

1
COMBINACIÓN DE FACTOR VII Y DE UN ANTICUERPO BIESPECÍFICO
DIRIGIDO CONTRA LOS FACTORES IX Y X

La invención se refiere a composiciones farmacéuticas
5 útiles para el tratamiento de un trastorno de la coagulación,
tal como la hemofilia A, especialmente en pacientes que
presentan una hemofilia de tipo A con desarrollo de anticuerpos
inhibidores del factor VIII.

10 **Antecedentes de la técnica**

La coagulación se produce por dos rutas, una intrínseca,
otra extrínseca, que llegan a una ruta final común. La
combinación de ambos mecanismos garantiza la formación de un
15 coágulo de sangre sólido y flexible, qui resista la presión
sanguínea. Bajo la acción de la trombina, el fibrinógeno
experimenta modificaciones químicas que dan lugar a la
formación de la fibrina. La fibrina es necesaria para la
formación del coágulo.

20

La ruta intrínseca exige factores presentes en la
coagulación, y el proceso de coagulación se inicia en el
interior del mismo vaso sanguíneo. En cuanto a la ruta
extrínseca, aplica factores tisulares habitualmente no
25 presentes en la circulación y que se liberan cuando se produce
una lesión vascular.

El factor VII es una glucoproteína que interviene en la
ruta extrínseca de la coagulación sanguínea. Para iniciar la
30 cascada de coagulación, el FVII se debe activar al FVIIa. Una
vez activado, el FVIIa se compleja con el factor tisular (FT),

proteína asociada a fosfolípidos, que se libera cuando se produce la lesión vascular. El FVIIa en solitario (no complejo con el factor tisular) presenta una baja actividad proteolítica. A continuación, el complejo FVIIa-FT transforma el factor X en factor Xa en presencia de iones calcio. Este complejo también actúa sobre la activación del factor FIX a FIXa, catalizando así la ruta intrínseca. Los factores IXa y Xa, activan a su vez el factor VII activado.

10 El factor IX y el factor X intervienen en la ruta intrínseca de la coagulación. El factor IX activado permite la activación del factor X a factor Xa.

El factor Xa complejo con el factor FV activado y con la protrombinasa transforma la protrombina en trombina. La trombina actúa seguidamente sobre el fibrinógeno para transformarlo en fibrina y también permite la activación del FVIII y del FV para dar FVIIIa y FVa, respectivamente. La trombina, por su parte, permite activar el factor XIII a FXIIIa, responsable de la consolidación del coágulo de fibrina, en presencia de calcio, presente de manera natural en el plasma.

A pesar de ello, cuando falta un factor de coagulación, la cascada de coagulación se interrumpe o es deficiente y, en ese caso, se habla de una coagulación anómala.

El factor VII activado actúa localmente en presencia del factor tisular liberado después de una lesión de tejido que produce hemorragias, incluso en ausencia de factor VIII o IX. Este es el motivo de que el factor VII, preferentemente en

forma activada, se utilice en el tratamiento de determinados trastornos de la coagulación sanguínea que se manifiestan por hemorragias.

5 Por tanto, el factor VII se utiliza en el tratamiento de pacientes afectados de hemofilia, que presenten un déficit de factor VIII (hemofilia de tipo A) o de factor IX (hemofilia de tipo B), así como de pacientes que presenten otros déficits de factores de coagulación, por ejemplo, un déficit hereditario
10 de FVII. El FVII también se recomienda para el tratamiento de accidentes cerebrovasculares.

Algunos pacientes hemofílicos desarrollan anticuerpos inhibidores del Factor VIII administrado, generalmente en forma
15 concentrada, como tratamiento para la hemofilia. Esta es, en la actualidad, la complicación más frecuente en el tratamiento de la hemofilia.

Los anticuerpos específicos que tienen como diana el FIX
20 o el FIXa y el FX o el FXa, como Emicizumab, se utilizan para tratar pacientes afectados de hemofilia A, que presentan inhibidores dirigidos contra el factor VIII. Estos anticuerpos se sustituyen funcionalmente en el FVIII favoreciendo la activación del FX mediante el FIXa por acercamiento de estas
25 dos moléculas. Estos anticuerpos tienen una acción prolongada.

La combinación entre FVIIa recombinante procedente de un cultivo celular (tal como Novoseven®, producido en células BHK) con el Emicizumab (tal como ACE910 o Hemlibra®) se ha probado
30 (*R. HARTMANN, et al. OR36 / Synergistic Effects of a Procoagulant Bispecific Antibody and FEIBA or Factor VIIA on*

Thrombln Génération (Haemophilia (2017), 23 (Supl. 2), 11-27)).

Esta combinación solo muestra un efecto aditivo sobre el tratamiento de los trastornos de la coagulación.

5 Por tanto, existe la necesidad de una combinación farmacéutica que permita un mejor tratamiento de los pacientes con hemofilia A y, más especialmente, de pacientes que presenten anticuerpos contra el factor VIII.

10 **Resumen de la invención**

La invención propone combinar el factor VII transgénico con un anticuerpo multiespecífico dirigido contra los factores IX y X.

15

De acuerdo con la invención, la combinación de la invención del factor VII obtenido por transgénesis y de anticuerpo dirigido contra el factor IX y el factor X induce un efecto sinérgico en el tratamiento de trastornos de la coagulación y, especialmente para el tratamiento de pacientes afectados por hemofilia A que presenten inhibidores anti-FVIII y de pacientes con déficits de FVII.

20

Por tanto, un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende:

25

- a. factor VII transgénico, y
 - b. un anticuerpo multiespecífico, preferentemente biespecífico, dirigido contra el factor IX y el factor X, tal como por ejemplo, emicizumab.
- 30

Preferentemente, el factor VII está en la forma de factor

VII activado (FVIIa).

En una realización particular, el factor IX está en la forma de factor IX activado (FIXa), y/o el factor X está en forma de factor X activado (FXa).

Preferentemente, dicho factor VII transgénico es un factor VII humano procedente de una producción por células epiteliales de las glándulas mamarias de un mamífero no humano transgénico, por ejemplo un conejo transgénico para el factor VII humano.

La invención también proporciona un producto de combinación que comprende:

- a. factor VII transgénico, y
 - b. un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X,
- para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno de la coagulación, tal como la hemofilia A, más especialmente, la hemofilia A con inhibidores del factor VIII (FVIII).

Preferentemente, el producto de combinación está en forma de una composición farmacéutica que comprende, al mismo tiempo, el factor VII transgénico y dicho anticuerpo.

De manera alternativa, el factor VII transgénico y el anticuerpo están en forma de composiciones separadas, adaptadas para una administración simultánea o independiente (por ejemplo secuencial) al paciente.

Otro objeto de la invención también se refiere a un kit

que comprende:

- Un recipiente que contiene un factor FVII transgénico; y
- Otro recipiente que contiene un anticuerpo dirigido contra el factor IX y el factor X.

Listado de figuras:

Figura 1: Evaluación del efecto trombogénico sinérgico de la combinación Sevenfact™ + Hemlibra® sobre el lote 1 de Plasma hemofílico A tras la inducción con TF/PL. (A) Evaluación del efecto trombogénico sinérgico sobre el PTE, (B) Evaluación del efecto trombogénico sinérgico sobre el pico de generación de trombina, (C) Evaluación del efecto trombogénico sinérgico sobre la velocidad.

Figura 2: Evaluación del efecto trombogénico sinérgico de la combinación Sevenfact™ + Hemlibra® sobre el lote 2 de Plasma hemofílico A tras la inducción con TF/PL. (A) Evaluación del efecto trombogénico sinérgico sobre el PTE, (B) Evaluación del efecto trombogénico sinérgico sobre el pico de generación de trombina, (C) Evaluación del efecto trombogénico sinérgico sobre la velocidad.

Descripción detallada de la invención

Definiciones generales

El fenómeno de la coagulación conlleva una cascada de reacciones enzimáticas que implican factores de coagulación presentes en forma de proenzimas que, en presencia de

determinados cofactores, ⁷ se convierten por escisión proteolítica en su forma "**activada**". La forma activada de cada factor presente en la forma de precursor inactivo, se designa con la letra a. Así, el FVIIa es el resultado, *in vivo*, de la
5 escisión del zimógeno mediante diversas proteasas (FIXa, FXa, FVIIa) en dos cadenas unidas mediante un puente disulfuro.

El término "**tratamiento**" o "**tratar**" designa generalmente una mejora, profilaxia o inversión de una enfermedad o de un
10 trastorno, o al menos de un síntoma, por ejemplo, la ralentización de la progresión de una enfermedad, o la estabilización de un síntoma. También se incluye el retraso en la aparición de una enfermedad o trastorno, o al menos de un síntoma.

15 El término "**prevención**" o "**prevenir**" designa una reducción en el riesgo de desarrollar o de adquirir una enfermedad o trastorno determinado.

20 En el sentido de la presente invención, por "**paciente**" o "**sujeto**", se entiende cualquier mamífero y, más especialmente, los seres humanos, hombres y mujeres, de cualquier edad, incluidos los niños.

