

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 081**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2007 PCT/FR2007/000909**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2007 WO07138199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2007 E 07788821 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2037955**

54 Título: **Composición de factor VII recombinante o transgénico, poseyendo cada molécula de factor VII dos sitios de N-glicosilación con unidades de glicano definidas**

30 Prioridad:

31.05.2006 FR 0604872

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

19.09.2019

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)**

**3 Avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**CHTOUROU, ABDESSATA SAMI;
NONY, EMMANUEL y
BIHOREAU, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 725 081 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

Composición de factor VII recombinante o transgénico, poseyendo cada molécula de factor VII dos sitios de N-glicosilación con unidades de glicano definidas

5 La presente invención se refiere a un factor VII recombinante o transgénico obtenido en forma de una composición de factor VII, poseyendo cada molécula de factor VII dos sitios de N-glicosilación con unidades de glicano definidas, así como a su utilización como medicamento.

10 El factor VII (FVII) es una glicoproteína vitamina K-dependiente que, en su forma activada (FVIIa), participa en el proceso de coagulación activando el factor X y el factor IX en presencia de calcio y del factor tisular. El FVII se segrega en forma de una cadena peptídica única de 406 residuos, cuyo peso molecular es de aproximadamente 50 kDa. El FVII comprende cuatro dominios estructurales distintos: el dominio γ -carboxílico (Gla) N-terminal, dos dominios "factor de crecimiento epidérmico (EGF)-like", así como un dominio serina proteasa. La activación del FVII en FVIIa se caracteriza por el corte del enlace Arg₁₅₂-Ile₁₅₃ (arginina 152-isoleucina 153). El FVIIa está por lo tanto compuesto de una cadena ligera de 152 aminoácidos de peso molecular de aproximadamente 20 kDa y de una cadena pesada de 254 aminoácidos de peso molecular de aproximadamente 30 kDa, unidas entre sí por un único puente disulfuro (Cys₁₃₅-Cys₂₆₂).

20 El FVIIa plasmático comprende varias modificaciones post-traduccionales: los diez primeros ácidos glutámicos son γ -carboxilados, el Asp₆₃ está parcialmente hidroxilado, la Ser₅₂ (serina 52) y la Ser₆₀ (serina 60) son O-glicosiladas y llevan respectivamente las unidades glucosa (xilosa)₀₋₂ y fucosa, el Asn₁₄₅ (asparagina 145) y el Asn₃₂₂ (asparagina 322) son N-glicosiladas mayoritariamente por unas estructuras complejas biantenarias bisialiladas.

25 El FVII se utiliza en el tratamiento de los pacientes que padecen hemofilia, que presentan una deficiencia en factor VIII (hemofilia de tipo A) o en factores IX (hemofilia de tipo B), así como unos pacientes que presentan otras deficiencias de los factores de coagulación, por ejemplo una deficiencia hereditaria en FVII. Por lo tanto, es necesario disponer de concentrados de FVIIa inyectables.

30 El método más antiguo de obtención de concentrados de FVIIa consistió en la purificación de FVIIa a partir de proteínas plasmáticas procedentes del fraccionamiento.

El documento EP 0 346 241 describe, a este respecto, la preparación de una fracción enriquecida en FVIIa, obtenida después de la adsorción y después de la elución de un sub-producto del fraccionamiento de proteínas plasmáticas que contienen el FVII y el FVIIa y otras proteínas tales como los factores IX (FIX), X (FX) y II (FII), especialmente el preluato de PPSB (P = protrombina o FII, P = proconvertina o FVII, S = factor de Stuart o FX y B = factor antihemofílico B o FIX). El inconveniente de este procedimiento es que el FVII obtenido contiene todavía algunas trazas de otros factores de coagulación.

40 Asimismo, el documento EP 0 547 932 describe un procedimiento de fabricación de un concentrado de FVIIa de alta pureza esencialmente desprovisto de los factores vitamina K dependientes y del FVIII. El FVII obtenido por este procedimiento, a pesar de su pureza, presenta una actividad trombogénica residual. Sin embargo, los factores VII mencionados en los documentos EP0346241 y EP0547932 son unos factores VII plasmáticos.

45 Así, uno de los inconvenientes principales de estos procedimientos es que permiten obtener sólo bajas cantidades de productos. Por otro lado, sigue siendo difícil obtener un producto totalmente desprovisto de otras proteínas presentes en el plasma.

50 Finalmente, a pesar de que se toman numerosas precauciones en todas las etapas de la elaboración de los factores plasmáticos de la coagulación para asegurar su seguridad viral y bacteriana (seguido de los donantes de sangre, ensayos para detectar los contaminantes virales y bacterianos conocidos, tratamientos rigurosos de purificación y de inactivación viral para reducir al máximo el riesgo de transmisión de agentes patógenos vehiculados por la sangre), no se descarta, sin embargo, cualquier riesgo de contaminación por agentes patógenos. Además, la emergencia de la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob ha hecho reaparecer los miedos de transmisión de agentes patógenos no convencionales por los productos procedentes de la sangre. Además, el volumen de plasma recogido de los donantes de sangre sigue siendo limitado.

60 Por ello, a partir de los años 80, se ha aislado el ADN que codifica el factor VII humano (Hagen *et al.* (1986); Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Apr 83(8):2412-6) y expresado en las células de mamíferos BHK (Baby Hamster Kidney) (documento EP 0 200 421). Si este método de producción de FVII tiene por ventaja el control del medio en el que se produce la proteína de interés, se sabe que las células de hámster confieren a las proteínas que expresan unas unidades Gal α 1,3Gal, (Spiro RG *et al.*, J. Biol. Chem, 1984, vol. 259, n° 15, 9858 y Furukawa K. *et al.*, J. Biol. Chem, 1992, vol. 267, n° 12, 8012), cuya inmunogenicidad está demostrada.

65 Se ha establecido que el 1% de los linfocitos B que circulan en el ser humano produce unos anticuerpos dirigidos contra el epítipo Gal α 1,3Gal (Galili *et al.*, Blood, 1993, vol. 82, 2485). El epítipo y el anticuerpo forman entonces un

- 5 complejo que activa el complemento y que conducen a unas reacciones inmunitaria severas, tales como los rechazos agudos de injertos tras las xenotransplantaciones. Se ha demostrado que del 15 al 20% de los hemófilos tratados con la ayuda de un FVII producido en célula de hámster desarrollan una reacción inmunitaria (Prowse C.V *et al.*, Blood Reviews, 1998, vol. 12, 99). Este tipo de reacción inmunitaria es dramática en el caso de los hemofílicos, ya que los FVII y FVIII que se han vuelto inmunogénicos provocarán hemorragias muy difícilmente tratables.
- 10 Así, sigue siendo necesario obtener una composición de FVIIa recombinante o transgénica cuya inmunogenicidad se reduce, siendo al mismo tiempo lo más baja posible y, de manera preferente, viralmente segura.
- 15 Es por eso que la solicitante ha buscado elaborar una composición de FVII, de manera preferente viralmente segura, que presente una inmunogenicidad muy reducida.
- Así, la invención se refiere a una composición de factor VII recombinante o transgénico, presentando cada molécula de factor VII de la composición dos sitios de N-glicosilación, caracterizada por que entre todas las moléculas de FVII de la composición, el porcentaje de unidades de glicano Gal α 1, 3Gal está comprendido entre el 0 y el 4%, midiéndose el porcentaje de unidades de glicano Gal α 1, 3Gal por lectina-transferencia con revelación con 4-cloro-1-naftol, y
- 20 - por que todos los ácidos siálicos del factor VII implican enlaces α 2-6, y
- por que el factor VII de la composición se produce por conejas transgénicas.
- 25 La solicitante ha encontrado de manera sorprendente que tal porcentaje de unidades de glicano Gal α 1,3Gal en el FVII de la composición de la invención no es inmunogénico durante tratamientos de pacientes.
- 30 El FVII de la invención está en forma de una composición. En efecto, cualquier FVII, ya sea plasmático, recombinante o transgénico, se presenta en forma de una mezcla de varias proteínas de FVII, diferenciándose estas proteínas entre sí especialmente por no presentar las mismas modificaciones post-traduccionales. Esta maduración post-traducciona se efectúa por los organitos celulares durante la transferencia de la proteína de la proteína FVII entre los diferentes compartimientos celulares.
- 35 Estas modificaciones bioquímicas modifican profundamente la proteína, de tal manera que la proteína final es muy diferente de la molécula directamente codificada por el gen. Estas modificaciones químicas contribuyen a la regulación de la actividad de la proteína, así como a su localización. Así, para los fines de la invención, las expresiones "FVII" y "composición de FVII" son equivalentes.
- 40 Por "FVII recombinante o transgénico", se designa cualquier FVII procedente de la ingeniería genética y que presenta las características de modificaciones post-traduccionales, en particular de glicosilación enunciadas, es decir dos sitios de N-glicosilación con un porcentaje nulo to muy bajo de Gal α 1,3Gal en la composición de FVII, o también bastante baja para no ser inmunogénica. Por oposición, el FVII de la invención no es un FVII plasmático, es decir que no es un producto purificado a partir de plasma humano o animal.
- 45 Más particularmente, se designará por FVII activado cualquier FVII activado procedente de la ingeniería genética que presenta las características de modificaciones post-traduccionales anteriores, así como dos sitios de O-glicosilación con unidades de glicano definidas, una γ -carboxilación, y puentes disulfuros específicos.
- 50 La unidad Gal α 1,3Gal es una estructura compuesta de dos galactosas unidas en α 1,3. Está situado en el extremo de las antenas oligosacáridicas de las estructuras N-enlazadas. Esta unidad es conocida por su inmunogenicidad. En efecto, esta unidad de glicano está ausente en el hombre así como en algunos simios, ya que el gen que codifica la enzima que permite su síntesis (α 1,3galactosiltransferasa) se ha inactivado. Es por eso que la administración en el hombre de una proteína que presenta tal unidad provoca la aparición de anticuerpos dirigidos contra la proteína así glicosilada.
- 55 Es por lo tanto sumamente deseable no encontrar tal unidad inmunogénica en las proteínas farmacéuticas.
- Preferentemente, la composición se caracteriza por una ausencia de las unidades de glicano Gal α 1,3Gal en todas las moléculas de factor VII que están presentes.
- 60 Se entiende así designar un FVII cuyo porcentaje de estructuras Gal α 1,3Gal es nulo o tan bajo que no se puede distinguir del ruido de fondo obtenido por las mediciones realizadas por los aparatos de análisis actualmente disponibles, o cuyo porcentaje no es detectable en particular mediante un método de detección en lectina-transferencia con revelación con 4-cloro-1-naftol. Este método de cuantificación se ilustra en la parte "Ejemplos". Esta expresión designa de manera equivalente cualquier FVII recombinante o transgénico cuyo porcentaje de

Gal α 1,3Gal es próximo de el del FVII plasmático. En cualquier caso, el porcentaje de Gal α 1,3Gal de la composición de FVII de la invención no es inmunogénico para el hombre.

Por el contrario, un FVII recombinante disponible en el comercio presenta un porcentaje de Gal α 1,3Gal que es detectable, que puede por lo tanto distinguirse del ruido de fondo obtenido por los aparatos de análisis.

Así, según el método de cuantificación utilizado, la unidad Gal α 1,3Gal podrá estar o bien totalmente ausente, o bien presente a un porcentaje inferior al 4%, o también inferior al 3,5%, o también a un porcentaje inferior al 3%, pudiendo este porcentaje distinguirse del ruido de fondo. Ventajosamente, el porcentaje de unidad Gal α 1,3Gal está presente a un porcentaje idéntico o casi-idéntico al del FVII plasmático.

El FVII de la invención es un polipéptido cuya secuencia peptídica puede ser la del FVII humano natural, es decir la secuencia presente en los humanos que no presentan trastornos relacionados con el FVII. Tal secuencia puede codificarse, por ejemplo, por la secuencia 1b descrita en el documento EP 0 200 421.

Ventajosamente, la secuencia de FVII de la invención es la secuencia SEQ ID nº 1.

En otro modo de realización, el FVII de la invención puede ser una variante del FVII humano natural, en la medida en la que esta variante, no es más inmunogénica que el FVII natural. Así, la secuencia peptídica de esta variante puede poseer al menos un 70% de identidad, y de manera ventajosa al menos un 80% o un 90%, y de manera aún más ventajosa al menos un 99% de identidad con la secuencia del FVII humano natural, poseyendo tal variante esencialmente la misma actividad biológica que el FVII natural.

Por otro lado, el FVII de la invención designa también cualquier FVII cuya actividad biológica se ha modificado o reducido con respecto a la del FVII natural. A título de ejemplo, se puede citar el FVII humano recombinante inactivado FFR-FVIIa, utilizado para el tratamiento o la prevención de la trombosis (Holst *et al.*, Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., junio de 1998, 15(6): 515-520). Tales FVII son unos polipéptidos que poseen una secuencia en aminoácidos que difiere de la secuencia del FVII natural por la inserción, la delección o la sustitución de uno o varios aminoácidos.

Finalmente, en otro modo de realización, el FVII de la invención puede ser activado (FVIIa). El FVIIa presenta una actividad coagulante 25 a 100 veces superior a la del FVII cuando este último interactúa en lugar del primero con el factor tisular (FT). La activación del FVII resulta de la escisión del zimógeno por diferentes proteasas (FIXa, FXa, FVIIa) en dos cadenas reunidas por un puente disulfuro. El FVIIa es el factor de la coagulación responsable de la hemostasis en los hemofílicos que tienen unos anticuerpos circulantes por ejemplo. De manera particularmente ventajosa, el FVII de la invención se activa totalmente.

La FVIIa de la invención puede comprender varias modificaciones post-traduccionales: los nueve o diez primeros ácidos glutámicos N-terminales son γ -carboxilados, el Asp₆₃ está parcialmente hidroxilado, la Ser₅₂ y la Ser₆₀ son O-glicosilados y llevan respectivamente las unidades glucosa (xilosa)₀₋₂ y fucosa, el Asn₁₄₅ y el Asn₃₂₂ son N-glicosiladas mayoritariamente por unas estructuras complejas biantenarias monosialiladas.

La actividad biológica del FVII de la invención se puede cuantificar midiendo la capacidad de una composición de FVII para inducir la coagulación sanguínea mediante un plasma deficiente en FVII y en la tromboplastina, como se describe, por ejemplo, en la patente US 5,997,864. En el ensayo descrito en esta patente, la actividad biológica se expresa por una reducción del tiempo de coagulación con respecto a la muestra control, y se convierte en "unidades de FVII" por comparación con un estándar de suero humano (pool) que contiene 1 unidad/ml de actividad de FVII.

El FVII recombinante de la invención se puede obtener mediante unas técnicas estándar, bien conocidas por el experto en la materia, que permiten la expresión de una proteína en un sistema biológico.

El FVII de la invención se puede expresar en cualquier microorganismo, planta o animal que confiere las características de glicosilación enunciadas, es decir un porcentaje muy bajo o nulo de Gal α 1,3Gal en la composición de FVII. Por microorganismo, se entiende cualquier sistema bacteriano, fúngico, viral o celular, pudiendo las células ser unas células de plantas o de mamíferos. Las células de mamíferos pueden ser unas células animales o humanas. Puede tratarse también de cualquier célula KnockOut para α 1,3galactosiltransferasa.

El FVII de la invención puede también producirse en unos animales o unas plantas transgénicas, en la medida en la que estos animales o plantas confieren al FVII o a la composición de FVII, las características de glicosilación enunciadas, es decir una ausencia o un muy bajo porcentaje de Gal α 1,3Gal en la composición de FVII. Los animales pueden ser el conejo, el cerdo, el carnero, la cabra, el buey, la gallina, o cualquier animal KnockOut para α 1,3galactosiltransferasa, no siendo esta lista limitativa.

El FVII de la invención comprende, como el FVII humano, dos sitios de N-glicosilación, en posición 145 y 322, y 2 sitios de O-glicosilación, en posición 52 y 60. En un sitio de N-glicosilación, las cadenas de oligosacáridos se

enlazan a una asparagina (N-enlazadas). En un sitio de O-glicosilación, las cadenas de oligosacáridos se enlazan a una serina. Las unidades enlazadas sobre estos aminoácidos serán diferentes para cada proteína de la composición. Sin embargo, se puede cuantificar, para la totalidad de la composición, el porcentaje de cada unidad de glicano, o también de cada azúcar.

5 Los porcentajes de los diferentes glicanos dados en la presente solicitud no tienen en cuenta la O-glicosilación.

Preferentemente, la composición de FVII se caracteriza por que, entre todas las unidades de glicano de FVII de la composición, al menos un 40% son unas formas de glicano biantenarias, monosialiladas. En otro modo de realización, las formas monosialiladas están presentes a al menos un 50%. En otro modo de realización, las formas monosialiladas están presentes a al menos un 60%.

Ventajosamente, las formas de glicano biantenarias, monosialiladas de FVII son mayoritarias.

15 La composición de FVII se caracteriza por que al menos algunos de los ácidos siálicos del factor VII implican unos enlaces α 2-6.

Ventajosamente, al menos un 65% de los ácidos siálicos de FVII implican enlaces α 2,6. De manera muy ventajosa, al menos un 70%, incluso un 80% y, en particular, al menos un 90% de los ácidos siálicos de FVII implican enlaces α 2,6.

