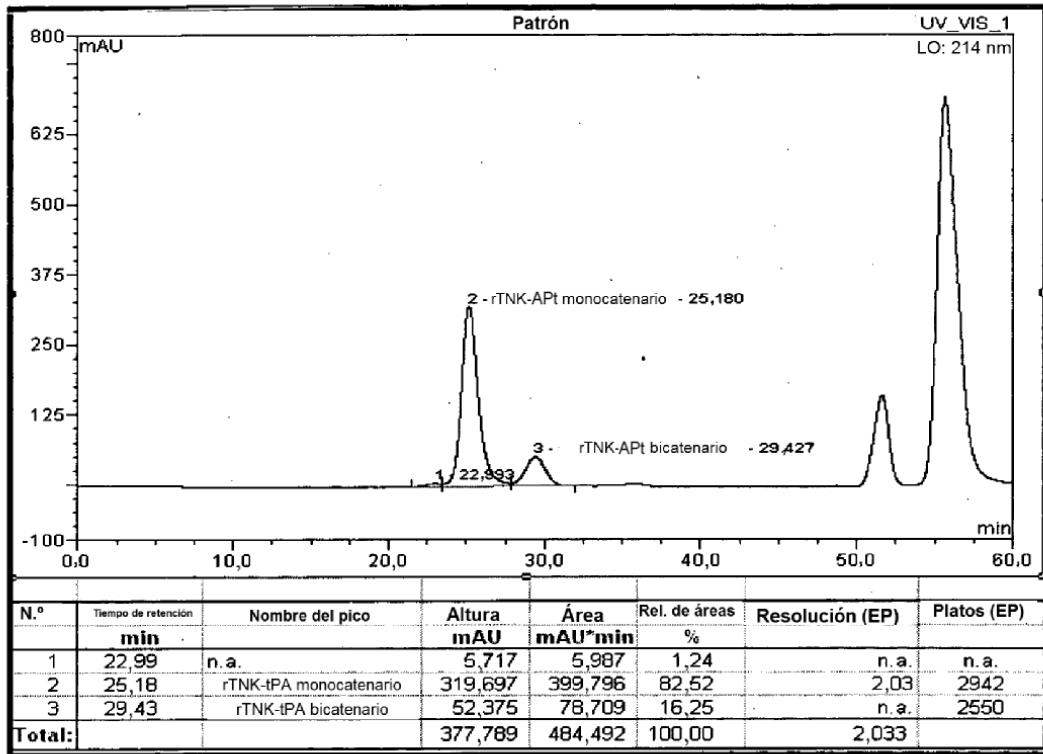


Figura 4

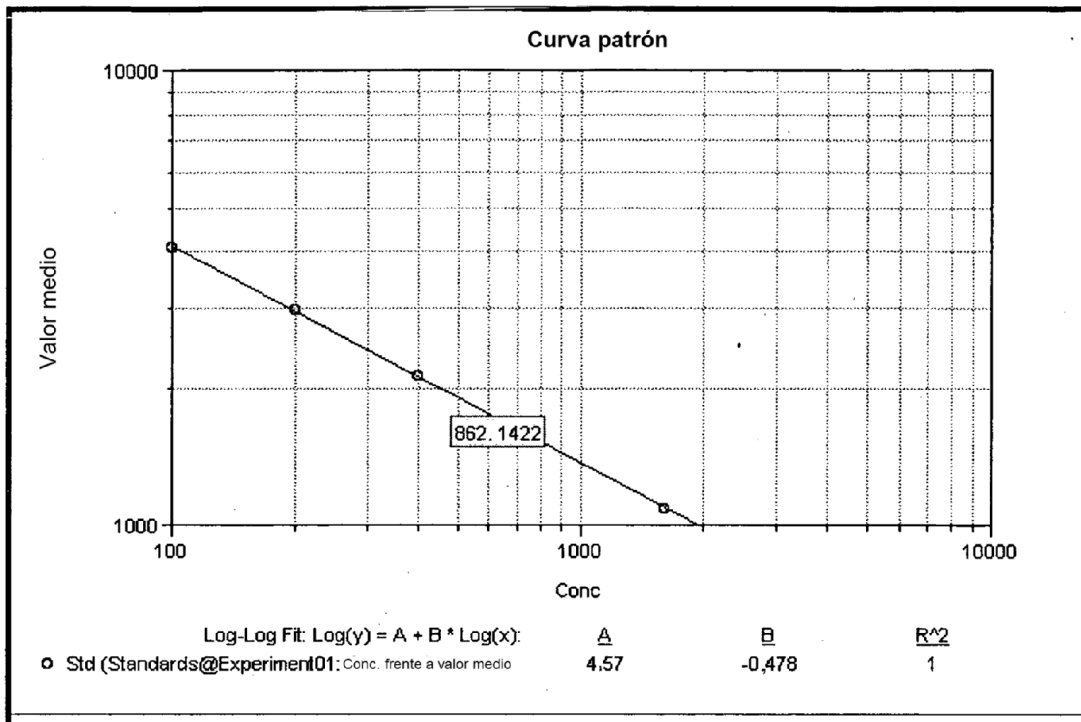


Figura 5