25 La expresión "**composición farmacéutica**" se refiere a las preparaciones que permiten la actividad biológica de los principios activos y que no contiene ningún componente adicional tóxico para los sujetos a los que se administra la composición.

30 *Factor VII transgénico*

La expresión "**Factor VII**" o "**FVII**" incluye polipéptidos que comprenden la secuencia 1-406 del factor VII humano de tipo natural (como se describe en la patente de Estados Unidos 4.784.950), o del FVII derivado de otra especie (por ejemplo
5 bovino, porcino, canino, murino). Comprende además las variaciones alélicas naturales del factor VII que puedan existir, y cualquier forma o grado de glucosilación u otra modificación posterior a la traducción. La expresión "Factor VII" incluye, por tanto, las variantes del FVII que tienen la
10 misma actividad biológica, o una actividad biológica superior con respecto a la actividad de la forma natural, incluyendo especialmente estas variantes polipéptidos que difieren del FVII natural por inserción, delección o sustitución de uno o varios aminoácidos.

15

Salvo que se indique otra cosa, en la presente descripción, la expresión "Factor VII" se refiere indistintamente al FVII no escindido (cimógeno) o al Factor VII activado (FVIIa).

20

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

Por "**factor VII recombinante**", se entiende cualquier factor VII obtenido mediante ingeniería genética y que sea el resultado de la expresión del gen correspondiente en cualquier
30 microorganismo, planta o planta transgénica. Por microorganismo, se entiende cualquier sistema bacteriano,

fúngico, vírico o celular. El factor VII recombinante también se puede producir a partir de un cultivo de células eucariotas tales como células de planta o mamífero, por ejemplo, células animales o humanas.

5

Por "**factor VII transgénico**", se entiende cualquier factor VII recombinante obtenido a partir de un animal transgénico para el factor VII.

10

Por "**animal transgénico**", se entiende cualquier animal no humano que presente una modificación de su genoma destinado a permitir la expresión de una proteína de interés (en este punto, del factor VII). La modificación del genoma puede ser el resultado de una alteración, de una modificación o de la inserción de un gen. Esta modificación se puede deber a la acción de agentes que de alteración o mutágenos clásicos, o bien realizada por mutagénesis dirigida. La modificación del genoma también puede ser el resultado de una inserción de uno o varios genes o de la sustitución de uno o varios genes en (su) forma natural o mutada. El animal transgénico se puede seleccionar, de una forma no limitativa, entre conejo, cabra, vaca, camello, hámster, ratón, rata, caballo, lechona, dromedario, oveja, llama. En una realización particular, se puede seleccionar un animal que no exprese la $\alpha_{1,3}$ -galactosiltransferasa.

25

Mediante la expresión "**actividad biológica del factor VIIa**", se entiende la capacidad del FVIIa para generar trombina, por ejemplo, en la superficie de plaquetas activadas. La actividad del factor VII se puede evaluar de diferentes formas. La actividad biológica del FVII se puede cuantificar,

30

por ejemplo, midiendo la capacidad de una composición de FVII para fomentar la coagulación de la sangre utilizando un plasma deficiente en FVII y en tromboplastina, como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.997.864. En
5 dicho ensayo, la actividad biológica se evalúa con respecto a una muestra testigo y se convierte en "unidades FVII" por comparación con un suero humano estandarizado combinado que contiene 1 unidad/ml de actividad del Factor VII. Alternativamente, la actividad biológica del factor VII se
10 puede cuantificar mediante (i) la medida de la capacidad del Factor VIIa para producir factor Xa en un sistema que comprende el factor tisular (FT) incluido en una membrana lipídica y del Factor X (Persson *et al.* J. Biol. Chem. 272: 19919-19924, 1997); (ii) midiendo el hidrolizado del factor X en un sistema
15 acuoso; (iii) midiendo la unión física entre el FVIIa y el FT mediante resonancia de plasmón superficial (Persson, FEBS Letts, 413:359-363, 1997), (iv) midiendo la hidrólisis de un sustrato sintético o (v) midiendo la generación de trombina en un sistema *in vitro* independiente del FT.

20

En una realización preferente, el FVII descrito en este punto es un polipéptido cuya secuencia peptídica puede ser la del FVII humano natural, es decir, la secuencia presente en los seres humanos que no tienen trastornos vinculados al FVII.
25 Una secuencia de ese tipo se describe en el documento EP 0 200 421.

Ventajosamente, la secuencia del FVII utilizada en la invención es la secuencia SEQ ID NO: 1.

30

Por "**sinergia**" o "**efecto sinérgico**", preferentemente se

entiende un efecto de la combinación de dos productos superior, 2 veces la suma de los efectos de cada uno de los productos tomados por separado. Según la presente invención, durante la utilización de un FVIIa transgénico junto con un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X se obtiene un efecto sinérgico que permite obtener un efecto superior a 2 veces la suma del efecto obtenido con un FVIIa transgénico solo y el efecto obtenido con un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X solo, sobre al menos un parámetro de generación de trombina. El parámetro de generación de trombina se selecciona entre la altura de pico, la velocidad, o el potencial de trombina endógena (PTE).

En una realización particular, el FVIIa se administra a una concentración menor o igual a 105 nM, preferentemente menor de 100 nM.

En una realización particular, el anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X se administra a una concentración menor de 600 nM, preferentemente menor de 550 nM, preferentemente menor de 500 nM, preferentemente menor de 450 nM, preferentemente menor de 400 nM, preferentemente menor de 350 nM, preferentemente menor de 325 nM.

En una realización particular, el factor VII se obtiene a partir de leche de un animal transgénico.

Un método de producción de una proteína recombinante en la leche de un animal transgénico puede incluir las siguientes

etapas: una molécula de ADN sintético que comprende un gen que codifica una proteína de interés (en este punto, por ejemplo el FVII humano), estando dicho gen bajo el control de un promotor de una proteína que se secreta de forma natural en la
5 leche, se integra en un embrión de un mamífero no humano. A continuación el embrión se implanta en una hembra de mamífero de la misma especie. Una vez que el mamífero surgido del embrión se haya desarrollado lo suficiente, se induce la lactancia del mamífero, después se recoge la leche. En ese momento, la leche
10 contiene el FVII de interés secretado por el animal transgénico.

Un ejemplo de preparación de proteína en la leche de una hembra de mamífero que no es un ser humano se proporciona en
15 la solicitud de patente EP0527063, cuya enseñanza se puede seguir para la producción del factor VII de la invención.

La secreción del factor VII mediante las glándulas mamarias, que permita su secreción en la leche del mamífero
20 transgénico, implica el control de la expresión del factor VII de manera dependiente del tejido. Dichos métodos de control son bien conocidos del experto en la técnica. El control de la expresión se lleva a cabo mediante secuencias que permiten la expresión de la proteína en un tejido concreto. Se trata
25 normalmente de secuencias promotoras WAP, beta-caseína, beta-lactoglobulina y las secuencias del péptido de señalización, no siendo la lista limitante.

En una realización preferente, el factor VII de acuerdo
30 con la invención se produce en la leche de conejas transgénicas.

De manera particularmente ventajosa, la expresión en las glándulas mamarias de la coneja se lleva a cabo bajo el control del promotor de la beta-caseína bien conocido del experto en la técnica. En particular, un plásmido que contiene el promotor de la beta-caseína se prepara mediante la introducción de una secuencia que incluye el promotor del gen de la beta-caseína, preparándose dicho plásmido de manera que pueda recibir un gen extraño colocado bajo la dependencia de dicho promotor. El gen que codifica el FVII humano se integra y se coloca en dependencia del promotor de beta-caseína. El plásmido que contiene el promotor y la secuencia que codifica la proteína de interés se digiere mediante enzimas de restricción para liberar el fragmento de ADN que contiene el promotor de la beta-caseína y la secuencia del FVII humano. Tras la purificación, los fragmentos se introducen, mediante microinyección, en el pronúcleo macho de embriones de conejos de tipo silvestre. A continuación, los embriones se cultivan antes de su transferencia al oviducto de hembras de tipo silvestre preparadas con hormonas. Tras el parto de estas hembras, la descendencia se estudia mediante PCR para determinar los animales transgénicos. El número de copias del transgén y su integridad se establecen mediante técnica Southern a partir del ADN extraído de los gazapos transgénicos obtenidos. La concentración de FVII humano expresado en la leche de los descendientes hembra transgénicos se evalúa mediante pruebas inmunoenzimáticas.

En una realización particular, el factor VII de utilidad en la invención se obtiene mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

(a) la inserción de una secuencia de ADN que comprende un gen que codifica el factor VII en un embrión de mamífero no humano, estando dicho gen bajo el control transcripcional del promotor de beta-caseína,

5 (b) la transferencia de los embriones obtenidos en la etapa a) al oviducto de hembras de mamíferos no humanos para que se desarrolle hasta llegar a un mamífero no humano adulto,

(c) la inducción de la lactancia en el mamífero no humano adulto obtenido en la etapa b) de tipo hembra o en un
10 descendente hembra de este mamífero no humano en cuyo genoma se han introducido el gen y su promotor,

(d) la recogida de la leche de dicho mamífero no humano, y

(e) la purificación del FVII presente en la leche recogida.