De manera particularmente preferida, todos los ácidos siálicos implican enlaces α 2,6, es decir que todos los ácidos siálicos están enlazados a la galactosa por un enlace α 2,6.

25 El hecho de que menos del 65% de los ácidos siálicos de FVII de la composición impliquen ramificaciones α 2,6 es una de las ventajas de FVII de la invención. En efecto, los ácidos siálicos de FVII recombinante disponible en el comercio implican únicamente enlaces α 2,3. Ahora bien, el FVII plasmático es una mezcla de estos dos isómeros. Sin embargo, este último comprende más enlaces α 2,6, lo que acerca aún más el FVII de la invención al FVII plasmático.

30 Según unos modos de realización de la invención, del 65% al 100% de los ácidos siálicos de FVII implican unos enlaces α 2,6. De manera más preferida, del 70% o del 80% al 100% de los ácidos siálicos de FVII implican unos enlaces α 2,6.

35 Ventajosamente, entre las formas de glicano biantenarias monosialiladas de FVII, las formas de glicano mayoritarias son no fucosiladas.

Preferentemente, estas formas de glicano biantenarias monosialiladas no fucosiladas están presentes en el FVII de la composición de la invención a un porcentaje superior al 20%. Ventajosamente, este porcentaje es superior al 25%, o también superior al 40%.

45 De manera particularmente ventajosa, el porcentaje de fucosilación de la composición de FVII de la invención está comprendido entre el 20% y el 50%. En un modo de realización de la invención, este porcentaje puede ser inferior al 15%.

Esta característica es una de las ventajas del FVII de la invención. En efecto, el FVII recombinante disponible en el comercio presenta un porcentaje de fucosilación del 100%, mientras que el FVII plasmático posee un porcentaje de fucosilación del 16% aproximadamente. Así, la fucosilación del FVII de la invención es parecida a la del FVII plasmático, lo que confiere una ventaja al FVII de la invención en términos de inmunogenicidad.

50 Ventajosamente, el FVII de la invención es un FVII transgénico. Así, el FVII de la invención es ventajosamente un FVII recombinante producido de manera transgénica.

55 En un modo de realización particular de la invención, el FVII transgénico de la invención se produce en la leche de un animal transgénico.

Tal producción de proteínas puede realizarse injertando el gen que codifica la proteína de interés sobre la región reguladora de uno de los genes de síntesis de proteínas de la leche que dirigirá ésta específicamente en la glándula mamaria y después su secreción en la leche.

60 De manera particularmente ventajosa, el FVII de la invención se produce por conejas transgénicas.

Esta especie es particularmente ventajosa ya que el conejo no parece sensible a los priones, especialmente a la encefalopatía esponjiforme subaguda transmisible, que constituye un problema de salud pública importante.

65

Además, la barrera de especie entre el conejo y el hombre es importante. Por el contrario, la barrera de especie entre el hombre y el hámster, que es el sistema biológico en el que está producido el FVII recombinante disponible en el comercio, es menos importante.

5 Así, la producción de FVII en el conejo es ventajosa en términos de seguridad en relación con la transmisión de agentes patógenos.

En un modo de realización preferido de la invención, el FVII de la invención se produce en las glándulas mamarias de conejas.

10 La secreción por las glándulas mamarias de la proteína de interés, que permite su secreción en la leche de mamífero transgénico, es una técnica bien conocida por el experto en la materia, que implica el control de la expresión de la proteína recombinante de manera tejido-dependiente.

15 El control tisular de la expresión se efectúa gracias a secuencias que permiten la expresión de la proteína hacia un tejido particular del animal. Estas secuencias son en particular las secuencias promotoras, así como las secuencias peptídicas señal.

20 Unos ejemplos de promotores que permiten la expresión de una proteína de interés en las glándulas mamarias son el promotor WAP (proteína ácida de suero), el promotor de la caseína, tal como el promotor de la β -caseína, el promotor de la β -lactoglobulina, no siendo limitativa esta lista.

25 Un método de producción de una proteína recombinante en la leche de un animal transgénico puede comprender las etapas siguientes: una molécula de ADN sintético que comprende un gen que codifica el FVII humano, estando este gen bajo el control de un promotor de una proteína segregada naturalmente en la leche, está integrada en un embrión de un mamífero no humano. El embrión se coloca después en una hembra de mamífero de la misma especie. Una vez que el mamífero procedente del embrión se ha desarrollado lo suficientemente, se induce a la lactancia del mamífero, después se recoge la leche. La leche contiene entonces el FVII transgénico de interés.

30 Un ejemplo de procedimiento de preparación de proteína en la leche de una hembra de mamífero diferente del hombre se da en el documento EP 0 527 063, cuya enseñanza puede recogerse para la producción de la proteína de interés de la invención, no siendo este ejemplo limitativo.

35 Un plásmido que contiene el promotor WAP se fabrica por introducción de una secuencia que comprende el promotor del gen WAP, realizándose este plásmido a fin de poder recibir un gen extraño dispuesto bajo la dependencia del promotor WAP. El gen que codifica el FVII humano está integrado, y colocado bajo la dependencia del promotor WAP. El plásmido que contiene el promotor y el gen que codifica la proteína de interés se utilizan para obtener unas conejas transgénicas, por microinyección en el pronúcleo masculino de embriones de conejos. Los embriones son después transferidos en el oviducto de hembras hormonalmente preparadas. La presencia de los transgenos se revela mediante la técnica de Southern a partir del ADN extraído de los gazapos transgénicos obtenidos. Las concentraciones en la leche de los animales se evalúan con la ayuda de ensayos radioinmunológicos específicos.

45 El FVII transgénico producido por la coneja en su leche se obtiene en forma de una composición en la que cada molécula de factor VII de la composición presenta dos sitios de N-glicosilación, caracterizado por que entre todas las moléculas de FVII de la composición, el porcentaje de unidades de glicano Gal α 1,3Gal es inferior al 4%, incluso nulo. Así, de manera ventajosa, el FVII transgénico producido por la coneja no posee unidad de glicano Gal α 1,3Gal.

50 Preferentemente, la composición de FVII transgénico de coneja de la invención se caracteriza por que, entre todas las unidades de glicano de la composición, al menos un 40% son unas formas de glicano biantenarias, monosialiladas. En otro modo de realización, las formas monosialiladas están presentes en al menos un 50%. En otro modo de realización, las formas monosialiladas están presentes en al menos un 60%.

Ventajosamente, las formas de glicano bianterinas, monosialiladas son mayoritarias.

55 La composición de FVII se caracteriza por que al menos algunos de los ácidos siálicos del factor VII implican unos enlaces α 2-6.

60 Ventajosamente, al menos un 65% de los ácidos siálicos del FVII implican enlaces α 2,6. De manera muy ventajosa, al menos un 70%, incluso un 80% y, en particular, al menos un 90% de los ácidos siálicos de FVII implican enlaces α 2,6.

65 De manera particularmente preferida, todos los ácidos siálicos implican enlaces α 2,6, es decir que todos los ácidos siálicos están unidos a la galactosa por un enlace α 2,6.

Preferentemente, entre las formas de glicano bianterinas, monosialiladas, las formas de glicano mayoritarias son no fucosiladas. Ventajosamente, estas formas de glicano bianterinas, monosialiladas no fucosiladas están presentes en el FVII de esta composición a un porcentaje superior al 20%. Ventajosamente, este porcentaje es superior al 25%, o también superior al 40%.

5 Preferentemente, el porcentaje de fucosilación del FVII de esta composición de la invención está comprendido entre el 20% y el 50%. En un modo de realización de la invención, este porcentaje puede ser inferior al 15%.

10 El FVIIa transgénico de la invención puede comprender varias modificaciones post-traduccionales: los nueve o diez primeros ácidos glutámicos N-terminales son γ -carboxilados, el Asp₆₃ (asparagina 63) está parcialmente hidroxilada, la Ser₅₂ (serina 52) y la Ser₆₀ (serina 60) son O-glicosiladas y llevan respectivamente las unidades glucosa(xilosa)₀₋₂ y fucosa, la Asn₁₄₅ y la Asn₃₂₂ son N-glicosiladas mayoritariamente por unas estructuras complejas bianterarias monosialiladas.

15 El FVII de la invención puede purificarse a partir de la leche por unas técnicas conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, un método de purificación de una proteína de interés a partir de la leche, tal como se describe en la patente US 6,268,487, puede comprender las etapas siguientes que consisten en: a) someter la leche a una filtración tangencial sobre una membrana de porosidad suficiente para formar un retenido y un permeado, conteniendo el permeado la proteína exógena, b) someter el permeado a un aparato de captura por cromatografía con el fin de desplazar la proteína exógena y obtener un efluente, c) combinar el efluente y el retenido, d) repetir las etapas a) a c) hasta que el FVII se separe de los lípidos, las micelas de caseínas, y se recupere el FVII en al menos un 75%.

25 Ventajosamente, el FVII de la invención se activa. El FVIIa resulta, *in vivo*, de la escisión del zimógeno por diferentes proteasas (FIXa, FXa, FVIIa) en dos cadenas reunidas por un puente disulfuro. El FVIIa solo tiene muy poca actividad enzimática, pero complejo con su cofactor, el factor tisular (FT), inicia el proceso de la coagulación activando el FX y el FIX.

30 El FVIIa de la invención está por lo tanto compuesto de una cadena ligera de 152 aminoácidos de peso molecular de aproximadamente 20 kDa y de una cadena pesada de 254 aminoácidos de peso molecular de aproximadamente 30 kDa enlazadas entre sí por un único puente disulfuro (Cys₁₃₅-Cys₂₆₂).

Así, el FVII de la invención es un FVII activado que posee una actividad y una estructura parecida al FVII plasmático.

35 El FVIIa presenta una actividad coagulante 25 a 100 veces superior a la del FVII cuando interactúan con el factor tisular (FT).

En un modo de realización de la invención, el FVII puede activarse *in vitro* por los factores Xa, VIIa, IIa, IXa y XIIa.

40 El FVII de la invención puede también activarse durante su procedimiento de purificación.

La solicitante ha constatado, de manera sorprendente, que el FVII, incluso colocado bajo el control de un promotor de una proteína naturalmente producida en el lactosuero, como el promotor WAP por ejemplo, es no obstante susceptible de encontrarse asociado a los iones calcio de la leche, y por lo tanto a las micelas de caseínas.

45 Así, será muy ventajoso elaborar un procedimiento de extracción y de purificación del FVII, susceptible de captar esta proteína, ya sea asociada a unos complejos del lactosuero o introducida en unas micelas de caseínas, presentando el FVII una afinidad para los iones calcio de la leche.

50 Por ejemplo, un procedimiento de extracción y de purificación del FVII transgénico, contenido en leche de un animal transgénico, comprende las etapas siguientes que consisten en:

55 a) extraer el FVII a partir de la leche, estando el factor VII enlazado a las sales y/o complejos orgánicos y/o inorgánicos de calcio de dicha leche, por la precipitación de compuesto de calcio obtenida por adición en la leche de una sal soluble, cuyo anión se selecciona por su aptitud a formar dichos compuestos de calcio insolubles para así liberar el factor VII de dichas sales y/o complejos, estando el factor VII presente en una fase líquida,

60 b) separar la fase líquida enriquecida en la proteína del precipitado de compuesto de calcio, estando dicha fase líquida además separada en una fase lipídica y una fase acuosa no lipídica que comprende la proteína,

c) someter la fase acuosa no lipídica a una etapa de cromatografía de afinidad, utilizando un tampón de elución a base de una sal de fosfato a una concentración predeterminada, y

65 d) someter el eluato de factor VII, obtenido según la etapa c) a dos o tres etapas de cromatografía sobre unas columnas intercambiadoras de aniones de tipo base débil utilizando unos tampones apropiados para unas eluciones sucesivas del factor VII retenido sobre dichas columnas.

La solicitante ha constatado de manera sorprendente que tal procedimiento hacía intervenir una etapa de extracción del FVII enlazado a las sales y/o complejos orgánicos y/o inorgánicos de calcio de dicha leche por precipitación de compuestos insolubles de calcio obtenidos por adición de una sal soluble en la leche, cuyo anión se selecciona por su capacidad para formar unos precipitados de compuestos de calcio, mientras que el FVII se libera de estas sales y/o complejos orgánicos y/o inorgánicos de calcio de dicha leche y se encuentra en solución en la fase líquida.

El FVII se enlaza a las sales y/o complejos orgánicos y/o inorgánicos de calcio de dicha leche, lo que significa que el FVII presenta una afinidad para estas sales y/o complejos de calcio. El FVII presenta por lo tanto un número suficiente de sitios de fijación de estas sales y/o complejos para enlazarse, total o parcialmente.

Las sales y/o complejos orgánicos y/o inorgánicos de calcio de leche representan las sales fosfocálcicas en interacción con las micelas coloidales de caseínas. Las diferentes caseínas forman un complejo micelar coloidal, que pueden alcanzar unos diámetros de aproximadamente 0,5 μm , con unas sales fosfocálcicas que se presentan por ejemplo en la forma de agregados ("clusters") de fosfato tricálcico, es decir $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Tales micelas se forman de subunidades de caseínas constituidas de una capa hidrófila rica en caseína-k que rodea un núcleo hidrófobo, enlazándose las sales fosfocálcicas por interacción electrostática sobre la capa hidrófila. Estas sales fosfocálcicas pueden también estar presentes en el volumen interno de la micela sin enlazarse a la caseína. Estas sales y/o complejos están también presentes en la leche en forma de fosfato monocalcico y/o de fosfato dicálcico, que están en equilibrio con las otras formas iónicas de calcio en función de las reacciones químicas y bioquímicas utilizadas. Estas sales y/o complejos de calcio pueden estar presentes en el volumen interno de la micela de caseína.

Tal afinidad de FVII para las sales y/o complejos orgánicos y/o inorgánicos de calcio puede resultar de las interacciones de la proteína no modificada o modificada *in vivo* o *in vitro* por ejemplo por unas modificaciones post-traduccionales.

En el ámbito del procedimiento de la invención, el FVII transgénico representa cualquier FVII transgénico que presenta unas características, especialmente de glicosilación, muy diversas. Puede tratarse ventajosamente de FVII de la invención, tal como se define anteriormente.

Se entiende por compuestos de calcio insoluble, unas sales o complejos de calcio cuya solubilidad en la leche es inferior al 0,5%.

El FVII se asocia mayoritariamente a las sales fosfocálcicas de las micelas de caseínas. El FVII presenta una fuerte afinidad para el calcio, cuya constante de afinidad es elevada, es decir que al menos un 70% hasta un 90% del FVII está atrapado en las micelas de caseína. El resto del FVII presenta una afinidad para las otras formas, las sales y/o complejos orgánicos y/o inorgánicos de calcio mencionados anteriormente.

Sin estar sujeto por cualquier interpretación de los mecanismos observados, la solicitante supone que la adición de la sal soluble desplaza el equilibrio de las sales fosfocálcicas de las micelas, provocando así su desestructuración y la precipitación de agregados de subunidades de caseínas. El FVII asociado a las sales fosfocálcicas atrapado en y/o sobre las micelas, está liberado en el medio durante esta desestructuración. Además, el FVII está entonces también liberado o disociado de las sales fosfocálcicas, ya que estas precipitan en forma de compuestos de calcio insolubles bajo el efecto de la sal soluble utilizada en el procedimiento de la invención. Asimismo, el FVII asociado a las sales y/o complejos orgánicos y/o inorgánicos de calcio solubles estaría también disociado, por el mismo tipo de reacción (véase la figura 9).

En el ámbito de la invención, la sal soluble representa cualquier sal que permite obtener el efecto deseado.

La sal soluble utilizada en el procedimiento de la invención puede estar presente en la leche a una concentración seleccionada por el experto en la materia para conseguir la separación de FVII a partir de las sales y/o complejos de calcio. En este sentido, se trata de una concentración suficiente para permitir la separación de al menos un 20%, o ventajosamente de al menos un 30% hasta un 50% del FVII. De manera particularmente ventajosa, se trata de una concentración suficiente para permitir la separación de al menos un 60% hasta un 80%, o de al menos un 90% del FVII.

El procedimiento de la invención permite la precipitación, especialmente de los agregados de subunidades de caseínas. Esta precipitación se debe a la desestructuración de las micelas de caseínas, como se ha indicado anteriormente. La realización del procedimiento de la invención desestabiliza, por la precipitación, el estado coloidal en el que se encuentra la leche.

El procedimiento de la invención es por lo tanto un procedimiento que permite el paso de la leche de un estado coloidal a un estado líquido, lo que corresponde a una extracción directa coloides/líquidos.

El procedimiento de la invención permite también obtener el lactosuero cuya coloración es más clara que la de la leche de partida. En efecto, son las caseínas que dan su color blanco a la leche. Una vez precipitadas, no pueden dar ya este color a la leche.

5 Por sal soluble según la invención se entiende una sal cuya solubilidad en la leche es de al menos 0,5 parte de sal por parte de leche (p/p).

Ventajosamente, la sal soluble, utilizada en el procedimiento, es una sal de fosfato. La sal puede estar en una solución acuosa que se añade después a la leche, o puede añadirse directamente a la leche en forma de polvo.