15 El FVII transgénico de utilidad en este punto tiene un punto isoeléctrico sustancialmente homogéneo.

Por "**punto isoeléctrico**" o "**pi**", se entiende el valor del pH en el cual la carga elemental neta de la molécula del factor
20 VII o del factor VIIa es cero, es decir, el valor del pH para el cual la molécula es eléctricamente neutra (forma de ion híbrido). El punto isoeléctrico del factor VII de acuerdo con la invención se puede medir aplicando una técnica conocida del experto en la materia, como el isoelectroenfoque o *iso-electric*
25 *focusing* ("IEF"). Esta técnica electroforética permite separar las proteínas en función de su punto isoeléctrico. Esta técnica consiste en una migración, inducida por una corriente eléctrica uniforme, de las proteínas en un gradiente de pH hasta que alcanzan un pH equivalente a su punto isoeléctrico específico,
30 momento en el que dejan de migrar, ya que su carga neta es cero. Para determinar el punto isoeléctrico de una proteína

dada se utilizan geles de IEF.

Por "**sustancialmente homogéneo**", se entiende que al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 % de las moléculas del factor VII de la composición, tienen un punto isoeléctrico comprendido en una desviación estándar de la unidad de pH menor o igual a 1,2. En otra realización de la invención, al menos un 50 %, preferentemente, al menos un 55 %, preferentemente un 60 % de las moléculas del factor VII de la composición tienen un punto isoeléctrico comprendido en una desviación estándar de la unidad de pH menor de 1, preferentemente menor de 0,5. En otra realización preferida, al menos un 50 %, preferentemente, al menos un 55 %, preferentemente un 60 % de las moléculas del factor VII de la composición tienen un punto isoeléctrico comprendido en una desviación estándar de la unidad de pH menor de 0,4.

Por "**formas de N-glucano**", se entiende el conjunto de formas de N-glucano presentes en los dos sitios de N-glucosilación del factor VII de la invención. Las formas de N-glucano se denominan monocargadas, si su carga total es igual a 1. En el sentido de la presente invención, por "carga", se entiende un grupo fosfato, un grupo sulfato o una molécula de ácido siálico. Así, las formas de N-glucano se denominan monocargadas, si contienen solamente un grupo fosfato o un grupo sulfato o una molécula de ácido siálico. Por oposición al término "monocargada", el término "bicargada" significa que la carga total de las formas de N-glucano es igual a 2, es decir, que presentan dos cargas seleccionadas entre un grupo fosfato, un grupo sulfato y/o una molécula de ácido siálico. En otras palabras, las formas de N-glucano bicargadas tienen

una molécula de ácido siálico y un grupo fosfato, o una molécula de ácido siálico y un grupo sulfato, o dos moléculas de ácido siálico, o dos grupos fosfato, o dos grupos sulfato, o un grupo fosfato y un grupo sulfato. El término "tricargada" significa
5 que la carga total de las formas de N-glucano es igual a 3, es decir, que presentan tres cargas seleccionadas entre un grupo fosfato, un grupo sulfato y/o una molécula de ácido siálico. En otras palabras, las formas de N-glucano tricargadas tienen una molécula de ácido siálico y un grupo fosfato y un grupo
10 fosfato, o dos moléculas de ácido siálico y un grupo fosfato, o dos moléculas de ácido siálico y un grupo fosfato, o un grupo de ácido siálico y dos grupos fosfato, o un grupo de ácido siálico y dos grupos sulfato, o un grupo fosfato y dos grupos sulfato, o un grupo sulfato y dos grupos fosfato o tres
15 moléculas de ácido siálico, o tres grupos fosfato o tres grupos sulfato. El término "neutro", por su parte, significa que las formas de N-glucano no contienen ninguna carga.

La carga de las formas de N-glucano del factor VII de
20 acuerdo con la invención se puede medir aplicando una técnica conocida del experto en la materia, especialmente, mediante cromatografía líquida de alta resolución con una resina de intercambio aniónico acoplada a un detector de fluorescencia (AEX-UPLC/FD). Este método permite separar las diferentes
25 formas de N-glucano según su carga aparente (véase, en particular, Hermentin et al, Glycobiology, vol.6, n.º 2, 1996). En el marco de una cromatografía de intercambio aniónico, como fase estacionaria se utiliza una resina cargada positivamente. Estas resinas cargadas positivamente están generalmente
30 formadas por un polímero reticulado o gel, en el que se injerten grupos de carga positiva. De acuerdo con una realización

ventajosa de la invención, se utiliza una columna de intercambio aniónico débil de tipo aminopropilo.

En el caso de la composición del factor VII de acuerdo con la invención, parece que entre todas las formas de N-glucano del factor VII de la composición, al menos un 50 % de las formas de N-glucano, al menos un 60 % de las formas de N-glucano, preferentemente, al menos un 65 %, preferentemente, al menos un 70 %, preferentemente, al menos un 75 %, preferentemente, al menos un 80 %, preferentemente, al menos un 85 %, preferentemente, al menos un 90 %, preferentemente, al menos un 95 %, están monocargadas. En una realización preferente, las moléculas del factor VII que presentan formas de N-glucano monocargadas representan entre un 50 % y un 95 % de las moléculas del factor VII de la composición, preferentemente entre un 50 % y un 90 % de las moléculas del factor VII de la composición, preferentemente entre un 50 % y un 80 % de las moléculas del factor VII de la composición, preferentemente entre un 50 % y un 75 % de las moléculas del factor VII de la composición, preferentemente entre un 50 % y un 70 % de las moléculas del factor VII de la composición, preferentemente entre un 50 y un 65 % de las moléculas del factor VII de la composición, preferentemente entre un 50 % y un 60 % de las moléculas del factor VII de la composición.

25

El punto isoeléctrico sustancialmente homogéneo de la composición del factor VII de la combinación de acuerdo con la invención es el resultado de la combinación entre las propiedades de glucosilación y de γ -carboxilación de las moléculas de FVII que la componen.

30

El factor VII transgénico de utilidad en este punto tiene características de modificaciones posteriores a la traducción. En particular, se trata de modificaciones de la glucosilación, tales como dos sitios de N-glucosilación con un índice cero o muy bajo de Gal α 1,3Gal en la composición de FVII, o incluso bastante bajo para no ser inmunógeno. Por el contrario, el FVII descrito en este documento no es un FVII plasmático, es decir, que no es un producto purificado a partir de plasma humano o animal. Más particularmente, el FVII transgénico de utilidad en este punto tiene modificaciones posteriores a la traducción, así como dos sitios de O-glucosilación con motivos glucémicos definidos, una γ -carboxilación y puentes disulfuro específicos.

El FVIIa de utilidad en este punto puede incluir varias modificaciones posteriores a la traducción: los nueve o diez primeros ácidos glutámicos del extremo N están γ -carboxilados, el Asp₆₃ está especialmente hidroxilado, la Ser₅₂ y la Ser₆₀ están O-glucosilados e incluyen respectivamente los motivos Glucosa(Xilosa)₀₋₂ y Fucosa, la Asn₁₄₅ y la Asn₃₂₂ están N-glucosiladas principalmente mediante estructuras complejas birramificadas monosialiladas.

Ventajosamente, las moléculas del factor VII transgénico de utilidad en este punto presentan, en al menos un 80 % de las mismas, una γ -carboxilación en nueve restos de ácido glutámico. En otra realización, al menos un 85 % de dichas moléculas presentan una γ -carboxilación en nueve restos de ácido glutámico. En otra realización, entre el 85 % y 100 %, preferentemente entre el 90 % y el 100 %, preferentemente entre el 95 % y el 100 % de dichas moléculas presentan una γ -

carboxilación en nueve restos de ácido glutámico. Ventajosamente, el índice de γ -carboxilación en el resto de ácido glutámico 35 (Glu 35) de las moléculas del factor VII de la composición es menor del 20 %. En otra realización, el
5 índice de γ -carboxilación del resto Glu35 es menor del 15 %, preferentemente menor del 10 %, preferentemente menor del 5 %.

El motivo Gal α 1,3Gal es una estructura compuesta por dos galactosas unidas en α 1,3. Está situado en un extremo de las
10 ramas de oligosacáridos de las estructuras unidas a N. Se sabe que este motivo es inmunógeno. Por tanto, se prefiere producir un FVII o un FVIIa cuyo índice de estructuras Gal α 1,3Gal sea cero o tan bajo que no se pueda distinguir del ruido de fondo obtenido en las mediciones realizadas con los equipos de
15 análisis actualmente disponibles. Esta expresión designa de manera equivalente cualquier FVII transgénico cuyo índice de Gal α 1,3Gal esté cercano al del FVII plasmático. Ventajosamente, el índice de Gal α 1,3Gal de la composición de FVII descrita en el presente documento no es inmunógeno para el ser humano.
20 Además, el FVII de utilidad en este punto incluye, preferentemente, como el FVII humano, dos sitios de N-glucosilación, en las posiciones 145 y 322, y 2 sitios de O-glucosilación, en las posiciones 52 y 60. En un sitio de N-glucosilación, las cadenas de oligosacáridos están unidas a
25 una asparagina (unidas a N). En un sitio de O-glucosilación, las cadenas de oligosacáridos están unidas a una serina. Los motivos unidos a estos aminoácidos serán diferentes para cada proteína de la composición. Sin embargo, se puede cuantificar, para la totalidad de la composición, el índice de cada motivo
30 de glucano, o incluso de cada azúcar.