10 Preferentemente, la sal de fosfato se selecciona del grupo constituido por el fosfato de sodio, el fosfato de litio, el fosfato de potasio, el fosfato de rubidio y el fosfato de cesio, y es, en particular, el fosfato de sodio.

15 En una variante, la sal soluble utilizada para la realización del procedimiento de la invención puede ser un oxalato de un metal alcalino, en particular el oxalato de sodio o de potasio, o un carbonato de un metal alcalino, en particular el carbonato de sodio o de potasio, o su mezcla.

20 Ventajosamente, la concentración de la sal soluble en solución acuosa, que se prepara así para la realización del procedimiento, está comprendida entre 100 mM y 3 M, de manera más preferida, entre 200 mM y 500 mM y, en particular, entre 200 mM y 300 mM.

La leche en la que se encuentra el FVII a extraer puede ser una leche bruta no desnatada o leche desnatada. La ventaja de aplicar el procedimiento de la invención a leche desnatada reside en que contiene una cantidad más baja de lípidos. El procedimiento puede también aplicarse a leche fresca o congelada.

25 El procedimiento comprende una etapa b) de separación de la fase líquida en una fase lipídica y una fase acuosa no lipídica que comprende la proteína que se efectúa preferentemente por centrifugación. La fase acuosa no lipídica es en realidad el lactosuero. Esta etapa de separación permite también aislar los agregados de sub-unidades micelares de caseínas y el precipitado de compuestos de calcio.

30 El procedimiento puede además comprender, después de la etapa de separación, una etapa de filtración de la fase acuosa no lipídica efectuada sucesivamente sobre unos filtros de porosidad decreciente, preferentemente de 1 μm y después de 0,45 μm . La utilización de estos filtros, tales como a base de fibras de vidrio, permite reducir el contenido en lípidos, glóbulos grasos y de fosfolípidos naturalmente presentes en la leche. Una porosidad inferior a 0,5 μm de los filtros permite mantener la calidad bacteriológica de la fase acuosa no lipídica, así como de los soportes de purificación utilizados posteriormente (ultrafiltros, columna de cromatografía, etc.) (véase más adelante). La fase lipídica se filtra, preferentemente, a través de estos filtros que retienen así completamente los glóbulos lipídicos de la leche, y el filtrado está claro.

40 Puede estar seguida de una etapa de concentración/diálisis por ultrafiltración.

45 La concentración permite reducir el volumen de la fase acuosa no lipídica para su conservación. La membrana de ultrafiltración se selecciona por el experto en la materia en función de las características de la proteína de interés. De manera general, un umbral de corte cuyo tamaño de poros es inferior o igual al peso molecular del FVII permite concentrar el producto sin pérdida notable. Por ejemplo, una membrana de tamaño de poros a 50 kDa permite concentrar sin pérdida el FVII cuyo peso molecular es de 50 kDa.

50 La diálisis está destinada a condicionar la fase acuosa no lipídica que comprende el FVII para unas etapas posteriores de purificación, especialmente por cromatografía. Permite también eliminar los componentes de bajo tamaño molecular, como las lactosas, las sales, los péptidos, las proteosomas peptonas y cualquier agente que puede perjudicar a la conservación del producto. A este respecto, se utiliza preferiblemente una membrana que tiene un límite de retención de 50 kDa, de manera que el FVII no está filtrado a través de la membrana.

55 Preferentemente, el tampón de diálisis es una solución de fosfato de sodio 0,025 M-0,050 M, pH 7,5-8,5.

La fase acuosa no lipídica obtenida después de la etapa b) o, llegado el caso, tal como se obtiene después de las etapas de filtración y/o de concentración/diálisis, puede congelarse y almacenarse a una temperatura de -30°C a la espera de la realización de etapas posteriores de su purificación.

60 La fase acosa no lipídica obtenida según la etapa b) se somete después a una etapa c) de cromatografía de afinidad, utilizando unos dispositivos clásicos de cromatografía, ventajosamente realizada sobre una columna cromatográfica cuyo soporte es un gel de hidroxipatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$) o un gel de fluoroapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$). Así, el FVII de la fase acuosa se retiene el soporte, eliminándose la mayor parte de las proteínas lácticas no retenidas.

65

Se utiliza preferentemente una columna cromatográfica que se equilibra en tampón acuoso A a base de fosfato de sodio 0,025 M-0,035 M, pH 7,5-8,5. La fase acuosa enriquecida en FVII se inyecta sobre la columna, lo que permite la retención del FVII. La fracción no retenida se elimina por percolación del tampón A hasta volver a la línea de base (RLB), lo que asegura una buena eliminación de los compuestos indeseables, tales como las proteínas lácticas. La detección de los compuestos está asegurada por medición de la absorbancia a $\lambda = 280$ nm.

La elución del FVII según la etapa c) se efectúa por un tampón a base de una sal de fosfato, tal como el fosfato de sodio o de potasio, o su mezcla, a una concentración predeterminada, preferentemente que representa un tampón B a base de fosfato de sodio 0,25 M-0,35 M, pH 7,5-8,5. La fracción eluida se recoge hasta RLB. La detección se garantiza por medición de la absorbancia a $\lambda = 280$ nm.

Gracias a esta etapa, más del 90% del total de las proteínas lácticas se eliminan y más del 90% de las del FVII se recuperan. La pureza de esta fracción eluida de FVII es de aproximadamente un 5% en esta etapa.

La pureza se define como siendo la relación másica entre el FVII y las proteínas totales presentes en la muestra, la fracción o el eluato considerado.

Ventajosamente, la actividad específica del FVII está incrementada de un factor 10 a 25 debido a la afinidad de FVII al soporte cromatográfico.

El eluato de FVII obtenido al final de la etapa c) se somete después ventajosamente a una filtración tangencial.

La membrana de filtración tangencial se selecciona por el experto en la materia en función de las características del FVII. De manera general, un umbral de corte cuyo tamaño de poros es dos veces superior al peso molecular del FVII permite filtrarlo. En consecuencia, una membrana de tamaños de poros de 100 kDa permite filtrar el FVII con un buen rendimiento.

El objetivo de esta etapa de filtración es reducir la carga, especialmente en proteínas de peso molecular superior al del FVII y, en particular, eliminar las formas atípicas de FVII (por ejemplo FVII en forma polimerizada), así como proteasas susceptibles, con el fin de degradarlo. A este respecto, se utiliza muy ventajosamente una membrana de umbral de retención de compuestos de 100 kDa.

Ventajosamente, el eluato de FVII filtrado obtenido se concentra después y se dializa por ultrafiltración sobre membranas de umbral de retención de 50 kDa. El tampón de diálisis es preferentemente una solución de cloruro de sodio 0,15 M-0,20 M.

El eluato de FVII obtenido al final de la etapa c), eventualmente filtrado, concentrado y dializado, se somete después a dos o tres etapas de cromatografía (etapa d)) sobre unas columnas intercambiadoras de aniones de tipo base débil que utilizan unos tampones apropiados para unas eluciones sucesivas del factor VII retenido sobre dichas columnas. Estas etapas permiten una purificación suplementaria del FVII, especialmente frente a proteínas lácticas. Se realizan con unos dispositivos clásicos de cromatografía.

La primera etapa cromatográfica de intercambio de aniones se realiza ventajosamente gracias a un soporte cromatográfico de tipo gel Q-Sepharose[®] FF sobre el cual se retiene el factor VII, según las condiciones de realización preferenciales siguientes. Este soporte se lava mediante un tampón Tris 0,05 M, pH 7,0-7,5. La fracción no retenida se elimina por el tampón de lavado hasta volver a la línea de base. La elución de FVII se efectúa por un tampón acuoso a base de Tris 0,05 M y de cloruro de calcio 0,20 M-0,05 M, preferentemente 0,05 M, pH 7,0-8,0, a fin de obtener un primer eluato de factor VII. La detección de los compuestos se asegura por medición de la absorbancia a $\lambda = 280$ nm.

Por esta etapa, se recupera al menos un 70% del FVII y ésta permite una eliminación de aproximadamente un 80% de proteínas acompañantes.

El eluato de FVII puede después someterse a una etapa de diálisis, como se ha descrito anteriormente, cuyo tampón es una solución de cloruro de sodio 0,15-0,20 M.

La segunda etapa cromatográfica se realiza ventajosamente gracias a un soporte cromatográfico de tipo gel Q-Sepharose[®] FF sobre el cual se inyecta el primer eluato de FVII, obtenido por la primera etapa cromatográfica sobre intercambiador de aniones, según las condiciones de realización preferenciales siguientes. El soporte se lava por un tampón Tris 0,05 M, pH 7,0-7,5. La fracción no retenida se elimina por el tampón de lavado hasta volver a la línea de base. La detección se asegura por medición de la absorbancia a $\lambda = 280$ nm.

La elución del FVII, retenido sobre el soporte, se efectúa por un tampón acuoso a base de Tris 0,05 M y de cloruro de calcio 0,005 M, pH 7,0-8,0, para la obtención de un segundo eluato de factor VII de alta pureza, es decir de una pureza superior al 90%. La detección se asegura por medición de la absorbancia a $\lambda = 280$ nm.

La segunda etapa cromatográfica está destinada a limitar una eventual degradación proteolítica de la proteína.

5 En esta etapa, la pureza del eluato es de aproximadamente un 90%, y más del 95% de proteínas acompañantes que quedan se eliminan. Se puede someter después a una etapa de diálisis, como se ha descrito anteriormente, cuyo tampón es una solución de cloruro de sodio 0,15-0,20 M.

10 Según una realización muy preferida de la invención, el procedimiento comprende tres etapas de cromatografía sobre columnas intercambiadoras de aniones de tipo base débil utilizando unos tampones apropiados para unas eluciones sucesivas del factor VII a partir de dichas columnas. Se realiza de esta manera, después de las dos etapas cromatográficas de intercambio de aniones anteriores, una tercera etapa cromatográfica de intercambio de aniones. Esta etapa permite la formulación de la composición enriquecida en proteína, a fin de hacerla adecuada para una utilización médica.

15 La tercera etapa cromatográfica se lleva a cabo ventajosamente gracias a un soporte cromatográfico de tipo gel Q-Sepharose[®] FF sobre el cual se inyecta el segundo eluato de FVII, obtenido por la segunda etapa cromatográfica de sobre intercambiador de aniones, según las condiciones de realización preferidas siguientes.

20 El segundo eluato obtenido por la segunda etapa cromatográfica de intercambio de aniones se inyecta, preferentemente, después de la dilución por 1 a 5 volúmenes de agua purificada para inyección (PPI), sobre una columna llena de soporte de tipo gel Q-Sepharose[®] FF sobre el cual el factor VII está retenido. Este soporte se lava mediante un tampón Tris 0,05 M, pH 7,0-7,5. La fracción no retenida se elimina por el tampón de lavado hasta volver a la línea de base. La detección se asegura por medición de la absorbancia a $\lambda = 280$ nm.

25 La elución del FVII, retenido sobre el soporte, se efectúa mediante un tampón acuosa a base de Tris 0,02 M y de cloruro de sodio 0,20-0,30 M, preferentemente 0,28 M, pH 6,5-7,5. La detección se asegura por medición de la absorbancia a $\lambda = 280$ nm.

30 La composición de FVII transgénico así obtenida tiene una pureza superior al 95%. Muy ventajosamente, la composición se presenta en forma de un concentrado de FVII.

La realización del procedimiento conduce a un rendimiento acumulado del 20 al 25%, lo que permite purificar al menos 20 mg de FVV/litro de leche tratada.

35 En consecuencia, las tres etapas de cromatografías sobre gel intercambiador de aniones permiten purificar aún más el FVII. Además, permiten la concentración y la formulación de la composición de FVII.

40 La activación del FVII interviene durante el procedimiento, muy probablemente durante la primera etapa de cromatografía de intercambio de aniones.

Después de la recuperación del último eluato, éste puede someterse a una filtración sobre unos filtros de 0,22 μ m, de distribución en frascos y congelados a -30°C y conservados a esta temperatura.

45 El procedimiento de la invención puede comprender también al menos una de las etapas siguientes de formulación, inactivación viral y esterilización. De manera general, el procedimiento puede comprender, antes de la etapa de cromatografía de afinidad, una etapa de tratamiento anti-viral, que se efectúa ventajosamente por disolvente/detergente, en particular en presencia de una mezcla de Tween[®] 80 (1% p/v) y de TnBP (tri-n-butilfosfato) (0,3% v/v), lo que permite inactivar los virus recubiertos. Además, el eluato de FVII procedente de la segunda etapa cromatográfica sobre intercambiador de aniones se somete preferentemente sometido a una etapa de nanofiltración para una eliminación eficaz de los virus, en particular de los virus no recubiertos, tales como los parvovirus B19. Es posible utilizar unos filtros ASAHI PLANOVATM15 que permiten la retención de los virus que tienen un tamaño superior a 15 nm.

55 Otro objeto de la invención es la composición de FVII de la invención para una utilización como medicamento.

Otro objeto de la invención es la utilización de la composición de FVII según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de pacientes que padecen hemofilia.

60 Otro objeto de la invención es la utilización de la composición de FVII según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los traumatismos hemorrágicos múltiples.

Otro objeto de la invención es la utilización de la composición de FVII según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los sangrados masivos no controlables por una hemostasia quirúrgica.

Otro objeto de la invención es la utilización de la composición de FVII para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de las hemorragias que se deben a una sobredosis de anticoagulantes.

5 Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el factor VII según la invención y un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptables.

10 El excipiente puede ser cualquier solución, tal como una solución salina, fisiológica, isotónica o tamponada, así como cualquier suspensión, gel o polvo, compatible con un uso farmacéutico y conocido por el experto en la materia. Las composiciones según la invención pueden además contener uno o varios agentes o vehículos seleccionados entre los dispersantes, solubilizantes, estabilizantes, surfactantes y conservantes. Por otro lado, las composiciones según la invención pueden comprender otros agentes o principios activos.

15 Por otro lado, las composiciones pueden administrarse de diferentes maneras y en diferentes formas. La administración puede realizarse mediante cualquier vía clásica para este tipo de enfoque terapéutico, como especialmente por vía sistémica, en particular por inyección intravenosa, intradérmica, intratumoral, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular o intra-arterial. Se puede citar, por ejemplo, la inyección intratumoral o la inyección en una zona próxima del tumor o que irriga el tumor.

20 Las dosis pueden variar en función del número de administraciones, de la asociación con otros principios activos, de la fase de evolución de la patología, etc.

Otros aspectos y ventajas de la invención se describirán en los ejemplos siguientes, que deben considerarse como ilustrativos y que no limitan la extensión de la invención.

25 Abreviaturas para los ejemplos

FVII-tg = FVIIa-tg: FVII transgénico activado según la invención

30 FVII-rec = FVIIa-rec: FVII recombinante activado disponible en el comercio

FVII-pd = FVIIa-pd: FVII de origen plasmático activado, es decir purificado a partir de plasma humano.

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight

35 HPCE-LIF: High Performance Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence (Electroforesis capilar de alto rendimiento-fluorescencia inducida por láser)

ESI-MS: Espectrometría de masa-ionización «Electrospray».

40 LC-ESIMS: Cromatografía líquida – Espectrometría de masa-ionización «Electrospray»

NP-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase normal

45 PNGase F: Péptido: N-glicosidasa F

LC-MS: Cromatografía líquida – espectrometría de masa

Descripción de las figuras

50 Figura 1: esquema de un ejemplo del procedimiento de extracción y de purificación/activación del FVII transgénico según la invención producido en la leche de coneja.

Figura 2: Espectros de masas ESI desconvolucionados de los péptidos portadores de los sitios de N-glicosilación.

55 Figura 3: Electroferogramas HPCE-LIF después de la desglicosilación del FVII por la PNGase F;

Leyenda: Los dos electroferogramas del medio: FVII-tg; (<) fucosa, (■) GlcNAc, (●) manosa, (●) galactosa, (▲) ácido siálico. Electroferograma de arriba: FVII-pd Electroferograma del medio (2): FVII-tg Electroferograma de abajo: FVII-rec

60 Figura 4: Caracterización del FVII-tg (cromatograma de medio) por NP-HPLC, de FVII-pd (cromatograma de arriba) y del FVII-rec (cromatograma de abajo).

Leyenda: igual que en la figura 3.

65

Figura 5: Identificación de las formas de glicano mayoritarias del FVII-tg por MALDI-TOFMS. Leyenda de los restos de azúcar: igual que en la figura 3

5 Figura 6: Análisis en HPCE-LIF de los oligosacáridos de la tiroglobulina. Leyenda de los restos de azúcar: igual que en la figura 3

Figura 7: Análisis en HPCE-LIF de los oligosacáridos du FVII transgénico. Leyenda: igual que en la figura 3

10 Figura 8: Cuantificación de las estructuras Gal α 1,3Gal.

Figura 9: Ejemplo de un mecanismo de extracción del FVII

15 Figura 10: Espectros de masas ESI desconvolucionados de los péptidos portadores de los sitios de O-glicosilación. Estos péptidos se obtuvieron después de la digestión con tripsina y análisis por LC-ESIMS. Fuc: fucosa, Glc: glucosa, Xyl: xylosa.