Los porcentajes de los diferentes glucanos proporcionados en la presente solicitud no tienen en cuenta la O-glucosilación.

5 Preferentemente, la composición de FVII se caracteriza por que, entre todos los motivos de glucano del FVII de la composición, al menos un 40 % son formas de glucano birramificadas, monosialiladas. En otra realización, las formas birramificadas monosialiladas están presentes en al
10 menos un 50 %. En otra realización, las formas birramificadas monosialiladas están presentes en al menos un 60 %, preferentemente, al menos un 65 %, preferentemente, al menos un 70 %.

15 Ventajosamente, las formas de glucano birramificadas monosialiladas del FVII son mayoritarias. La composición de FVII se caracteriza por que al menos algunos de los ácidos siálicos del factor VII incluyen enlaces $\alpha 2-6$.

20 Ventajosamente, al menos un 65 % de los ácidos siálicos del FVII incluyen enlaces $\alpha 2,6$. De manera muy ventajosa, al menos un 70 %, es decir un 80 % y, en particular, al menos un 90 % de los ácidos siálicos del FVII incluyen enlaces $\alpha 2,6$.

25 De una manera particularmente preferida, todos los ácidos siálicos incluyen enlaces $\alpha 2,6$, es decir, que todos los ácidos siálicos están unidos a la galactosa mediante un enlace $\alpha 2,6$. La composición de FVII descrita en el presente documento puede comprender, además, ácidos siálicos con enlaces $\alpha 2-3$.

30

De acuerdo con realizaciones de la invención, de 65 % al

100 % de los ácidos siálicos del FVII incluyen enlaces $\alpha 2,6$.
De manera más preferida, de 70 % u 80 % al 100 % de los ácidos
siálicos del FVII incluyen enlaces $\alpha 2,6$.

5 Ventajosamente, entre las formas de glucano
birramificadas monosialiladas del FVII, las formas de glucano
mayoritarias no están fucosiladas.

Preferentemente, estas formas de glucano birramificadas
10 monosialiladas no fucosiladas están presentes en el FVII de la
composición con un índice superior al 20 %. Ventajosamente,
este índice es superior al 25 % o incluso superior al 40 %. De
una manera especialmente ventajosa, el índice de fucosilación
de la composición de FVII está comprendido entre 20 % y el
15 50 %. En una realización, este índice puede ser menor del 20 %.

En una realización particular, al menos un 10 %, preferentemente, al menos un 15 %, preferentemente, al menos un 20 %, preferentemente al menos un 25 % de las formas de N-
20 glucano de los factores VII de la composición tienen un alto
contenido en manosa/híbrido.

Preferentemente, el perfil de glucosilación descrito en
el presente documento transmite al FVII una actividad biológica
25 y una estabilidad mejoradas. Las composiciones del factor VII
muestran un punto isoelectrico sustancialmente homogéneo, lo
que facilita la etapa de formulación a un pH óptimo,
preferentemente, a un pH óptimo de $6,0 \pm 0,2$, de las
composiciones farmacéuticas, evitando al mismo tiempo la
30 precipitación del FVII. En efecto, se sabe que, en el punto
isoelectrico de una molécula, estas tendrán tendencia a

agregarse y a precipitar. Las moléculas del factor VII utilizadas en la composición de la invención tienen un punto isoeléctrico comprendido entre 6,6 y 7,0. Esto da como resultado una mejor estabilidad de la composición de factor VII, especialmente cuando esta se formula a un pH inferior al punto isoeléctrico y, en particular, a pH 6,0. La mejora de la estabilidad de la composición de factor VII permite evitar las interacciones electrostáticas responsables de los fenómenos de precipitación y de agregación de tipo soluble e insoluble, así como evitar la pérdida de materia prima y, por tanto, una disminución del rendimiento que produzca una pérdida de cantidad de principio activo y, por tanto, potencialmente, una pérdida de actividad.

En una realización preferente, el FVII transgénico se produce en la leche de la coneja, lo que permite obtener una composición donde cada molécula del factor VII de la composición tiene dos sitios de N-glucosilación. Preferentemente, todas las moléculas de FVII de la composición tienen un índice de motivos de glucano $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$ menor del 4 %, incluso cero. Así, de manera ventajosa, el FVII transgénico producido por la coneja no tiene un motivo de glucano $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$.

El FVII se puede purificar a partir de la leche mediante técnicas conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, un método de purificación de una proteína de interés a partir de leche, como se describe en la patente US 6.268.487, puede incluir las siguientes etapas, que consisten en: a) someter la leche a una filtración tangente sobre una membrana de porosidad suficiente para formar un retenido y un filtrado, conteniendo

el filtrado la proteína exógena, b) someter el filtrado a un equipo de captura cromatográfica para 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
5 separe de los lípidos, las micelas de las caseínas, y que se recupere el FVII.

Ventajosamente, el FVII de la invención está en forma activada. En una realización, el FVII se puede activar *in vitro*
10 mediante factores Xa, VIIa, IIa, IXa o XIa. El FVII también se puede activar típicamente durante su procedimiento de purificación, en particular, mediante el paso por columnas de cromatografía cargadas positivamente.

15 *Anticuerpo multiespecífico*

Por "**anticuerpo multiespecífico**", se entiende cualquier anticuerpo que tenga al menos dos sitios de unión específica con al menos dos antígenos diferentes, o epítomos diferentes
20 de un mismo antígeno. El término "específico" significa que el anticuerpo tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, sustancialmente sin reacción cruzada con otro antígeno. De manera ventajosa, el anticuerpo tiene, para cada antígeno, una constante de afinidad K_d de al menos 10^{-6} M,
25 preferentemente al menos 10^{-7} M, aún más preferentemente al menos 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M.

Así, los anticuerpos de utilidad en la invención tienen la capacidad de unirse específicamente al mismo tiempo al
30 factor de coagulación IX y al factor de coagulación X en forma tanto activada como no activada. El anticuerpo utilizado en la

invención, que tiene la capacidad de unirse específicamente al mismo tiempo al factor de coagulación IX y al factor de coagulación X tiene preferentemente la capacidad de actuar como sustituto del factor VIII (FVIII), lo que significa que el anticuerpo favorece la activación del FX mediante el FIXa.

Dichos anticuerpos multiespecíficos, preferentemente biespecíficos, se pueden obtener por diversos métodos conocidos del experto en la técnica, por ejemplo, mediante conjugación química, o utilizando cuadromas, que son el resultado de la fusión entre dos hibridomas que producen dos anticuerpos monoclonales diferentes; o también mediante recombinación genética.

Los polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos se pueden insertar, por lo tanto, en vectores de expresión y expresarse en células u organismos hospedadores adaptados mediante técnicas bien conocidas del experto en la materia.

Los anticuerpos de utilidad en este punto pueden tener un formato muy sencillo, contruidos a partir de fragmentos Fv monocatenarios (scFv) de dos anticuerpos o más, asociados mediante un enlazador peptídico adaptado. Por "Fv", se entiende el fragmento de anticuerpo más pequeño que conserva las propiedades de reconocimiento y de unión con el antígeno. Un fragmento "Fv" es un dímero (dímero $V_H + V_L$) constituido por una región variable (V_H) contenida en una cadena pesada (H) y una región variable (V_L) adyacente contenida en una cadena ligera (L).

30

Alternativamente, puede tratarse de un anticuerpo de

longitud completa, que preferentemente contiene una región Fc. Son posibles varias formas. Por ejemplo, en un primer formato, los fragmentos scFv de un anticuerpo A se fusionan en los extremos (en general, los extremos N) de las cadenas pesadas de un anticuerpo B. El anticuerpo resultante tiene un solo tipo de cadena pesada, que contiene los dominios VH, CH1, CH2 y CH3 del anticuerpo B y los dominios VH y VL del anticuerpo A, y un solo tipo de cadena ligera que contiene los dominios VL y CL del anticuerpo B (Qu *et al.* Blood, 111, 2211-2219, 2008). En un segundo formato, la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo A se asocian con la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo B. En su caso, se pueden introducir mutaciones, por ejemplo de tipo "botón en ojal" (Ridgway *et al.*, Protein Eng, 9, 617-21, 1996; patente US 7.695.936) para evitar los emparejamientos incorrectos.

Salvo que se indique otra cosa, en la presente descripción, la expresión "Factor IX" se refiere indistintamente al Factor IX no activado o al Factor IX activado (FIXa).

Salvo que se indique otra cosa, en la presente descripción, la expresión "Factor X" se refiere indistintamente al Factor X no activado o al Factor X activado (FXa).

25

Un anticuerpo que reconozca (i) el FIX y/o el FIXa, y (ii) el FX y/o el FXa se puede obtener especialmente según los métodos descritos en las solicitudes de patente W02005/035756, W02006/109592 o W02012/067176.

30

En una realización preferente, dicho anticuerpo es el

emicizumab. La producción de este anticuerpo se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente W02018047813 o en la solicitud de patente EP1688488.

5 *Composiciones farmacéuticas y posologías*

El factor VII y el anticuerpo se pueden formular como composiciones farmacéuticas independiente, o combinadas en una misma composición farmacéutica. En el caso de administración
10 independiente, el FVII y el anticuerpo se pueden formular de una forma adaptada a una administración por vías diferentes o iguales.

Por lo tanto, el FVII se puede administrar, por ejemplo,
15 por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular.

El anticuerpo se puede administrar también, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular.

20 Una composición de Factor VII puede ser, por ejemplo, tal como la descrita en la solicitud de patente W02010/149907.

Así, en un ejemplo de realización, la composición comprende:

- 25 - factor VII, preferentemente, en forma de factor Vlla;
- arginina, opcionalmente, en forma de clorhidrato;
- isoleucina;
- lisina;
- glicina;
- 30 - citrato trisódico o cloruro de calcio;
- y en su caso, polisorbato 80 o polisorbato 20.

Más particularmente, la composición puede comprender:

- factor VII, preferentemente, en forma de factor Vlla;
- de 10 a 40 g/l de arginina, opcionalmente, en forma de clorhidrato;
- 5 - de 4,2 a 6,6 g/l de isoleucina;
- de 0,6 a 1,8 g/l de lisina;
- de 0,6 a 1,8 g/l de glicina;
- de 0 a 0,2 g/l de citrato trisódico o de 1 a 2 g/l de cloruro de calcio;
- 10 - y en su caso, de 0 a 0,5 g/l de polisorbato 80.

La composición de FVII, que comprende opcionalmente también al menos un anticuerpo multiespecífico tal como se ha descrito en el presente documento, se puede almacenarse en
15 forma líquida o en forma sólida, obtenida típicamente mediante desecación. Las concentraciones anteriormente divulgadas se determinar respecto de las composiciones en forma líquida, antes de la desecación, o después de la reconstitución en forma de preparación inyectable.

20

La desecación es un proceso de eliminación del agua en una etapa posterior. Se trata de una deshidratación destinada a eliminar la mayor cantidad de agua posible. Este fenómeno puede ser natural o forzado. Esta desecación se puede realizar
25 mediante técnicas de liofilización, de atomización y de crioatomización.

La manera preferida para obtener la forma sólida de la composición de uso farmacéutico descrita en el presente
30 documento es la liofilización.

Los métodos de liofilización son bien conocidos del experto en la materia, véase por ejemplo [Wang et al, Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, International Journal of Pharmaceutics, Vol 5 203, p 1-60, 2000].

Se pueden prever otros procedimientos adecuados para reducir el grado de humedad o el contenido en agua de la composición. Preferentemente, el grado de humedad es menor o
10 igual al 3 % en peso, preferentemente, menor o igual al 2,5 %, preferentemente, menor o igual al 2 %, preferentemente, inferior o igual al 1,5 %.

La composición sólida, preferentemente en forma
15 liofilizada, se puede disolver en agua para la preparación inyectable (o "water for injection o WFI"), para obtener una formulación de uso terapéutico.

La formulación inyectable se puede administró por vía
20 parenteral (intravenosa, subcutánea, intramuscular), en una cantidad determinada por el médico a cargo del tratamiento. La administración de la forma líquida (antes de la desecación) o de la forma sólida, por cualquier vía y medio adecuados, no se excluye.

25

La dosificación del FVII de utilidad en la invención, se puede determinar de manera adecuada dependiendo del tipo de formulación, el método de administración, la edad y el peso del paciente, los síntomas del paciente, la gravedad de la
30 enfermedad, etc.

La dosis del FVII a administrar de acuerdo con la invención se puede seleccionar ventajosamente entre 270 µg/kg y 2,70 µg/kg. De manera preferida, la dosis del FVII a administrar es menor de 270 µg/kg de peso corporal, de manera preferida, es menor de 225 µg/kg de peso corporal, de manera preferida, es menor de 180 µg/kg de peso corporal, de manera preferida, es menor de 135 µg/kg de peso corporal, de manera preferida, es menor de 90 µg/kg de peso corporal, de manera preferida, es menor de 45 µg/kg de peso corporal, de manera preferida, es menor de 9 µg/kg, de manera preferida, es menor de 5,4 µg/kg, de manera preferida, es menor de 2,7 µg/kg.

Una composición de anticuerpo multiespecífico, como el anticuerpo emicizumab, es una, por ejemplo, como las descritas en las solicitudes de patente W02017/188356 y W02018/047813.

Así, en un ejemplo de realización, la composición es una composición líquida.

En un ejemplo de realización, la composición comprende:

- anticuerpo biespecífico del factor IX y del factor X,
- un tensioactivo tal como el poloxámero 188 o el polisorbato 20
- tampón histidina - ácido aspártico
- arginina

Más particularmente, la composición puede comprender:

- de 20 mg/ml a 180 mg/ml de anticuerpo biespecífico del factor IX y del factor X,
- de 0,2 mg/ml a 1 mg/ml de poloxámero 188,
- de 10 mM a 40 mM de tampón histidina-ácido aspártico
- de 100 mM a 300 mM de arginina,

30

a un pH comprendido entre 4,5 y 6,5

La dosificación de la composición de anticuerpo multiespecífico, tal como el anticuerpo emicizumab, de utilidad
5 en la invención, se puede determinar de manera adecuada dependiendo del tipo de formulación, el método de administración, la edad y el peso del paciente, los síntomas del paciente, la gravedad de la enfermedad, etc. La dosis de anticuerpo puede ser por ejemplo de 0,3 a 5 mg/kg,
10 preferentemente como máximo de 3 mg/kg una vez a la semana durante un período de inicio, que puede durar por ejemplo 4 semanas, seguido de una dosis de mantenimiento, que preferentemente es más baja, por ejemplo de 1,5 mg/kg una vez a la semana. De manera preferida, la dosis del anticuerpo
15 administrada es menor de 5 mg/kg de peso corporal, de manera preferida, es menor de 3 mg/kg de peso corporal, de manera preferida, es menor de 1,5 mg/kg de peso corporal, de manera preferida, es menor de 1 mg/kg de peso corporal, de manera preferida, es menor de 0,5 mg/kg de peso corporal, de manera
20 preferida, es menor de 0,1 mg/kg de peso corporal, de manera preferida, es menor de 0,05 mg/kg de peso corporal.

La composición de anticuerpo de utilidad en la invención se puede administrar a un paciente por cualquier vía adecuada,
25 por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, transdérmica, subcutánea, intraarticular, sublingual, intrasinovial, oral o por inhalación. Preferentemente, se prefiere la vía intravenosa o la vía subcutánea.

30

De acuerdo con una realización particular, el factor VII

y el anticuerpo se administran simultáneamente al paciente.

De acuerdo con otra realización particular, el factor VII
y el anticuerpo se administran por separado a un paciente,
5 preferentemente de manera secuencial.

Indicaciones terapéuticas

La combinación descrita en el presente documento permite
10 prevenir o tratar trastornos de la coagulación, especialmente
las hemofilias que tienen déficit de factor VIII (hemofilia de
tipo A, preferentemente hemofilia A adquirida).

Preferentemente, los pacientes son pacientes que tienen
15 una hemofilia de tipo A, con anti-Factor VIII.

La combinación descrita en el presente documento permite
prevenir o tratar trastornos de la coagulación, especialmente
las deficiencias de factores VII.

20

La combinación descrita en el presente documento permite
asociar el efecto rápido del FVII que activa la vía extrínseca
de la cascada de la coagulación y el efecto prolongado de los
anticuerpos multiespecíficos descritos en el presente
25 documento que activan la ruta intrínseca de la cascada de la
coagulación. La combinación permite ofrecer un mejor
tratamiento para los pacientes.

Ejemplos:

30

Ejemplo 1: Purificación y extracción del FVII transgénico

El procedimiento de purificación y extracción del factor VII que se aplica en este ejemplo es el descrito en la solicitud EP12305882. Se describen a continuación las etapas de este procedimiento. Se obtiene leche de conejas transgénicas a partir de la línea de conejas transgénicas. La leche de conejas transgénicas congelada se descongela y se concentra en forma de combinado de leche de conejas transgénicas.

El combinado de leche de conejas transgénicas así obtenido, se somete después a una etapa de clarificación utilizando un filtro de lecho profundo que tiene una porosidad de 0,2 μm , para eliminar los lípidos y los compuestos insolubles. La leche así clarificada se somete después a una etapa de inactivación vírica mediante tratamiento con un disolvente de tipo detergente, por ejemplo Polisorbato 80 o Tri-n-Butilfosfato a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos dos horas. Dicho tratamiento permite especialmente inactivar eficazmente los virus y, en particular, los virus de tipo virus no encapsulados. La leche clarificada y víricamente inactivada se somete a continuación a una etapa de cromatografía de afinidad usando un ligando de afinidad específico del factor VII/factor VIIa. El eluido de factor VII obtenido al finalizar esta etapa de cromatografía, se somete a continuación a una etapa de ultrafiltración y de formulación, pudiendo obtener de esta manera un concentrado de factor VII intermedio que tiene una pureza del 95 %.