20 Figura 11. Espectros de masas ESI desconvolucionados de los péptidos portadores de los sitios de γ -carboxilación. Estos péptidos se obtuvieron después de la digestión con Asp-N y análisis por LC-ESIMS. Los resultados obtenidos para los diferentes lotes de FVII-tg son muy similares. Las masas de los diferentes péptidos son unas masas monoisotópicas. Gla: ácido γ -carboxílico.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de conejas transgénicas que producen una proteína de FVII humano en su leche

25 Se prepara en primer lugar un plásmido p1 introduciendo la secuencia Bam H1-Hind III (fragmento 6,3 Kb) del gen WAP (descrita en el documento Devinoy *et al.*, Nucleic Acids Research, vol. 16, no. 16, 25 de agosto de 1988, p. 8180) en el polylinker del vector p-poli III-I (descrito en el documento Lathe *et al.*, Gene (1987) 57, 193-201), entre las secuencias Bam H1 y Hind III.

30 Durante esta clonación, se ha suprimido el sitio Bam H1 y sustituido por el sitio Cla I que aparecerá en el vector p1. El vector p1 es por lo tanto un plásmido capaz de recibir un gen extraño colocado bajo la dependencia del promotor WAP 6,3 Kb. La introducción del gen extraño puede llevarse a cabo por ejemplo en el sitio Sal I del polylinker. Los injertos que contienen la totalidad del promotor y de los genes extraños pueden aislarse del plásmido después de un corte en los dos sitios Not 1 que están en los extremos del polylinker del plásmido p-poly III-I.

35 El plásmido p2, obtenido a partir del plásmido p1, contiene el promotor del gen de la WAP de conejo (6,3 Kb) y el gen del FVII humano. El fragmento utilizado para obtener las conejas transgénicas está comprendido entre los dos sitios Not1.

40 Un sitio Hind III se ha introducido en la secuencia de cabeza del gen (líder) por mutagénesis para servir de sitio de clonación.

45 Las conejas transgénicas se obtuvieron mediante la técnica clásica de microinyección (Brinster *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 4438-4442). Se inyectaron 1-2 pl que contienen 500 copias del gen en el pronúcleo masculino de embriones de ratones. Las construcciones se realizaron en el vector p-poli III-I (Lathe *et al.*, Gene (1987) 57, 193-201). Los fragmentos Not 1 - Not 1 de este vector que contiene los genes recombinados se microinyectaron. Los embriones se transfirieron después en el oviducto de hembras adoptivas hormonalmente preparadas. Aproximadamente un 10% de los embriones manipulados han dado nacimiento a gazapos y un 2-5% de los embriones manipulados a gazapos transgénicos. La presencia de los transgenes se reveló mediante la técnica de transferencia de Southern a partir del ADN extraído de las colas de conejos. Las concentraciones de FVII en la sangre y en la leche de los animales se evaluaron con la ayuda de ensayos radioinmunológicos específicos.

50 La actividad biológica del FVII se ha evaluado añadiendo leche al medio de cultivo de células o de explantes mamarios de conejo.

La técnica utilizada para la obtención de conejas transgénicas que producen en su leche el FVII de la invención se describe más en detalle en el documento EP 0 527 063.

60 Ejemplo 2: Extracción y purificación del FVII obtenido

a) Extracción del FVII

65 Se cinsideran 500 ml de leche bruto no desnatado que son diluidos por 9 volúmenes de tampón fosfato de sodio 0,25 M, pH 8,2. Después de 30 minutos de agitación a temperatura ambiente, la fase acuosa enriquecida en FVII se

centrifuga a 10 000g durante 1 hora a 15°C (centrifugadora Sorvall Evolution RC – 6700 rpm - rotor SLC-6000). 6 recipientes de aproximadamente 835 ml son necesarios.

5 Después de la centrifugación, tres fases están presentes: una fase lipídica en superficie (nata), una fase acuosa no lipídica clara enriquecida en FVII (fase mayoritaria) y una fase blanca sólida de residuo (precipitados de caseínas no solubles y de compuestos de calcio).

10 La fase acuosa no lipídica que comprende el FVII se recoge con bomba peristáltica hasta la fase cremosa. La fase cremosa se recoge aparte. La fase sólida (precipitado) se elimina.

15 La fase acuosa no lipídica, que comprende no obstante todavía muy bajas cantidades de lípidos, se filtra sobre una secuencia de filtros (Pall SLK7002U010ZP – prefiltro de fibras de vidrio de tamaño de poros de 1 µm – después Pall SLK7002NXP - Nylon 66 de tamaño de poros de 0,45 µm). Al final de la filtración, la fase lipídica se pasa sobre esta secuencia de filtración que retiene completamente los glóbulos lipídicos de la leche, y el filtrado es claro.

20 La fase acuosa no lipídica filtrada se dializa después sobre membrana de ultrafiltración (Millipore Biomax 50 kDa - 0,1 m²) para hacerla compatible con la fase de cromatografía. El FVII de peso molecular de aproximadamente 50 kDa no filtra a través de la membrana, al contrario de las sales, azúcares y péptidos de la leche. En un primer tiempo, la solución (aproximadamente 5 000 ml) se concentra a 500 ml, después una diálisis por ultrafiltración manteniendo el volumen constante permite eliminar los electrolitos y acondicionar la materia biológica para la etapa de cromatografía. El tampón de diálisis es un tampón fosfato de sodio 0,025M, pH 8,2.

25 Se puede asimilar esta fase acuosa no lipídica que comprende el FVII de lactosuero enriquecido en FVII-tg. Esta preparación se almacena a -30°C antes de proseguir el procedimiento.

El rendimiento global de recuperación del FVII por esta etapa es muy satisfactorio: 90% (91% de extracción con fosfato + 99% diálisis/concentración).

30 La fase acuosa no lipídica que comprende el FVII al final de esta etapa es perfectamente límpida y es compatible con las etapas cromatográficas siguientes.

Aproximadamente se extraen en esta etapa 93 000 UI de FVII-tg. La pureza en FVII de esta preparación es del orden del 0,2%.

35 b) Purificación del FVII

1. Cromatografía sur gel de hidroxiapatita

40 Una columna Amicon 90 (9 cm de diámetro - 64 cm² de sección) se llena con un gel BioRad Ceramic Hydroxyapatite tipo I (CHT-I).

45 El gel se equilibra en tampón acuoso A constituido de una mezcla de fosfato de sodio 0,025 M y de cloruro de sodio 0,04 M, pH 8,0. La totalidad de la preparación conservada a -30°C se descongela en baño maría a 37°C hasta disolución completa del hielo y después se inyecta sobre el gel (caudal lineal 100 cm/h, es decir 105 ml/min). La fracción no retenida se elimina por paso de un tampón constituido de fosfato de sodio 0,025 M y de cloruro de sodio 0,04 M, pH 8,2, hasta volver a la línea de base (RLB).

50 La elución de la fracción que contiene el FVII-tg se lleva a cabo mediante el tampón B constituido de fosfato de sodio 0,25 M y de cloruro de sodio 0,4 M, pH 8,0. La fracción eluida se recoge hasta volver a la línea de base. La detección de los compuestos está asegurada por medición de la absorbancia a $\lambda=280$ nm.

55 Esta cromatografía permite recuperar más del 90% del FVII-tg, eliminando al mismo tiempo más del 95% de las proteínas lácticas. La actividad específica (A.S.) se multiplica por 25. Aproximadamente 85 000 UI de FVII-tg de pureza del 4% están disponibles en esta etapa.

2. Filtración tangencial 100 kDa y concentración/diálisis 50 kDa

60 La totalidad del eluato de la etapa anterior se filtra en modo tangencial sobre una membrana de ultrafiltración 100 kDa (Pall OMEGA SC 100K - 0,1 m²). El FVII se filtra a través de la membrana 100 kDa, mientras que las proteínas de peso molecular superior a 100 kDa no son filtrables.

La fracción filtrada se concentra después a aproximadamente 500 ml, después se dializa sobre el ultrafiltro 50 kDa ya descrito anteriormente. El tampón de diálisis es el cloruro de sodio 0,15 M.

65 En esta etapa del procedimiento, el producto se almacena a -30°C antes del paso en cromatografía de intercambio de iones.

Esta etapa ha permitido reducir la carga en proteínas de peso molecular superior a 100 kDa y en particular de las pro-enzimas. El tratamiento membranario 100 kDa permite retener aproximadamente el 50% de las proteínas de alto peso molecular, filtrando al mismo tiempo el 95% del FVII-tg, es decir 82 000 UI de FVII-tg.

- 5 Este tratamiento permite reducir los riesgos de hidrólisis proteolítica durante etapas aguas abajo.
3. Cromatografías sobre gel Q-Sepharose® FF
- 10 Estas tres cromatografías sucesivas sobre gel intercambiador de iones Q-Sepharose® Fast Flow (QSFF) se realizan para purificar el principio activo, permitir la activación del FVII en FVII activado (FVIIa) y finalmente concentrar y formular la composición en FVII. La detección de los compuestos se asegura por medición de la absorbancia a $\lambda=280$ nm.
- 15 3.1 Etapa Q-Sepharose® FF 1 – elución “High Calcium”
- Se llena una columna de 2,6 cm de diámetro (5,3 cm² de sección) de 100 ml de gel Q-Sepharose® FF (GE Healthcare).
- 20 El gel se equilibra en tampón Tris 0,05 M, pH 7,5.
- La totalidad de la fracción conservada a -30°C se descongela en baño maría a 37°C hasta disolución completa del hielo. La fracción se diluye al ½ [v/v] con el tampón de equilibrado antes de la inyección sobre el gel (caudal 13 ml/min, es decir caudal lineal de 150 cm/h), después la fracción no retenida se elimina por paso del tampón hasta
- 25 RLB.
- Una primera fracción proteica de bajo contenido en FVII se eluye a 9 ml/min (es decir 100 cm/h) por un tampón de Tris 0,05 M y cloruro de sodio 0,15 M, pH 7,5, y después se elimina.
- 30 Una segunda fracción proteica rica en FVII se eluye a 9 ml/min (es decir 100 cm/h) por un tampón de Tris 0,05 M, de cloruro de sodio 0,05 M y de cloruro de calcio 0,05 M, pH 7,5.
- Esta segunda fracción se dializa sobre el ultrafiltro 50 kDa ya descrito anteriormente. El tampón de diálisis es el cloruro de sodio 0,15 M. Esta fracción se conserva a +4°C durante una noche antes del 2º paso en cromatografía de intercambios de aniones.
- 35 Esta etapa permite recuperar un 73% del FVII (es decir 60000 UI de FVII-tg), eliminando al mismo tiempo un 80% de las proteínas acompañantes. Permite también la activación del FVII en FVIIa.
- 40 3.2 Etapa Q-Sepharose® FF 2 – elución “Low Calcium”
- Se llena una columna de 2,5 cm de diámetro (4,9 cm² de sección) de 30 ml de gel Q-Sepharose® FF (GE Healthcare).
- 45 El gel se equilibra en tampón Tris 0,05 M, pH 7,5.
- La fracción eluida anterior (segunda fracción), conservada a +4°C, se diluye antes de la inyección sobre el gel (caudal 9 ml/min, es decir un caudal lineal de 100 cm/h).
- 50 Después de la inyección, el gel se lava por el tampón de equilibrado para la eliminación de la fracción no retenida.
- Una fracción que contiene FVII de muy alta pureza se eluye a 4,5 ml/min (es decir 50 cm/h) en tampón de Tris 0,05 M, de cloruro de sodio 0,05 M y de cloruro de calcio 0,005 M, pH 7,5.
- 55 Aproximadamente 23 000 UI de FVII-tg se purificaron, es decir 12 mg de FVII-tg.
- Esta etapa permite eliminar más del 95% de las proteínas acompañantes (proteínas de leche de coneja).
- Este eluato, de pureza superior al 90%, presenta unas características estructurales y funcionales de las moléculas naturales del FVII humano. Se concentra y formula por el tercer paso en cromatografía de intercambios de iones.
- 60 3.3 Etapa Q-Sepharose® FF 3 – elución “Sodio”
- Se llena una columna de 2,5 cm de diámetro (4,9 cm² de sección) de 10 ml de gel Q-Sepharose® FF (GE Healthcare).
- 65

El gel se equilibra en tampón Tris 0,05 M, pH 7,5.

La fracción eluida purificada de la etapa anterior se diluye cinco veces con agua purificada para inyección (PPI) antes de la inyección sobre el gel (caudal 4,5 ml/min, es decir un caudal lineal de 50 cm/h).

Después de la inyección, el gel se lava mediante el tampón de equilibrado para la eliminación de la fracción no retenida.

El FVII-tg se eluye después a un caudal de 3 ml/min (es decir 36 cm/h) por el tampón de Tris 0,02 M y de cloruro de sodio 0,28 M, pH 7,0.

Se ha preparado una composición de FVII-tg en forma de concentrado, cuya pureza es superior al 95%. El producto es compatible con una inyección por vía intravenosa. El procedimiento tiene un rendimiento acumulado del 22%, lo que permite purificar al menos 20 mg de FVII por litro de leche utilizado.

El FVII-tg de la composición se somete después a diferentes análisis estructurales, tales como se desarrollan en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 3: Estudio de la secuencia primaria

1. Mapa peptídico

Se obtuvieron los cromatogramas LC-MS y detección UV después de la digestión con tripsina y Asp-N de las muestras FVII-pd, FVII-rec y FVII-tg, según realizaciones conocidas por el experto en la materia, se obtuvieron (datos no mostrados). El análisis de los mapas peptídicos obtenido después de la digestión con tripsina muestran que son parecidos para unos tiempos de retención inferiores a 65 min. Más allá, se observan unas especies que corresponden a unos fragmentos peptídicos de la cadena pesada en el FVII-rec y el FVII-tg y no en el FVII-pd. Estos péptidos que tienen unas masas elevadas (4500 Da a 8000 Da) corresponden a unas escisiones perdidas. Estos péptidos se observaron para otros lotes de FVII-pd, su presencia no puede estar por lo tanto relacionada con una susceptibilidad a la tripsina diferente.

Los mapas peptídicos obtenidos después de la digestión con Asp-N son muy similares de un FVII al otro y eso en todo el intervalo de tiempo de retención. Las diferencias de intensidad observadas se deben solo a variaciones de cantidades inyectadas y no deben relacionarse con diferencias estructurales.

2. Cobertura de secuencia

Los recubrimientos de secuencia se calculan a partir de los péptidos identificados por MS y/o MS/MS. LA tabla 1 agrupa los resultados obtenidos para las diferentes muestras. Considerando las digestiones por la tripsina y Asp-N, más del 95% de la secuencia primaria ha podido verificarse, los resultados obtenidos son conformes con los descritos en la bibliografía (Thim L. *et al.*, Biochemistry, 1988, 27, 7785-7793).

Tabla 1. Recubrimientos de secuencia obtenidos por LC-ESIMS(/MS) para las diferentes muestras analizadas.

	Recubrimiento tripsina (%)	Recubrimiento Asp-N (%)	Recubrimiento global (%)
FVII-pd	79,3	97,3	97,3
FVII-rec	97,5	95,8	100,0
FVII-tg	-	97,0	97,0
FVII-tg	96,6	91,1	100,0
FVII-tg	95,3	91,1	99,0

A fin de confirmar la identidad de los péptidos, se han analizado las fracciones HPLC por MALDI y por secuenciación de Edman.

El conjunto de las fracciones HPLC analizadas por secuenciación de Edman permite obtener un recubrimiento de secuencia del 80%. Las verificaciones de secuencia, realizadas sobre los FVII-tg y FVII-rec en LC-MS, dan unas coberturas de secuencia primaria > 95%.

Ejemplo 4: Caracterización de los sitios de glicosilación y de los glicopéptidos por ESI-MS

Los sitios de N-glicosilación del FVII-tg se identificaron por LC-ESIMS(/MS), confirmados por MALDI-TOFMS, y la microheterogeneidad se ha determinado por LC-ESIMS.

La figura 2 representa los espectros ESI desconvolucionados de los glicopéptidos que contienen los dos restos Asn glicosilados. La localización de los sitios de glicosilación se ha confirmado por MALDI-TOF(/TOF) así como por secuenciación de Edman.

5 El análisis de los espectros de masa de los glicopéptidos [D₁₂₃-R₁₅₂] y [K_{31.6}-R₃₅₃] del FVII plasmático (FVII-pd), que poseen respectivamente los sitios de N-glicosilación Asn₁₄₅ y Asn₃₂₂, revela la presencia de estructuras biantenarias, bisialiladas, no fucosiladas (A2) (masa observada del glicopéptido: 5563,8 Da) y fucosiladas (A2F) (masa obs: 5709,8 Da). Se observa también la presencia de oligosacáridos triantenarios, trisialilados no fucosilados (A3) (masa obs. 6220,0 Da) y fucosilados (A3F) (masa obs. 6366,1 Da). Para el FVII transgénico (FVII-tg), los oligosacáridos
10 situados en Asn₁₄₅ son mayoritariamente de tipo biantenarios, monosialilados no fucosilados o fucosilados (A1, A1F) y A2, A2F. Las formas triantenarios están poco representadas.