El concentrado de factor VII intermedio se somete a continuación a una etapa de filtración mediante un filtro que tiene una porosidad de 0,1 μm a 0,2 μm seguido de una etapa de nanofiltración con filtros que tienen una porosidad de 20 nm y

después de 15 nm. El producto así obtenido y que contiene el factor VII se somete a continuación a una etapa de cromatografía de tipo gel Q Sepharose XL después a una etapa de cromatografía de tipo CHT-I seguida de una cromatografía de tipo SEC Superdex 200. El concentrado de factor VII así obtenido se somete a continuación a una etapa de estabilización y después de filtración con un filtro que tiene una porosidad de 0,2 µm.

El procedimiento así descrito permite obtener un concentrado de factor VII que tiene una pureza del aproximadamente el 99,9995 %.

Ejemplo 2: Comparación del potencial trombogénico de Novoseven®, Sevenfact® y Hemlibra®

El experto en la materia puede medir el potencial trombogénico de Novoseven®, Sevenfact® y Hemlibra® (también denominado como Emicizumab) mediante el protocolo siguiente.

Reactivos:

- patrón de trombina (Stago)
- reactivo PPP 5 pM (Stago)
- reactivo PPP low (Stago)
- CK-Prest (Stago)
- Fluo-buffer (Stago)
- Fluo-substrat (Stago)
- Plasma deficiente en FVIII (Siemens)
- Sevenfact®/Factor VII transgénico producido en conejo
- 1 mg/ml (LFB)
- PNP (Cryo pep)

- Novoseven® (NovoNordisk)
- Hemlibra®/Emicizumab (Roche / Genentech / Chugai)

Método:

5

El ensayo de generación de trombina consiste en activar la coagulación *ex vivo* tanto con una mezcla de factor tisular y fosfolípidos (TF/PL), como utilizando cefalina y midiendo después la concentración de trombina generada con el tiempo.

10

- Medida del potencial trombogénico de Novoseven® tras la inducción de la coagulación con TF/PL:

El ensayo de generación de trombina se realizó sobre 80 µl de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita un plasma de hemofilia A en presencia de 20 µl de reactivo PPP (Stago) que contenía 0,5 pM de Factor tisular (TF) y 4 µM de fosfolípidos (PL). La reacción se inició por adición de 20 µl de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el inicio de la medida de generación de la trombina.

La dosis terapéutica del FVIIa es de 270 µg/kg, que corresponde a 6 µg/ml de FVIIa en plasma, teniendo en cuenta una recuperación del 100 %. El ensayo de generación de trombina se realizó con dosis de Novoseven® de 0 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml y 6 µg/ml, en presencia de 0,5 pM TF/2 µM PL (inductor de la coagulación).

- Medida del potencial trombogénico de Novoseven® tras la inducción de la coagulación con cefalina:

30

El ensayo de generación de trombina se realizó sobre 80 µl de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita un plasma de hemofilia A en presencia de 20 µl de cefalina (CK-Prest reconstituida con 5 ml de H₂O destilada).

5

La reacción se inició por adición de 20 µl de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el inicio de la medida de generación de la trombina.

10

El ensayo de generación de trombina se realizó con dosis de Novoseven® de 0 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml y 6 µg/ml, en presencia de 20 µl de cefalina (inductor de la coagulación).

15

- Medida del potencial trombogénico de Sevenfact® tras la inducción de la coagulación con TF/PL:

20

El ensayo de generación de trombina se realizó sobre 80 µl de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita un plasma de hemofilia A en presencia de 20 µl de reactivo PPP (Stago) que contenía 0,5 pM de Factor tisular (TF) y 4 µM de fosfolípidos (PL). La reacción se inició por adición de 20 µl de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el inicio de la medida de generación de la trombina.

25

El ensayo de generación de trombina se realizó con dosis de Sevenfact® de 0 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml y 6 µg/ml, en presencia de 0,5 pM TF/2 µM PL (inductor de la coagulación).

30

- Medida del potencial trombogénico de Sevenfact® tras la

inducción de la coagulación con cefalina:

El ensayo de generación de trombina se realizó sobre 80 µl de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita un plasma de hemofilia A en presencia de 20 µl de cefalina (CK-Prest reconstituida con 5 ml de H2O destilada).

La reacción se inició por adición de 20 µl de Fluca-kit (sustrato + CaCl_2) que es el inicio de la medida de generación de la trombina.

El ensayo de generación de trombina se realizó con dosis de Sevenfact® de 0 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml y 6 µg/ml, en presencia de 20 µl de cefalina.

15

- Medida del potencial trombogénico de Hemlibra® tras la inducción de la coagulación con TF/PL:

El ensayo de generación de trombina se realizó sobre 80 µl de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita un plasma de hemofilia A en presencia de 20 µl de reactivo PPP (Stago) que contenía 0,5 pM de Factor tisular (TF) y 4 µM de fosfolípidos (PL).

La reacción se inició por adición de 20 µl de Fluca-kit (sustrato + CaCl_2) que es el inicio de la medida de generación de la trombina.

Hemlibra® (Roche/Genentech/Chugai, EE. UU.), un anticuerpo biespecífico que imita la función del FVIII, se utilizó a la concentración máxima de 50 µg/ml, que es la

concentración detectada en el paciente en tratamiento (Oldenburg *et al.* NEJM, 2017). El ensayo de generación de trombina se realizó con dosis de Hemlibra® de 0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml y 50 µg/ml, en presencia de 0,5 pM TF/4 µM PL (inductor de la coagulación).

- Medida del potencial trombogénico de Hemlibra® tras la inducción de la coagulación con TF/PL

10 El ensayo de generación de trombina se realizó sobre 80 µl de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita un plasma de hemofilia A en presencia de 20 µl de cefalina (CK-Prest reconstituida con 5 ml de H₂O destilada).

15 La reacción se inició por adición de 20 µl de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el inicio de la medida de generación de la trombina.

El ensayo de generación de trombina se realizó con dosis de Hemlibra® de 0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml y 50 µg/ml, en presencia de 20 µl de cefalina.

Para el conjunto de estos ensayos, la aparición de la fluorescencia se midió con un fluorómetro Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) con una longitud de onda de excitación de 390 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Los trombinogramas (curvas que representan la intensidad de la fluorescencia con el tiempo) se analizaron a continuación usando el programa informático Thrombinoscope™, que convierte el valor de fluorescencia en nM de trombina mediante un cálculo comparativo.

La generación de la trombina se lleva a cabo, y las variables clave para evaluar la potencia de los diferentes medicamentos se registraron y se compararon: potencial de trombina endógena (ETP), altura de pico, tiempo de latencia y velocidad.

Ejemplo 3: Evaluación de los potenciales trombogénicos sinérgicos de Novoseven® y Hemlibra® o SevenFact® y Hemlibra®

El experto en la materia puede medir el potencial trombogénico de las combinaciones Novoseven®/Hemlibra® y Sevenfact®/Hemlibra® llevando a cabo el siguiente protocolo.

Reactivos:

Los reactivos, el autómata y el protocolo experimental en plasma deficiente en FVIII son idénticos a los descritos en el ejemplo 2.

Método:

- Medida del potencial trombogénico de la combinación Novoseven® + Hemlibra® tras inducción de la coagulación con TF/PL:

El ensayo de generación de trombina se realizó sobre 80 µl de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita un plasma de hemofilia A en presencia de 20 µl de reactivo PPP (Stago) que contenía 0,5 pM de Factor tisular (TF) y 4 µM de fosfolípidos (PL).

La reacción se inició por adición de 20 µl de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el inicio de la medida de generación de la trombina.

5 El ensayo de generación de trombina se realizó en presencia de 0,5 pM TF/4 µM PL (inductor de la coagulación) para varias combinaciones de Novoseven®/Hemlibra®. La composición que contenía la cantidad mayor de producto estaba compuesta por 6 µg/ml de Novoseven® y por 50 µg/ml de
10 Hemlibra®, en su máximo.

El potencial trombogénico obtenido en presencia de la combinación de productos se compara con el potencial de los productos en solitario. Para prever un efecto sinérgico de la
15 combinación de producto, se evaluaron dosis más bajas para garantizar que la detección de trombina no se satura.

Las composiciones estudiadas contienen:

Combinación	Hemlibra® (µg/ml)	NovoSeven® (µg/ml)
Combinación 1	50	6
Combinación 2	50	5
Combinación 3	40	4
Combinación 4	30	3
Combinación 5	20	2
Combinación 6	10	1

- 20
- Medida del potencial trombogénico de la combinación Novoseven® + Hemlibra® tras inducción de la coagulación con cefalina

25 El ensayo de generación de trombina se realizó sobre 80 µl

de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita un plasma de hemofilia A en presencia de 20 µl de cefalina (CK-Prest reconstituida con 5 ml de H₂O destilada).