En lo que se refiere a las glicofomas mayoritarias de Asn₃₂₂, se observan las mismas estructuras de glicano en proporciones diferentes. La figura 2 revela la presencia de formas menos maduras (menos antenarias y sialiladas) que en el Asn₁₄₅. Por ejemplo, las estructuras triantenarios están menos representadas en Asn₃₂₂ que en Asn₁₄₅ para el producto plasmático y ausentes en el FVII-tg. Cabe señalar también que los Asn 145 y 322 son glicosilados al 100%. A pesar de que semi-cuantitativos, estos resultados están en acuerdo con los datos cuantitativos obtenidos por HPCE-LIF y NP-HPLC.

20 **Ejemplo 5: Cuantificación de los N-glicanos por HPCE-LIF**

La identificación y la cuantificación de los oligosacáridos N-unidos se realizan por HPCE-LIF después de la desglicosilación por la PNGasa F. Las muestras de FVII se tratan por unas exoglicosidasas (sialidasa (proporción ENZIMA/SUSTRATO 1 mUI/10 µg), galactosidasa, hexnacasa (kit Prozyme), fucosidasa (proporción E/S: 1 mUI/10 µg) a fin de asegurarse la identificación y la cuantificación de cada estructura aislada. Los glicanos obtenidos se marcan con un fluorocromo y se separan en función de su masa y de su carga. Dos estándares (homopolímeros de glucoo, oligosacáridicos) permiten identificar las estructuras. La cuantificación se lleva a cabo por la integración de cada pico llevado, en porcentaje, al conjunto de los oligosacáridos cuantificados.

30 Se utiliza un equipo de electroforesis capilar ProteomeLab PA800 (Beckman Coulter) cuyo capilar está «tapizado» N-CHO (Beckman-Coulter) de 50 cm x 50 µm de diámetro interno. Se utiliza un tampón de separación «gel buffer-N» (Beckman-Coulter). La migración se efectúa por la aplicación de una tensión de 25 kV, durante 20 min, a 20°C. La detección tiene lugar por láser a λ_{excitación} 488nm y λ_{emisión} 520 nm.

35 El porcentaje de fucosilación se calcula, después de la desglicosilación simultánea por las sialidasa, galactosidasa y hexnacasa, con la relación entre las superficies de los picos que corresponden al “núcleo” y “núcleo” fucosilado.

Los glicanos del FVIIa-pd son mayoritariamente de tipo biantenarios bisialilados (A2), y biantenarios bisialilados fucosilados (A2F). Los perfiles de glicanos (véase la figura 3) de los FVII-tg revelan la presencia de estructuras biantenarios, monosialiladas, fucosiladas o no (A1F, A1), y biantenarios, bisialiladas, fucosiladas o no (A2, A2F). El perfil del FVII-rec revela unos tiempos de migración atípica para las diferentes estructuras (A1F, A2F) observadas.

Tabla 2. Recapitulativo del porcentaje de las estructuras sialiladas procedentes de las muestras nativas (no desialiladas) y las procedentes de las muestras desialiladas de los diferentes lotes de FVII: FVII-tg y FVII-pd

45

Porcentajes	FVII-pd	FVII-tg Lote A	FVII-tg Lote B
<i>Nativo</i>			
A2	41,9	19,3	13,9
A2F	8,9	14,8	21,5
A1	2,6	38,4	25,2
A1F	-	11,7	22,2
Total A2+A2F	50,8	34,1	35,4
Total A1+A1F	2,6	50,1	47,4
<i>Desialilado</i>			
G2	44,5	57,5	37,2
G2F	8,9	18	38,1
G3	25	4,6	3,0
G3F	5,1	1,3	3,0
Otras especies no fucosiladas	12,6	2,9	3,0
Otras especies fucosiladas	2,2	3,6	7,5 *
G2FB	-	-	-

*especie bifucosilada

G2F, G2: estructuras biantenarios, bigalactosiladas, fucosiladas o no fucosiladas

G2FB: estructuras biantenarios, bigalactosiladas, fucosiladas y bisectadas

El análisis cuantitativo de las diferentes estructuras de glicano (Tabla 2) muestra que para el FVII-pd, la predominancia de estructuras sialiladas con aproximadamente un 51% de glicanos bisialiladas (A2 y A2F) y un 30% de formas triantenarias, sialiladas no fucosiladas o fucosiladas (G3 y G3F). El FVII-tg (lotes A y B) está menos sialilado que el FVII-pd con un 35% de formas biantenarias bisialiladas y sólo un 6% de formas triantenarias sialiladas. Las formas mayoritarias son monosialiladas con un 50% de estructuras A1 y A1F. El FVII-rec está también menos sialilado que el FVII-pd con un 45% de estructuras A2F y sólo un 6% de glicanos triantenarios sialilados (resultados no mostrados).

Cabe señalar para el FVII-rec el bajo porcentaje de estructuras no fucosiladas.

Tabla 3. Porcentaje de fucosilación de los diferentes FVII

	FVII-pd	FVII-tg Lote A	FVII-tg Lote B	FVII-rec
Porcentaje de fucosilación(%)	16,2	23,6	41,8	100

El análisis cuantitativo muestra un bajo porcentaje de fucosilación del FVII-pd (16%), un porcentaje de fucosilación del 24 al 42% para el FVII-tg y una fucosilación del 100% para el FVII-rec.

Ejemplo 6: Cuantificación de los N-glicanos por NP-HPLC

Los análisis cualitativo y cuantitativo de la N-glicosilación de los FVII-pd y FVII-tg se ha estudiado por NP-HPLC. Después del desalado y secado de la proteína, ésta se desnaturaliza y se reduce según unas realizaciones conocidas por el experto en la materia. Los glicanos se liberan después por vía enzimática (endoglicosidasa PNGase F), y purificados por precipitación con etanol. Los glicanos así obtenidos se marcan con la ayuda de un fluoróforo, la 2-aminobenzamida (2-AB). Los glicanos marcados se separan en función de su hidrofilia por cromatografía HPLC en fase normal sobre columna Amide-80, 4,6 x 250 mm (Tosohaas) termostaticada a 30°C. Antes de la inyección de la muestra, la columna se equilibra en tampón al 80% acetonitrilo. Los oligosacáridos se eluyen por un gradiente creciente de formiato de amonio 50 mM, pH 4,45, durante unos tiempos superiores o iguales a 140 minutos. La detección se realiza por fluorimetría a $\lambda_{excitación}$ a 330nm y $\lambda_{emisión}$ a 420nm.

El perfil cromatográfico (figura 4) de FVII-pd muestra que los glicanos mayoritarios son de tipo biantenarios, bisialilados (A2) con un porcentaje al 39%. Se observa también en más baja cantidad unas formas biantenarias, bisialiladas, fucosiladas (A2F), monosialiladas (A1) y trisialiladas fucosiladas y no fucosiladas (A3F y A3).

El análisis por NP-HPLC realizado sobre el FVII-tg confirma la presencia de oligosacáridos mayoritariamente de tipo A1, a un porcentaje del 27%. Las estructuras A1F, A2 y A2F están menos representadas y las formas triantenarias están presentes al estado de trazas. Esto pone en evidencia una diferencia de sialilación entre el FVII-pd y el factor FVII-tg, menos sialilado.

Ejemplo 7: Identificación por MALDI-TOFMS

La espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry) es una técnica que permite medir la masa molecular de los péptidos, proteínas, glicanos, oligonucleótidos, y la mayoría de los polímeros ionizables con una gran precisión.

Los péptidos, proteínas y glicanos a analizar se mezclan con una matriz que absorba a la longitud de onda del láser utilizado. Las principales matrices son el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) para el análisis de los péptidos, el ácido sinapínico (SA) para las proteínas y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) para los oligosacáridos.

El método consiste en irradiar los co-cristales matriz/analito con la ayuda de un láser pulsado, esto provoca la desorción conjunta de las moléculas de matriz y de analito. Después de la ionización en fase gaseosa, las moléculas de analito atraviesan un detector de tiempo de vuelo. Como las masas y tiempos de vuelo están directamente relacionados, la medición de este último permite la determinación de la masa del analito diana. La identificación se realiza por medición de la masa observada, por comparación con la masa teórica. La secuenciación se puede llevar a cabo en un modo MS/MS en base a iones fragmentos obtenidos. El instrumento utilizado es un Bruker Autoflex 2 que funciona en los modos TOF y TOF/TOF.

Con el fin de identificar las estructuras de glicano presentes en el FVII-tg, se realizaron unos análisis MALDI-TOF MS a partir de fracciones procedentes de NP-HPLC preparativa (figura 5).

El análisis MALDI-TOF del FVII-tg ha permitido confirmar la identificación de los glicanos separados por NP-HPLC, a saber unas estructuras mayoritariamente monosialiladas A1 y unas formas minoritarias de tipo A1F, A2F y A2.

Este estudio ha permitido identificar también las formas minoritarias de tipo triantenarias bisialiladas y trisialiladas, de las formas híbridas y oligomanosas de tipo Man5 y Man6-P-HexNAc.

Con el fin de identificar otras estructuras de glicano, se ha llevado a cabo un análisis por MALDI-TOF MS del factor FVII-tg después de la desialilación.

5 Se observa después de la desialilación dos formas mayoritarias G2 y G2F presentes respectivamente a unos porcentajes del 35% y del 28% (cuantificación NP-HPLC). Estos resultados están en acuerdo con la identificación de las estructuras del producto "nativo".

10 Las otras formas identificadas son cuantitativamente minoritarias y esencialmente de tipo oligomanosa, Man6-P-HexNAc y Man7-P-HexNAc, y de tipo híbrido. Se nota la presencia de formas bifucosiladas.

10 Ejemplo 8: Análisis HPCE-LIF de la unión de los ácidos siálicos - galactosa

15 En referencia al estudio de la unión ácido siálico-galactosa ("branching"), el procedimiento experimental es similar al desarrollado en el Ejemplo 5. Después de la desglicosilación con PNGaseF, los oligosacáridos se tratan por unas exosialidasas específicas a fin de asegurar la identificación de la unión y la cuantificación de cada estructura aislada. Las sialidasas utilizadas son unas enzimas recombinantes procedentes de *S. pneumoniae* (específico de la unión α 2-3, 0,02 IU, E/S=0.4 m/m), *C. perfringens* (específico de las uniones α 2-3 y α 2-6, 0,04 IU, E/S=0,1 m/m) y *A. urefaciens* (que hidroliza las uniones α 2-3, α 2-6, α 2-8 y α 2-9, 0,01 IU, E/S=0,05 m/m).

20 Unos análisis han mostrado que el FVII-rec posee unas estructuras de glicano biantenarias, sialiladas, fucosiladas con unas formas A2F mayoritarias, y biantenarias, monosialiladas, fucosiladas (A1F). Se observan unos tiempos de migración atípicos para estas estructuras A2F y A1F con respecto a los tiempos de migración habitualmente encontrados para estas estructuras. Especialmente, estas estructuras oligosacáridicas sialiladas presentan unos tiempos de migración atípicos en HPCE-LIF y NP-HPLC con respecto a los del FVII-tg. Por otro lado, el análisis de la composición en monosacáridos no ha revelado ácido siálico particular diferente de Neu5Ac y las herramientas de espectrometría de masa revelan unos glicanos de masas de acuerdo con los tipos bisialilados. Finalmente, la desialilación de los glicanos del FVII-rec permite encontrar unos comportamientos cromatográfico y electroforético equivalentes a los de los oligosacáridos del FVII-tg y FVII-pd.

30 Estas diferencias de comportamientos electroforético y cromatográfico pueden por lo tanto explicarse por una ramificación diferente de los ácidos siálicos. Esta hipótesis se ha evaluado por los diferentes enfoques de HPCE-LIF y de MS.

35 Los resultados se resumen en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4: ramificaciones de los ácidos siálicos sobre los diferentes lotes de FVII.

	Sialilación (%)	α 2-3 (%)	α 2-6 (%)	α 2-8 (%)
FVII-pd	100	41	59	0
FVII-rec	91	100	0	0
FVII-tg Lot C	96	0	100	0

40 Los resultados muestran unas isomerías distintas a nivel de los ácidos siálicos entre los tres FVII. En efecto, los ácidos siálicos del FVII-rec implican unas uniones α 2-3 mientras que el FVII-tg presenta unas ramificaciones α 2-6 y que el FVII-pd es una mezcla de estos dos isómeros.

45 Las diferencias de comportamientos en HPCE-LIF y en NP-HPLC observadas para los glicanos del FVII-rec con respecto al FVII-tg y FVII-pd son relacionadas con estas diferencias de isomería a nivel de los ácidos siálicos.

45 Ejemplo 9: Estudio de la O-glicosilación

50 El FVII comprende dos sitios de O-glicosilación localizados a nivel de los Ser₅₂ y Ser₆₀. Estos restos presentan respectivamente las unidades Glucosa-(Xilosa)₀₋₂ y Fucosa. En el ámbito de este trabajo, la O-glicosilación se ha estudiado por LC-ESIMS(/MS) y de manera similar por MALDI-TOF(/TOF) (datos no presentados).

55 La figura 10 ilustra las estructuras de los O-glicanos de las muestras FVII-pd, FVII-rec y FVII-tg. El pico a m/z 3297,4 corresponde al péptido [Leu₃₉-Lys₆₂] que comprende las unidades Glucosa-(Xilosa)₂ sobre la Ser₅₂ y Fucosa sobre la Ser₆₀. Los picos a m/z 3165,4 y 3033,3 corresponden a las pérdidas de 1 y 2 xilosas sobre este glicopéptido. Los tres tipos de FVII están uniformemente fucosilados y glucosilados, pero difieren por el número de restos de xilosa y la proporción de las glicofomas correspondientes. Así, las formas de 0, 1 y 2 xilosas están presentes en unas proporciones aproximadamente equivalentes en el FVII-pd mientras que el FVII-rec y el FVII-tg comprenden únicamente las formas de 0 y 2 xilosas.

60 El análisis por espectrometría de masa muestra el ion doblemente cargado a m/z 1516,6 que corresponde al péptido [Leu₃₉-Lys₆₂] que lleva las estructuras Fuc y Glc(Xyl)₀. Las pérdidas de masa sucesivas obtenidas por MS/MS, que corresponden a los diferentes monosacáridos, confirman la modificación de las Ser₅₂ y Ser₆₀ respectivamente por los

restos glucosa y fucosa. La secuenciación de Edman ha permitido confirmar estos resultados en término de sitios modificados.

5 De la misma manera, el ion doblemente cargado a m/z 1648,7 corresponde al péptido [Leu₃₉-Lys₆₂] que lleva las estructuras Fuc y Glc(Xyl)₂. Los diferentes iones fragmentos obtenidos en MS/MS confirman que las unidades xilosas estaban enlazadas a la Glucosa.

Ejemplo 10: Estudio de la γ -carboxilación

10 Los 10 primeros ácidos glutámicos del FVII-pd son γ -carboxilados, mientras que el 10^o ácido glutámico del FVII-rec está solo parcialmente γ -carboxilado. A fin de estudiar la γ -carboxilación del FVII transgénico y de sus comparadores, los péptidos obtenidos después de la digestión con Asp-N y tripsina se analizaron por LC-MS. Al ser las conclusiones similares para estas dos enzimas, sólo se representan los datos relativos a la digestión Asp-N.

15 En estas condiciones experimentales, tres péptidos [Ala₁-Lys₃₂], [Asp₃₃-Ser₄₅] y [Asp₃₃-Gly₄₇] que implican la γ -carboxilación se identificaron. El péptido [Ala₁-Lys₃₂] contiene los 9 primeros ácidos γ -carboxílicos (Gla) mientras que los dos otros péptidos [Asp₃₃-Ser₄₅] y [Asp₃₃-Gly₄₇] contienen sólo el 10^o resto Gla. Así, es más fácil estudiar específicamente la modificación parcial del 10^o resto Gla.

20 El análisis de los espectros de masas del FVII-pd (Figura 11) revela la presencia de un pico a 4296,8 Da, mayoritario (~90%), que corresponde al péptido [Ala₁-Lys₃₂] totalmente γ -carboxilado sobre los 9 primeros ácidos glutámicos (Glu) y de un pico a 1658,8 Da característico del péptido [Asp₃₃-Ser₄₅] totalmente γ -carboxilado a nivel del décimo Glu₃₅. Estos resultados muestran, en acuerdo con la bibliografía (Jurlander B. *et al.*, Semin. Thromb. Hemost., 2001, 27, 373-384), que los 10 primeros restos Glu del FVII-pd son γ -carboxilados.

25 Al adquirirse los diferentes datos en las mismas condiciones experimentales, es posible un estudio comparativo entre los diferentes lotes de FVII (Tabla 5).

30 La figura 11 muestra que para los FVII-rec y FVII-tg, el pico a 4296,8 Da que corresponde al péptido [Ala₁-Lys₃₂] totalmente γ -carboxilado es mayoritario. Por el contrario, para los dos FVII, se nota la presencia mayoritaria del pico a 1614,9 que representa la característica del péptido [Asp₃₃-Ser₄₅] no γ -carboxilado sobre el Gla₃₅. Este resultado indica una γ -carboxilación parcial del 10^o Gla evaluada a aproximadamente 35-40% en el caso del FVII-rec lo que está de acuerdo con el valor publicado del ~50% (Thim L. *et al.*, Biochemistry, 1988, 27, 7785-7793 y Jurlander B. *et al.*, Semin. Thromb. Hemost., 2001, 27, 373-384). Se necesita también señalar la presencia de una forma de 8 Gla de intensidad no despreciable dentro del péptido [Ala₁-Lys₃₂]. Este último punto indica una γ -carboxilación parcial de una o varias Gla dentro de este péptido, la presencia de "trazas" de una forma a 7 Gla subrayaría más bien la implicación de un único resto.