5 La reacción se inició por adición de 20 µl de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el inicio de la medida de generación de la trombina.

El ensayo de generación de trombina se realizó en presencia de 20 µl de cefalina para varias combinaciones de Novoseven®/Hemlibra®. La composición que contenía la cantidad mayor de producto estaba compuesta por 6 µg/ml de Novoseven® y por 50 µg/ml de Hemlibra®, en su máximo.

15 El potencial trombogénico obtenido en presencia de la combinación de productos se compara con el potencial de los productos en solitario. Para prever un efecto sinérgico de la combinación de producto, se evaluaron dosis más bajas para garantizar que la detección de trombina no se satura.

20 Las composiciones estudiadas contienen:

Combinación	Hemlibra® (µg/ml)	NovoSeven® (µg/ml)
Combinación 1	50	6
Combinación 2	50	5
Combinación 3	40	4
Combinación 4	30	3
Combinación 5	20	2
Combinación 6	10	1

- Medida del potencial trombogénico de la combinación Sevenfact® + Hemlibra® tras inducción de la coagulación

con TF/PL

El ensayo de generación de trombina se realizó sobre 80 µl de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita un plasma de hemofilia A en presencia de 20 µl de reactivo PPP (Stago) que contenía 0,5 pM de Factor tisular (TF) y 4 µM de fosfolípidos (PL).

La reacción se inició por adición de 20 µl de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el inicio de la medida de generación de la trombina.

El ensayo de generación de trombina se realizó en presencia de 0,5 pM TF/4 µM PL (inductor de la coagulación) para varias combinaciones de Sevenfact®/Hemlibra®. El ensayo de generación de trombina se realizó en presencia de 6 µg/ml de Sevenfact® y de 50 µg/ml de Hemlibra®, en su máximo.

El potencial trombogénico obtenido en presencia de la combinación de productos se compara con el potencial de los productos en solitario. Para prever un efecto sinérgico de la combinación de producto, se evaluaron dosis más bajas para garantizar que la detección de trombina no se satura.

Las composiciones estudiadas contienen:

Combinación	Hemlibra® (µg/ml)	Sevenfact® (µg/ml)
Combinación 1	50	6
Combinación 2	50	5
Combinación 3	40	4
Combinación 4	30	3

42		
Combinación 4	20	2
Combinación 6	10	1

- Medida del potencial trombogénico de la combinación Sevenfact® + Hemlibra® tras inducción de la coagulación con cefalina

5

El ensayo de generación de trombina se realizó sobre 80 µl de un combinado de plasma deficiente en FVIII que imita un plasma de hemofilia A en presencia de 20 µl de cefalina (CK-Prest reconstituida con 5 ml de H₂O destilada).

10

La reacción se inició por adición de 20 µl de Fluca-kit (sustrato + CaCl₂) que es el inicio de la medida de generación de la trombina.

15

El ensayo de generación de trombina se realizó en presencia de 20 µl de cefalina para varias combinaciones de Sevenfact®/Hemlibra®. La composición que contenía la mayor cantidad de producto estaba compuesta por 6 µg/ml de Sevenfact® y por 50 µg/ml de Hemlibra® en su máximo.

20

El potencial trombogénico obtenido en presencia de la combinación de productos se compara con el potencial de los productos en solitario. Para prever un efecto sinérgico de la combinación de producto, se evaluaron dosis más bajas para garantizar que la detección de trombina no se satura.

25

Las composiciones estudiadas contienen:

Combinación	Hemlibra® (µg/ml)	Sevenfact® (µg/ml)
Combinación 1	50	6
Combinación 2	50	5
Combinación 3	40	4
Combinación 4	30	3
Combinación 5	20	2
Combinación 6	10	1

Para el conjunto de estos ensayos, la aparición de la fluorescencia se midió con un fluorómetro Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) con una longitud de onda de excitación de 390 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Los trombinogramas (curvas que representan la intensidad de la fluorescencia con el tiempo) se analizaron a continuación usando el programa informático Thrombinoscope™, que convierte el valor de fluorescencia en nM de trombina mediante un cálculo comparativo.

Se considera un efecto sinérgico, por ejemplo, cuando al menos uno de los parámetros calculados a partir del ensayo de generación de trombina para una combinación dada es superior a la suma de cada uno de estos parámetros obtenidos con los componentes en solitario, restado el ruido de fondo del experimento.

Ejemplo 4: Comparación del potencial de Sevenfact™, Hemlibra® y de la combinación de ambos en plasma hemofílico A:

Reactivos:

- patrón de trombina (Stago)
- reactivo PRP 1pM TF (Stago)

- reactivo MP 4 μ M PL (Stago)
- Fluo-buffer (Stago)
- Fluo-substrate (Stago)
- Sevenfact™: Factor VII transgénico producido en conejo
- 5 1 mg/ml (LFB)
- Hemlibra®: Emicizumab (Roche/Genentech/Chugai)
- Plasma hemofílico A (Cryopep)
- Owren Koller (Stago)

10 Método:

El ensayo de generación de trombina consiste en activar la coagulación *ex vivo*, por ejemplo, con una mezcla de factor tisular y fosfolípidos (TF/PL), y medir a continuación la

15 concentración de la trombina generada con el tiempo. Los ensayos de generación de trombina se realizaron con 80 μ l de plasma hemofílico A (Cryopep), en presencia de 20 μ l de una mezcla de los reactivos PRP y MP (Stago) que contenía 0,5 pM de factor tisular y 4 μ M de fosfolípidos.

20

La reacción se inició por adición de 20 μ l de Fluca-kit (Fluo substrate + CaCl_2), lo que corresponde al punto de partida de la medida de generación de la trombina (TG).

25 La fluorescencia se midió mediante fluorimetría con el equipo Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) a una longitud de onda de excitación de 390 nm y a una longitud de onda de emisión de 460 nm. Los trombinogramas se analizaron utilizando el programa informático Thrombinoscope™, que mediante cálculo

30 comparativo, convierte la intensidad de fluorescencia en concentración molar de trombina (nM).

Para medir el potencial trombogénico de ambas moléculas, se estudiaron varios plasmas hemofílicos A. La dosis terapéutica más elevada de FVIIa es de 270 µg/kg, que corresponde a 6 µg/ml de FVIIa (o 120 nM) en plasma. El uso de esta dosis se puede considerar como un potencial máximo de generación de trombina. En función de las concentraciones de producto en circulación obtenidas en los pacientes, también se estudiaron las concentraciones de Sevenfact™ comprendidas entre 20 y 100 nM. Hemlibra® (Roche/Genentech/Chugai, EE. UU.), un anticuerpo biespecífico que imita la función del FVIII, se utilizó en la concentración máxima de 120 µg/ml. La concentración actualmente detectada en los pacientes en tratamiento es de 50 µg/ml (o 300 nM) (Oldenburg *et al.* NEJM, 2017). Así, Hemlibra® se utilizó en este punto a aproximadamente 300 nM (50 µg/ml). Las variables estudiadas para medir el potencial trombogénico de Hemlibra®, de Sevenfact™ son:

- el potencial de trombina endógena (PTE): área bajo la curva que representa la cantidad total de trombina generada,
- la altura de pico: concentración máxima de trombina medida, y
- la velocidad de generación de trombina: velocidad de formación de trombina.

2 - Resultados

2.1 - Efecto de Sevenfact™ o Hemlibra® sobre los plasmas hemofílicos A

2.1.1 - Evaluación en el lote 1 de Plasma hemofílico A

En esta matriz, se obtuvieron señales muy bajas de generación de trombina procedentes de los dos compuestos, independientemente de las concentraciones utilizadas. En efecto, la generación de trombina observada es casi nula para Hemlibra® y Sevenfact™ en concentraciones de 20 y 40 nM. Con 100 nM de Sevenfact™, se observó un pico de generación de trombina muy bajo (Tabla 1).

	Sevenfact™ 20 nM	Sevenfact™ 40 nM	Sevenfact™ 100 nM	Hemlibra® 300 nM
PTE (nM.min)	125	154,25	128,75	128,25
Pico (nM)	7,105	9,46	16,55	6,41
Velocidad (nM/min)	0,59	0,84	1,64	0,42

Tabla 1: Parámetros de generación de trombina a partir del lote 1 de Plasma hemofílico A tratado con Sevenfact™ o Hemlibra®

Así, cada molécula utilizada individualmente solamente induce una generación de trombina muy baja.

2.1.2 - Evaluación en el lote 2 de Plasma hemofílico A

Se estudió un segundo lote de Plasma hemofílico A. En este caso también, se observó una generación de trombina muy baja con el uso de Hemlibra® y Sevenfact™, con un pico de generación de trombina máximo a una concentración de 100 nM de Sevenfact™ (Tabla 2).