40 Tabla 5. Resumen de los datos que se refieren a la γ -carboxilación de las Gla. Estos datos proceden del análisis por LC-ESIMS. Gla: ácido γ -carboxílico.

	Número de restos Gla	Forma mayoritaria (n Gla)
FVII-pd	8-10	10
FVII-rec	7-10	9
FVII-tg	7-10	9
FVII-tg	7-10	9

Ejemplo 11: Estudio de los puentes disulfuros

45 El estudio de los puentes disulfuros del FVII se ha realizado a partir del hidrolizado tripsico obtenido en unas condiciones no reductoras (conservación de los puentes disulfuros).

Se incluyó una etapa de reacción con la yodoacetamida a fin de bloquear eventuales cisteínas libres y evitar así un intercambio de puentes disulfuros durante las etapas realizadas a pH alcalino.

50 En estas condiciones, se ha podido confirmar la existencia de 12 puentes disulfuros y emparejar 10 cisteínas (Tabla 6). Sin embargo, debe subrayarse que los resultados obtenidos con relación esta parte de la secuencia del FVII son conformes con el emparejamiento teórico. Estas conclusiones son aplicables a las dos muestras investigadas: FVII-pd y FVII-tg.

55

60

Tabla 6. Resumen de los resultados obtenidos en cuanto al estudio de los puentes disulfuros.

	FVII-pd	FVII-tg
PUENTES DISULFUROS CONFIRMADOS	12	12
Cisteínas emparejadas	Cys ₁₇ - Cys ₂₂	Cys ₁₇ - Cys ₂₂
	Cys ₁₁₄ - Cys ₁₂₇	Cys ₁₁₄ - Cys ₁₂₇
	Cys ₁₃₅ - Cys ₂₆₂	Cys ₁₃₅ - Cys ₂₆₂
	Cys ₁₅₉ - Cys ₁₆₄	Cys ₁₅₉ - Cys ₁₆₄
	Cys ₁₇₈ - Cys ₁₉₄	Cys ₁₇₈ - Cys ₁₉₄
	Cys ₃₁₀ - Cys ₃₂₉	Cys ₃₁₀ - Cys ₃₂₉
	Cys ₃₄₀ - Cys ₃₆₈	Cys ₃₄₀ - Cys ₃₆₈

5 La estrategia experimental utilizada se aplica a un dipéptido [Gly₃₅₄-Ser₃₇₉] / [Asp₃₃₈-Lys₃₄₁] sin más modificaciones post-traduccionales (MPT) (resultados no mostrados). Esta estrategia implica varios enfoques complementarios: i) la identificación de los dipéptidos que contienen el puente disulfuro por un doble “matching” de masas por ESI-MS y MALDI-MS entre las masas experimentales y observadas, ii) la confirmación de las estructuras por reducción química de los puentes S-S e identificación en MS de los dos péptidos generados a partir del dipéptido y iii) la secuenciación de los dipéptidos por MS/MS y microsecuenciación automática de Edman.

10 Los resultados muestran una primera identificación del dipéptido [Gly₃₅₄-Ser₃₇₉] / [Asp₃₃₈-Lys₃₄₁] que implica un puente disulfuro Cys₃₄₀-Cys₃₆₈ por «matching» de la masa experimental (3264,6 Da) con la masa teórica (3264,5 Da).

15 Después de la reducción, se nota la desaparición del pico que corresponde a este dipéptido [Gly₃₅₄-Ser₃₇₉] / [Asp₃₃₈-Lys₃₄₁] que contiene el puente Cys₃₄₀-Cys₃₆₈ en beneficio de un pico a m/z 2816,3 característica del péptido [Gly₃₅₄-Ser₃₇₉] (masa teórica: 2816,3 Da) que contiene la Cys₃₆₈. La secuenciación por MS/MS y por la química de Edman confirma la identificación del dipéptido [Gly₃₅₄-Ser₃₇₉] / [Asp₃₃₈-Lys₃₄₁] y del puente disulfuro Cys₃₄₀-Cys₃₆₈.

20 **Ejemplo 12: Estudio de la β-Hidroxilación del ácido aspártico 63**

25 El análisis de los péptidos se realiza a partir de un «digest» tripsico de la proteína según unos métodos conocidos por el experto en la materia. Los péptidos se analizan en MALDI-MS. La identificación de los péptidos hidroxilados se realiza por medición de la masa observada, por comparación con la masa teórica. El instrumento utilizado es un Bruker Autoflex 2 que funciona en el modo TOF.

30 Los diferentes resultados obtenidos se presentan en la Tabla 7. Cabe subrayar que la bibliografía (Thim L. *et al.*, Biochemistry, 1988, 27, 7785-7793) detalla la ausencia de β-hidroxilación de los FVII-pd y FVII-rec, mientras que se ha observado una modificación parcial de estas dos muestras, sin embargo, de manera menos abundante que los diferentes lotes de FVII-tg.

35 Tabla 7. Resumen de los datos que se refieren a la hidroxilación de Asp₆₃. Estos datos proceden del análisis por LC-ESIMS de los péptidos tripsicos. (*) β-hidroxilación menos “abundante” que en los FVII-tg. (**) Valor procedente de la bibliografía (Thim L. *et al.*, Biochemistry, 1988, 27, 7785-7793).

	Hidroxilación Asp ₆₃
FVII-pd	Parcial *
FVII-rec	No **
FVII-tg	Parcial
FVII-tg	Parcial
FVII-tg	Parcial

40 **Ejemplo 13: Estudio de la presencia de las estructuras Galα1, 3Gal**

40 A fin de estudiar la presencia eventual de las estructuras Galα1,3Gal en los FVII-tg, se utiliza como control positivo la tiroglobulina bovina que contiene unas estructuras Galα1,3Gal.

Los productos son, después de la desglucosilación por la PNGase F, tratados por unas sialidasas, fucosidasas y α-galactosidasas específicas de las ramificaciones Galα1,3Gal.

45 La figura 6 presenta el estudio realizado sobre la tiroglobulina bovina con la superposición del perfil nativo del FVII y de perfil desialilado, defucosilado y α-degalactosilado (Dsial+DFuc+Dgalα (1, 3, 4, 6)). El perfil de glicano obtenido después de la α-degalactosilación muestra que esta estructura desaparece totalmente después del tratamiento por la enzima demostrando así que α-galactosidasa utilizada es perfectamente activa. El porcentaje de estructura Galα1,3Gal obtenido del 17,8% es coherente con el porcentaje esperado.

50

La figura 7 presenta la superposición de los electroforegramas del producto desialilado y defucosilado del FVII-tg (Disial+DFuc) con el producto desialilado, defucosilado y α -degalactosilado (Disial+DFuc+Dgal α (1, 3, 4, 6)).

5 Se observa que los dos perfiles son perfectamente superponibles. Estos resultados sugieren la ausencia de estructuras Gal α 1,3Gal en el FVII-tg. Se nota la presencia de estructuras minoritarias (*) que corresponden a unos glicanos cuya fucosa no está en posición proximal.

10 Ejemplo 14: Cuantificación de las unidades sacarídicas Gal α 1,3Gal

10 Se trataron 10 μ g de los FVII humanos, recombinantes y transgénicos en condiciones de reducción de los puentes disulfuros, y depositados sobre gel de electroforesis y transferidos sobre una membrana de nitrocelulosa. Se utiliza una muestra de tiroglobulina bovina (Sigma, T1001, Thyroglobulin from bovin tiroid) como control positivo debido a su alto contenido en epítipo alfa(1,3) galactosilo. La presencia de la unidad α -Gal (Galactosa-alfa1-3Galactosa-(3)4GlcNAc-R) se revela por la lectina purificada *Marasmius oreades* aglutinina (EY laboratoires, H-9001, MOA-HRP) marcada con peroxidasa y específica del epítipo α -Gal. LA actividad peroxidásica se detecta después por un sustrato cromogénico (Fluka, 4-cloro-1-naftol) y cuantificada por recuento de la señal (Bio-Rad, Quantity-one). Se trata una membrana idéntica con una alfa-galactosidasa (Prozyme, Green coffee bean) a fin de confirmar la especificidad de la señal. En paralelo, se estima también la cantidad de proteína total por coloración de un gel SDS-PAGE idéntico, coloreado con azul de Coomassia.

20 Los resultados muestran la especificidad de la lectina *Marasmius oreades* (MOA) debido a la fuerte señal observada para la tiroglobulina bovina y de su desaparición según el tratamiento con una alfa-galactosidasa. Los resultados expresados en relación de intensidad de señal MOA dividida por la intensidad de la señal correspondiente a la cantidad de proteína analizada demuestran un nivel de señal α -Gal residual (2,3 a 3,7) para la muestra de FVII-tg mientras que el FVII recombinante presenta un valor superior.

25 Estos resultados (véase la figura 8) demuestran la ausencia o la muy baja prevalencia del epítipo α -Gal sobre el FVII transgénico expresado en el conejo, comparativamente a un FVII recombinante producido por unas células de hámster por ejemplo.

30 La Tabla A resume las etapas del procedimiento según una realización preferida de la invención para proporcionar la composición de FVII de la invención, y proporcionar los diferentes rendimientos, la pureza y las actividades obtenidas en cada etapa.

35 Tabla A

Lote rf479030	Volumen (mf)	Cantidad de proteínas (mg)	Cantidad FVII:Ag (U)	Rdt FVII/etapa (%)	Rdt FVII/cumul(%)	AS (U/mg)	Pureza FVII(%)
Pool de leche bruto	500	42750	103450	100%	100%	2,4	0,12%
Clarificación fosfato	4785	ND	93650	91%	91%	-	-
Concentración/diálisis (UF 50KD)	657	29610	93233	99%	90%	3,1	0,20%
Eluato hidroxapatito (CHT-I)	2614	1071	85692	92%	79%	80,0	4,0%
Filtración tangencial (UF 100KF)	459	518	81684	95%	72%	157,6	7,9%
Eluato QSFF1 (alto Ca ⁺⁺)	402	105	59757	73%	58%	572	28,6%
Eluato QSFF2 (bajo Ca ⁺⁺)	157	12,8	22447	38%	22%	1749	87%
Eluato QSFF3 (sodio)	42,5	12,7	21929	98%	21%	1727	86%
Producto terminado (esterilización 0,2 μ m)	50	12,4	23197	106%	22%	1878	94%

Rdt: Rendimiento

40 Listado de secuencias

<110> Laboratoire Français du Fraccionnement y des Biotechnologies

<120> FVII transgénico

<130> LFB

45 <160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

ES 2 725 081 T3

<211> 406

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15

Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20 25 30

Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50 55 60

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65 70 75 80

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85 90 95

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100 105 110

Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115 120 125

5

ES 2 725 081 T3

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130 135 140
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145 150 155 160
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165 170 175
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180 185 190
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195 200 205
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210 215 220
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225 230 235 240
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245 250 255
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260 265 270
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
 275 280 285
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290 295 300
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305 310 315 320
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325 330 335
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340 345 350
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355 360 365
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370 375 380
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

REIVINDICACIONES

1. Composición de factor VII (FVII) transgénico, presentando cada molécula de factor VII de la composición dos sitios de N-glicosilación, caracterizada por que:
- 5 - entre todas las moléculas de FVII de la composición, el porcentaje de unidades de glicano Gal α 1,3Gal está comprendido entre el 0 y el 4%, midiéndose el porcentaje de unidades de glicano Gal α 1,3Gal por lectina-transferencia con revelación con 4-cloro-1-naftol, y
- 10 - por que todos los ácidos siálicos del factor VII implican enlaces α 2-6, y
- por que el factor VII de la composición se produce por conejas transgénicas.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que, entre todas las unidades de glicano del factor VII de la composición, al menos un 40% son unas formas de glicano biantenarias, monosialiladas, y en la que las formas de glicano biantenarias, monosialiladas del factor VII son mayoritarias.
3. Composición según la reivindicación 2, caracterizada por que, cuando las formas de glicano biantenarias monosialiladas del factor VII son mayoritarias, entre las formas de glicano biantenarias, monosialiladas del factor VII, las formas de glicano mayoritarias son no fucosiladas, y el porcentaje de fucosilación del factor VII está comprendido entre el 20% y el 50%.
4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que el factor VII está activado.
5. Composición de factor VII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización como medicamento.
6. Utilización de una composición factor VII según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los pacientes que padecen hemofilia, para el tratamiento de los traumatismos hemorrágicos, para el tratamiento de los sangrados masivos no controlables por una hemostasis quirúrgica, o al tratamiento de las hemorragias que se deben a una sobredosis de anti-coagulantes.
7. Composición farmacéutica que comprende un factor VII tal como se define según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Procedimiento de extracción y de purificación de FVII transgénico, contenido en la leche de coneja transgénica, que comprende las etapas siguientes que consisten en:
- a) extraer el FVII a partir de la leche, estando el factor VII enlazado a las sales y/o a los complejos orgánicos y/o inorgánicos de calcio de dicha leche, por la precipitación de compuestos de calcio obtenido por adición en la leche de una sal soluble, cuyo anión se selecciona por su aptitud para formar dichos compuestos de calcio insolubles para así liberar el factor VII de dichas sales y/o complejos, estando el factor VII así presente en una fase líquida,
- b) separar la fase líquida enriquecida en la proteína del precipitado de compuestos de calcio, estando dicha fase líquida además separada en una fase lipídica y una fase acuosa no lipídica que comprende la proteína,
- c) someter la fase acuosa no lipídica a una etapa de cromatografía de afinidad, utilizando un tampón de elución a base de una sal de fosfato a una concentración predeterminada, y
- d) someter el eluato de factor VII, obtenido en la etapa c), a dos o tres etapas de cromatografía sobre unas columnas intercambiadoras de aniones de tipo base débil utilizando unos tampones apropiados para unas eluciones sucesivas del factor VII retenido sobre dichas columnas.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la sal soluble es una sal de fosfato seleccionada del grupo constituido por el fosfato de sodio, el fosfato de litio, el fosfato de potasio, el fosfato de rubidio y el fosfato de cesio, y es, en particular, el fosfato de sodio, o en el que la sal soluble es un oxalato de un metal alcalino, en particular el oxalato de sodio o de potasio, o un carbonato de un metal alcalino, en particular el carbonato de sodio o de potasio, o sus mezclas.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 9, en el que la concentración de la sal soluble en solución acuosa está comprendida entre 100 mM y 3 M, de manera más preferida, entre 200 mM y 500 mM y en particular entre 200 mM y 300 mM.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 10, en el que la etapa b) se efectúa por centrifugación.

- 5 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende, después de la etapa de separación, una etapa de filtración de la fase acuosa no lipídica efectuada sucesivamente sobre unos filtros de porosidad decreciente, preferentemente de 1 μm y después de 0,45 μm , seguida de una etapa de concentración/diálisis por ultrafiltración, y que comprende opcionalmente una etapa de filtración de la fase líquida a través de los filtros de porosidad decreciente, preferentemente de 1 μm y después de 0,45 μm .
- 10 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 12, en el que la cromatografía de afinidad se realiza sobre una columna cromatográfica cuyo soporte es un gel de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) o un gel de fluoroapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$), y el tampón de elución es un tampón a base de fosfato de sodio 0,25 M-0,35 M, pH 7,5-8,5.
- 15 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 13, en el que el eluato de FVII obtenido al final de la etapa c) se somete después a una filtración tangencial.
- 20 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 14, en el que, la primera etapa cromatográfica se realiza sobre un soporte cromatográfico de tipo gel Q-Sepharose FF y en el que la elución du FVII se efectúa mediante un tampón acuoso a base de Tris 0,05 M y de cloruro de calcio 0,020 M-0,05 M, pH 7,0-8,0.
- 25 16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 15, en el que, la segunda etapa cromatográfica se realiza por un soporte cromatográfico de tipo gel Q-Sepharose FF sobre el cual se inyecta el primer eluato de FVII, obtenido por la primera etapa cromatográfica sobre intercambiador de aniones, y en el que la elución du FVII se efectúa mediante un tampón acuosa a base de Tris 0,05 M y de cloruro de calcio 0,005 M, pH 7,0-8,0.
- 30 17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 16, en el que la tercera etapa cromatográfica se realiza por un soporte cromatográfico de tipo gel Q-Sepharose FF sobre el cual se inyecta el segundo eluato de FVIII, obtenido por la segunda etapa cromatográfica sobre intercambiador de aniones, y en el que la elución du FVII se efectúa mediante un tampón acuosa a base de Tris 0,02 M y de cloruro de sodio 0,20-0,30 M, preferentemente 0,28 M, pH 6,5-7,5.
- 35 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 17, que comprende al menos una de las etapas siguientes de formulación, inactivación viral y esterilización.
19. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 18, que comprende, antes de la etapa de cromatografía de afinidad, una etapa de tratamiento anti-viral que se efectúa por disolvente/detergente.
20. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 19, en el que el eluato procedente de la segunda etapa cromatográfica sobre intercambiador de aniones se somete a una etapa de nanofiltración.

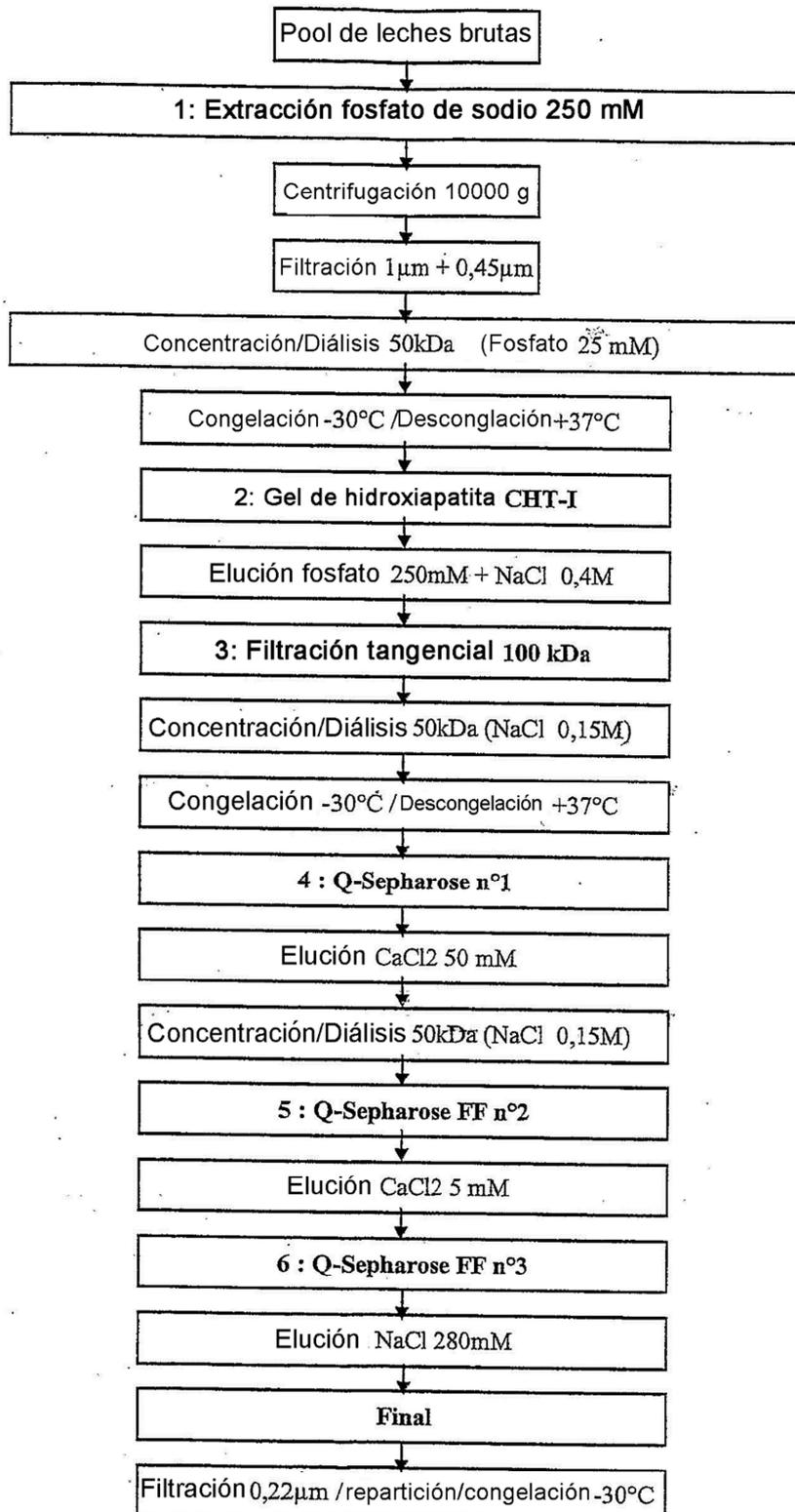


Fig. 1

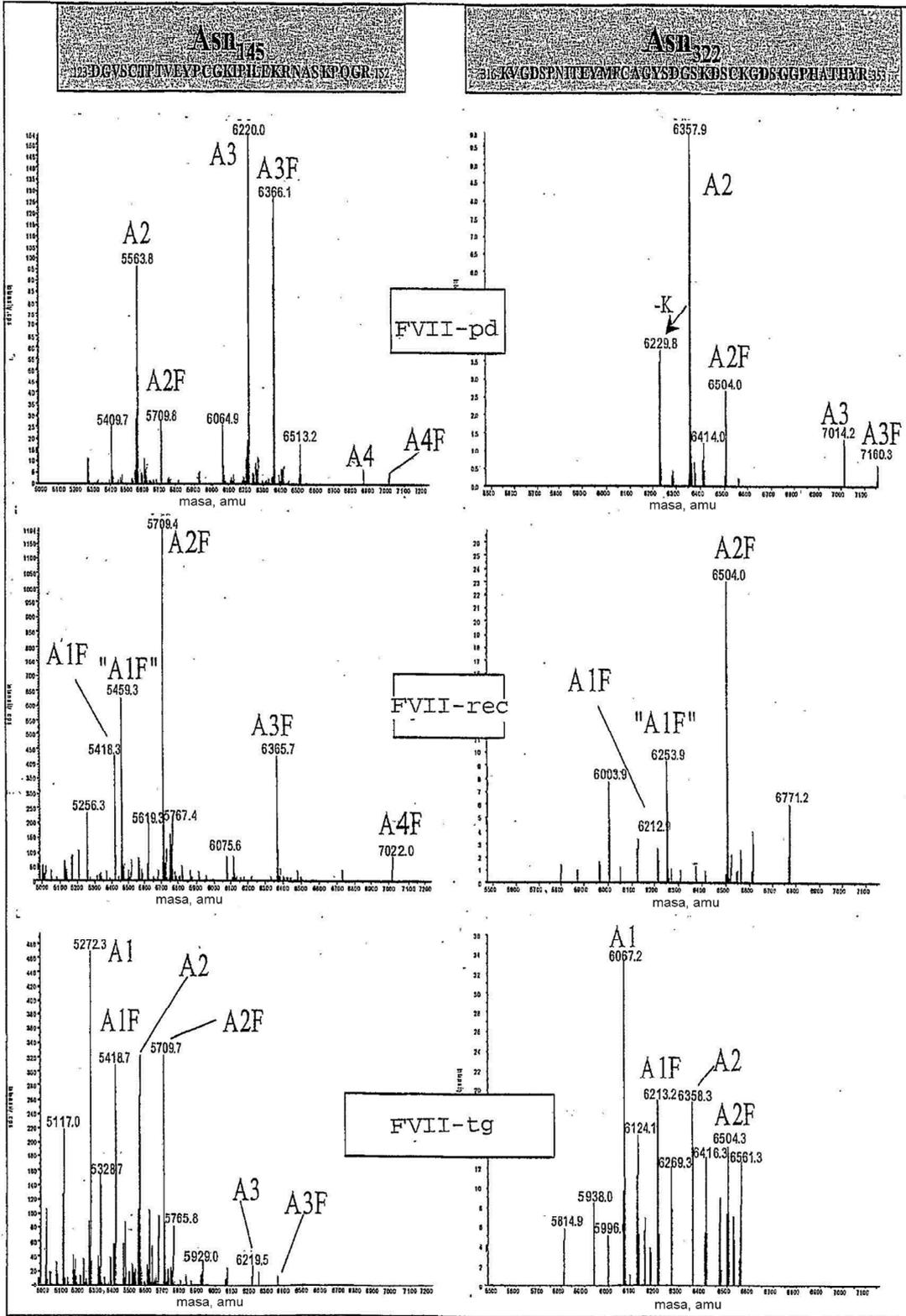


Fig. 2

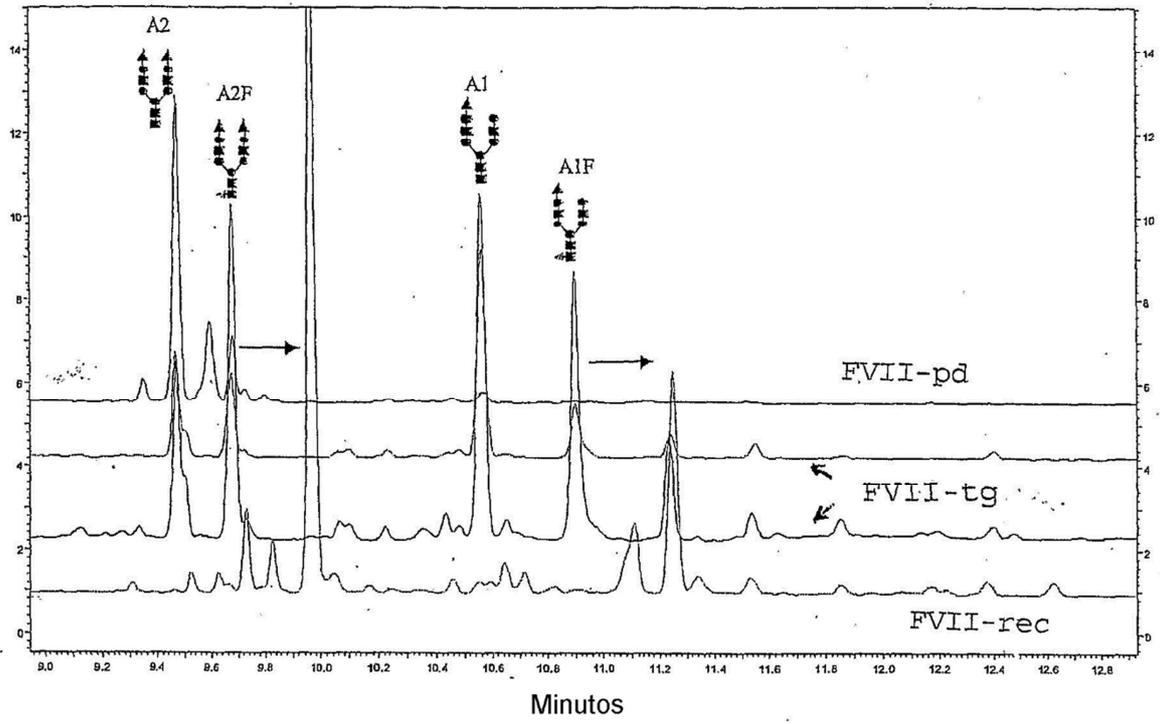


Fig. 3

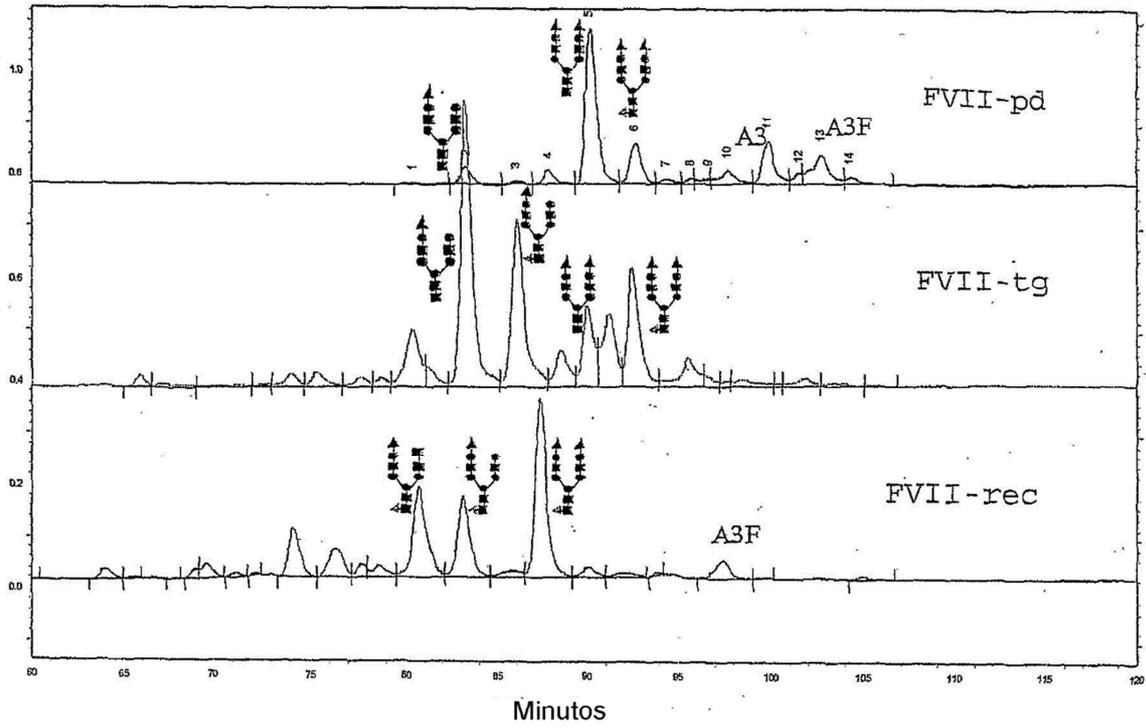


Fig. 4

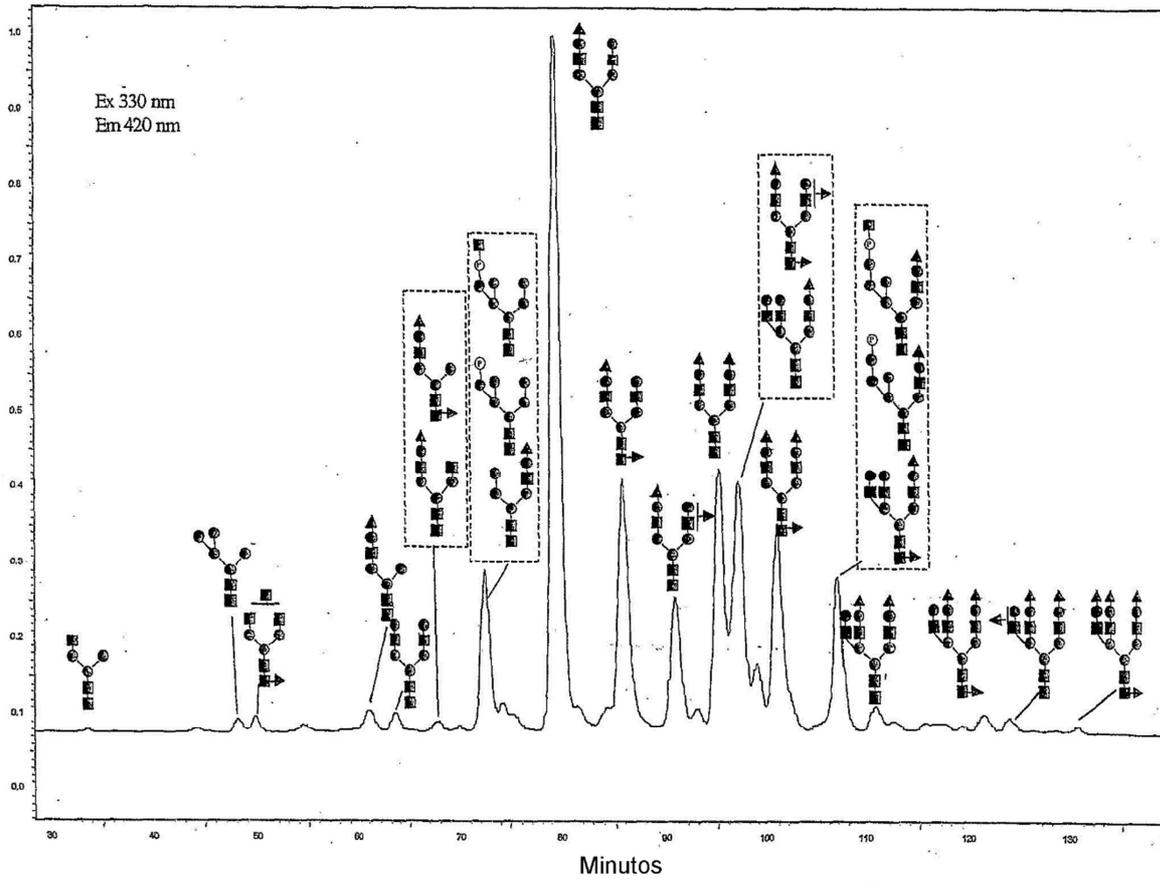


Fig. 5

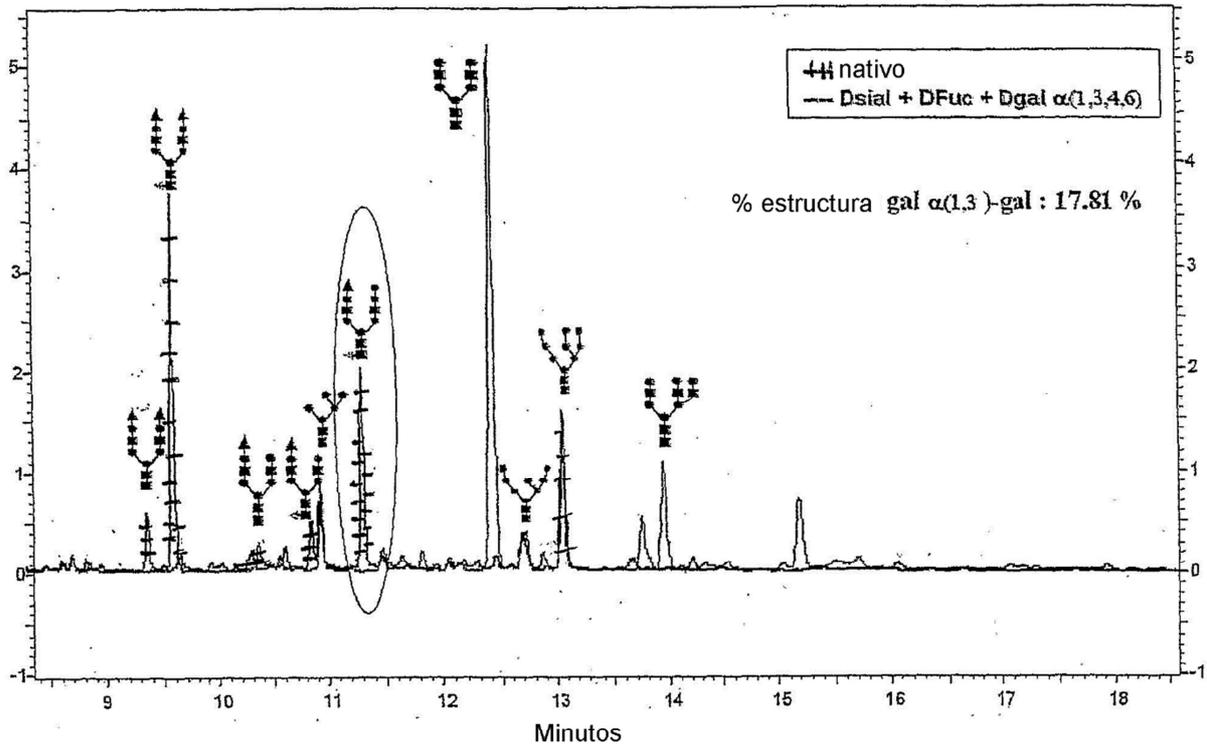


Fig.6

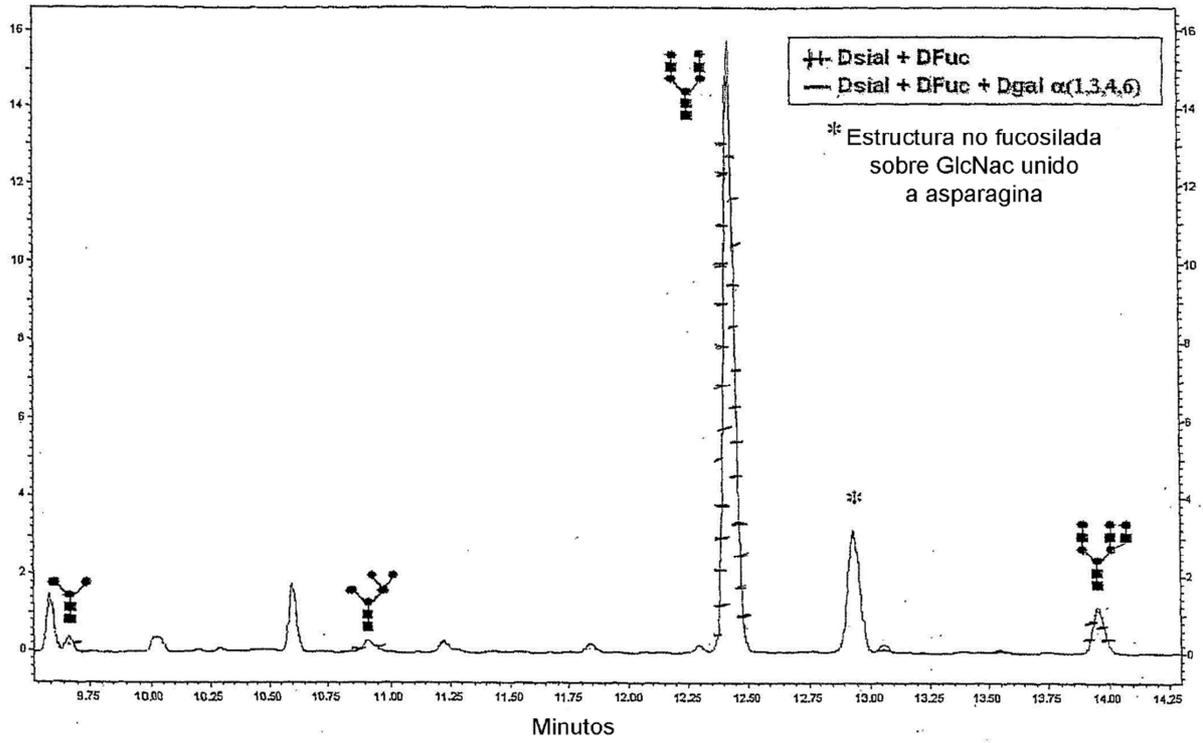
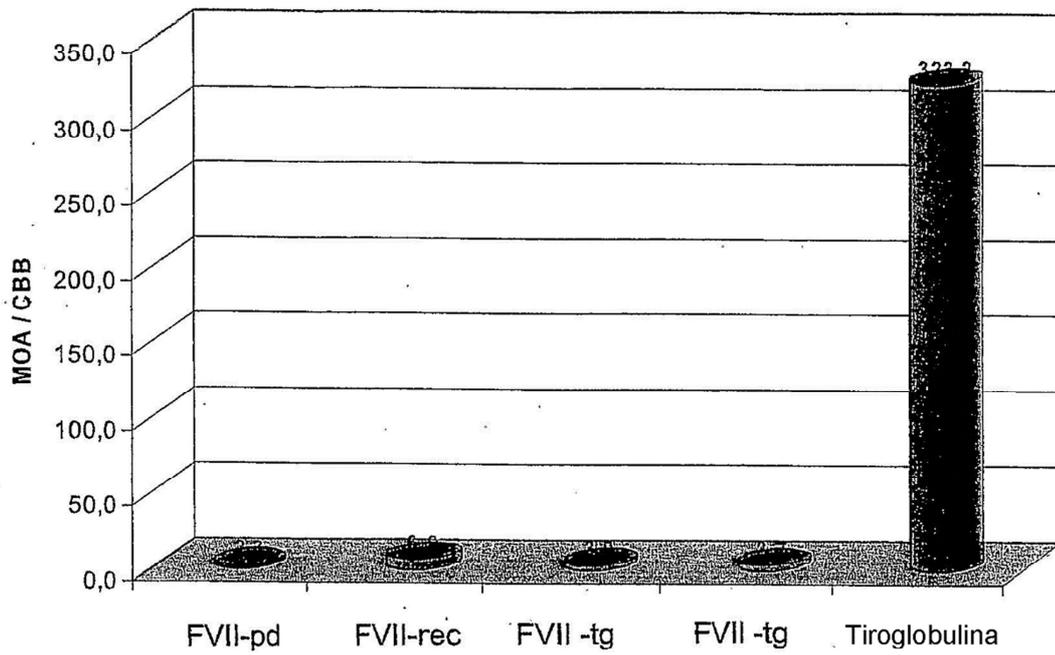


Fig. 7



Proporción intensidad de coloración MOA-HRP / intensidad de coloración CBB (x100)

Fig. 8

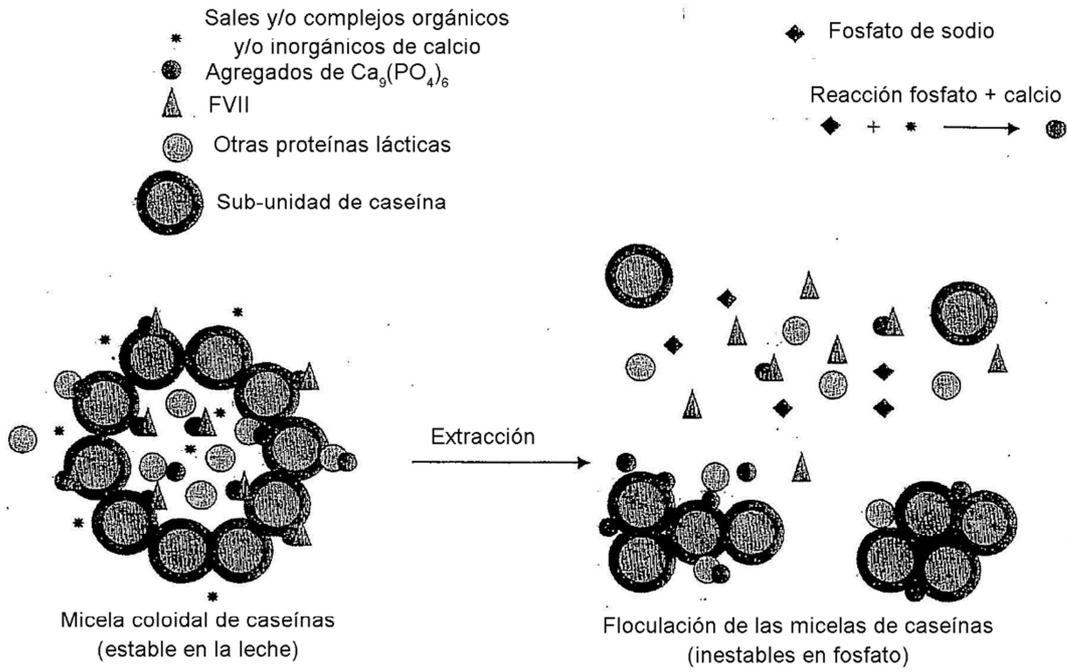


Fig. 9

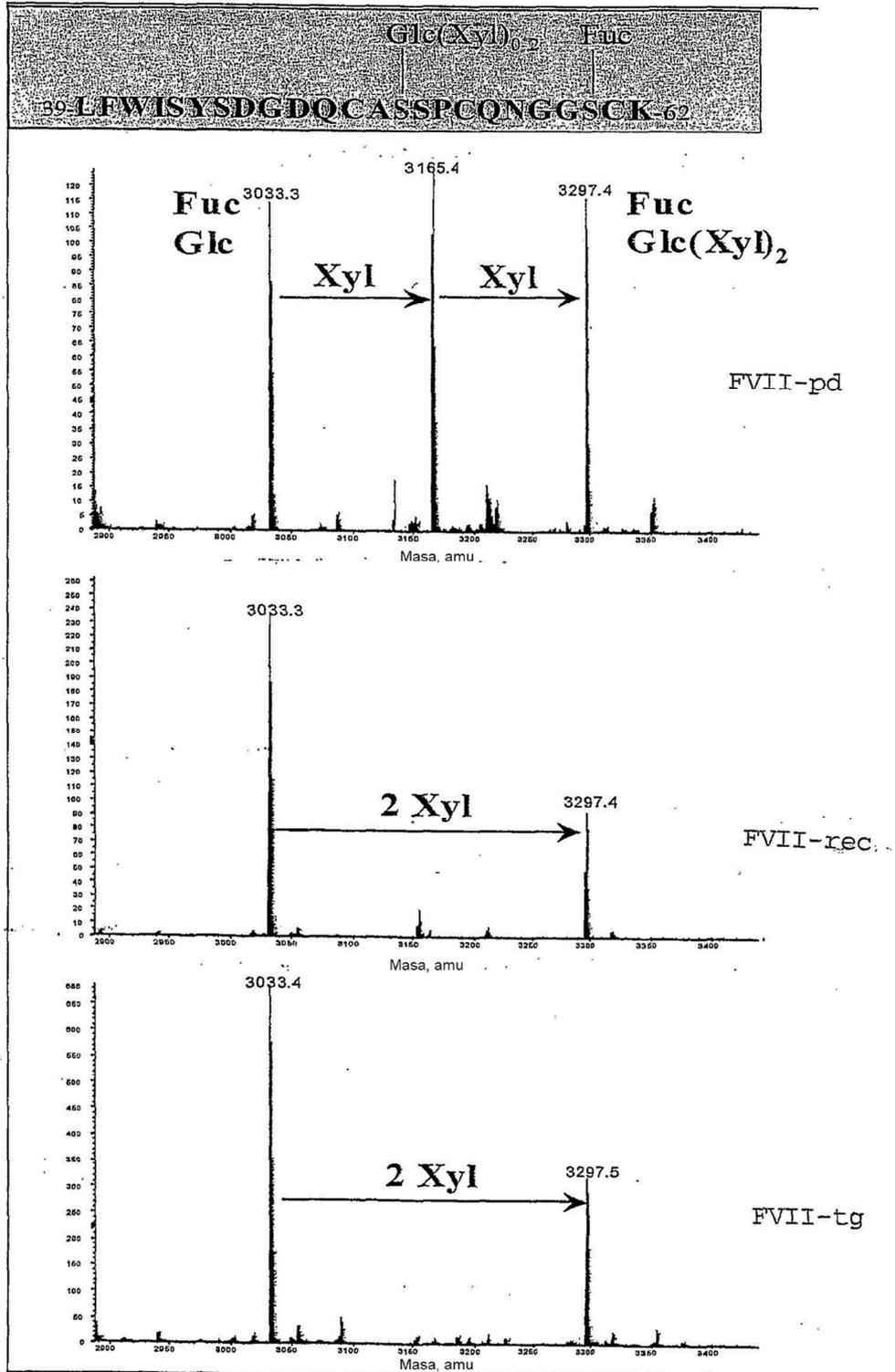


Fig. 10

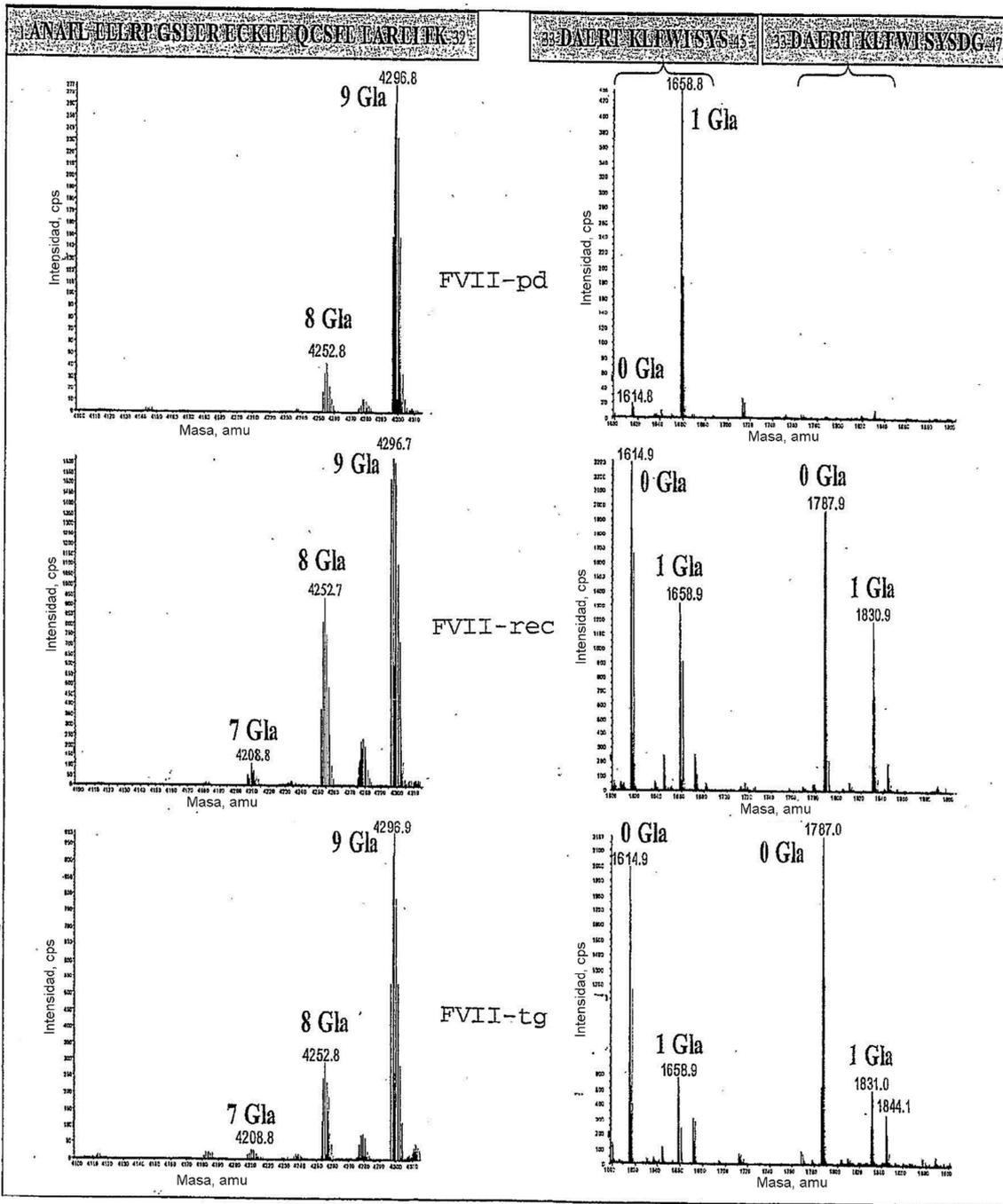


Fig. 11