	Sevenfact™ 20 nM	Sevenfact™ 40 nM	Sevenfact™ 100 nM	Hemlibra® 300 nM
PTE (nM.min)	221,25	280,75	414,25	196

47

	Sevenfact™ 20 nM	Sevenfact™ 40 nM	Sevenfact™ 100 nM	Hemlibra® 300 nM
Pico (nM)	9,93	12,84	21,04	8,895
Velocidad (nM/min)	0,7	0,96	1,75	0,51

Tabla 2: Parámetros de generación de trombina a partir del lote 2 de Plasma hemofílico A tratado con Sevenfact™ o Hemlibra®

5 En esta matriz, Sevenfact™ y Hemlibra® utilizados por separado tienen un potencial trombogénico muy bajo.

Ejemplo 5: Evaluación del potencial trombogénico sinérgico de la combinación Sevenfact™ + Hemlibra®

10

1 - Protocolo

Los reactivos, el autómata y el protocolo experimental en plasma de hemofilia A son idénticos a los descritos en el
15 ejemplo 2.

2 - Resultados

Como se ha observado en el ejemplo 2, Sevenfact™ y
20 Hemlibra® utilizados individualmente inducen una generación de trombina baja en los plasmas hemofílicos A. En este punto se estudia el efecto sinérgico de la combinación Sevenfact™ y Hemlibra®. Se estudiaron tres concentraciones de Sevenfact™ (20 nM, 40 nM y 100 nM) en presencia de una concentración de
25 Hemlibra® de 300 nM. Se tiene en cuenta un efecto sinérgico si el efecto de la combinación Sevenfact™ + Hemlibra® es al menos 2 veces superior a la suma de los efectos de Sevenfact™ y de

Hemlibra® tomados por separado para al menos uno de los parámetros del ensayo de generación de trombina (PTE, pico de generación de trombina y velocidad).

5 **2.1 - Efecto de Sevenfact™ y de Hemlibra® sobre los plasmas hemofílicos A tras la inducción de la coagulación con TF/PL**

2.1.1 - Evaluación en el lote 1 de Plasma de hemofilia A

10 Los resultados se presentan en la tabla 3 y la figura 1. Para una concentración muy baja de Sevenfact™ de 20 nM, la relaciones para el PTE (figura 1A), para el pico de trombina (figura 1B) y para la velocidad (figura 1C) de la combinación Sevenfact™ + Hemlibra® son, respectivamente, de 2,14, 2,95 y
15 4,19. Así, incluso para la concentración más baja estudiada, se observó un efecto trombogénico sinérgico.

A una concentración de 40 nM, para el conjunto de los parámetros analizados, la relación es superior a 2. La relación
20 obtenida para el PTE es de 2,75 (figura 1A), la relación obtenida para el pico de trombina es de 3,96 (figura 1B) y el obtenido para la velocidad tiene un valor de 6,21 (figura 1C). Dicho de otra manera, la velocidad de formación de la trombina se multiplica por 6 cuando Sevenfact™ y Hemlibra® se utilizan
25 de forma combinada.

El efecto sinérgico más importante se produce para una concentración 100 nM de Sevenfact™. A una concentración de 100 nM, para el conjunto de los parámetros analizados, la
30 relación es superior a 2. La relación obtenida para el PTE es de 4,00 (figura 1A) y la relación para el pico de trombina es

de 4,81 (figura 1B), lo que significa que la concentración máxima de la trombina generada es casi 5 veces mayor cuando Hemlibra® y Sevenfact™ se utilizan de forma combinada. La relación correspondiente a la velocidad es de 9,58 (figura 1C), lo que significa que la trombina se genera casi 10 veces más rápidamente cuando Hemlibra® y Sevenfact™ se utilizan de forma combinada.

Combinaciones					Relaciones combinaciones/suma			
PTE 20 nM Sevenfact™ + PTE 300 nM Hemibra® 253,25	PTE 40 nM Sevenfact™ + PTE 300 nM Hemibra® 282,50	PTE 100 nM Sevenfact™ + PTE 300 nM Hemibra® 257	PTE (20 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®) 543	PTE (40 nM Sevanfact™ + 300 nM Hemibra®) 777,50	PTE (100 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®) 1029	20 nM Sevenfact™ 2,14	40 nM Sevenfact™ 2,75	100 nM Sevenfact TM 4,00
Combinaciones					Relaciones combinaciones/suma			
Pico 20 nM Sevenfact™ + Pico 300 nM Hemibra® 13,515	Pico 40 nM Sevenfact™ + Pico 300 nM Hemibra® 15,87	Pico 100 nM Sevenfact™ + Pico 300 nM Hemibra® 22,965	Pico (20 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®) 39,915	Pico (40 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®) 62,9	Pico (100 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®) 110,565	20 nM Sevenfact™ 2,95	40 nM Sevenfact™ 3,96	100 nM Sevenfact TM 4,81
Combinaciones					Relaciones combinaciones/suma			
Velocidad 20 nM Sevenfact™ + Velocidad 300 nM Hemibra® 1,01	Velocidad 40 nM Sevenfact™ + Velocidad 300 nM Hemibra® 1,42	Velocidad 100 nM Sevenfact™ + Velocidad 300 nM Hemibra® 2,06	Velocidad (20 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®) 4,24	Velocidad (40 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®) 7,86	Velocidad (100 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®) 19,78	20 nM Sevenfact™ 4,19	40 nM Sevenfact™ 6,21	100 nM Sevenfact TM 9,58

Tabla 3: Parámetros de generación de trombina a partir del lote 1 de Plasma hemofílico A tratado con la combinación Sevenfact™ + Hemlibra®

En conclusión, para todas las concentraciones de Sevenfact™ estudiadas, Sevenfact™ y Hemlibra® utilizados de forma combinada tienen un efecto sinérgico sobre la generación de la trombina.

5

2.1.2 - Evaluación en el lote 2 de Plasma hemofílico A

Los resultados se presentan en la tabla 4 y la figura 2. Para una concentración muy baja de Sevenfact™ de 20 nM, se
10 obtuvo una relación de 2,21 para el parámetro de PTE (figura 2A), se obtuvo una relación de 2,34 para el pico de la trombina (figura 2B) y se obtuvo una relación de 2,9 para el parámetro de velocidad (figura 2C) de la combinación Sevenfact™ + Hemlibra®. Así, incluso para la concentración de Sevenfact™
15 más baja estudiada, se observó un efecto trombogénico sinérgico.

A una concentración de 40 nM, la relación correspondiente al PTE es de 2,29 (figura 2A), la que corresponde al pico de
20 trombina es de 2,79 (figura 2B) y la relación que corresponde a la velocidad es de 3,68 (Figure 2C), lo que significa que el uso de Sevenfact™ junto con Hemlibra® permite la formación de trombina aproximadamente 4 veces más rápidamente.

25 El efecto sinérgico más importante se da para una concentración 100 nM de Sevenfact™. A una concentración de 100 nM, la relación correspondiente al pico de generación de trombina es de 3,41 (Figura 2B) y el correspondiente a la velocidad es de 5,63 (Figura 2C), lo que significa que la
30 trombina se genera casi 6 veces más rápidamente y que la concentración de trombina alcanzada se multiplica casi por 4

51
cuando Sevenfact™ se utiliza junto con Hemlibra®.

Combinaciones					Relaciones combinaciones/suma			
PTE 20 nM Sevenfact™ + PTE 300 nM Hemibra®	PTE 40 nM Sevenfact™ + PTE 300 nM Hemibra®	PTE 100 nM Sevenfact™ + PTE 300 nM Hemibra®	PTE (20 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®)	PTE (40 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®)	PTE (100 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®)	20 nM Sevenfact™	40 nM Sevenfact™ TM	100 nM Sevenfact™
417,25	476,75	610,25	920,75	1091,25	1275,50	2,21	2,29	2,09

Combinaciones					Relaciones combinaciones/suma			
Pico 20 nM Sevenfact™ + Pico 300 nM Hemibra®	Pico 40 nM Sevenfact™ + Pico 300 nM Hemibra®	Pico 100 nM Sevenfact™ + Pico 300 nM Hemibra®	Pico (20 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®)	Pico (40 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®)	Pico (100 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®)	20 nM Sevenfact™	40 nM Sevenfact™ TM	100 nM Sevenfact™
18,825	21,735	29,935	43,96	60,745	101,975	2,34	2,79	3,41

Combinaciones					Relaciones combinaciones/suma			
Velocidad 20 nM Sevenfact™ + Velocidad 300 nM Hemibra®	Velocidad 40 nM Sevenfact™ + Velocidad 300 nM Hemibra®	Velocidad 100 nM Sevenfact™ + PTE 300 nM Hemibra®	Velocidad (20 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®)	Velocidad (40 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®)	Velocidad (100 nM Sevenfact™ + 300 nM Hemibra®)	20 nM Sevenfact™	40 nM Sevenfact™	100 nM Sevenfact™
1,21	1,48	2,27	3,52	5,44	12,77	2,9	3,68	5,63

Tabla 4: Parámetros de generación de trombina a partir del lote 2 de Plasma hemofílico tratado con la combinación Sevenfact™ + Hemlibra®

En conclusión, para todas las concentraciones de Sevenfact™ estudiadas, Sevenfact™ y Hemlibra® utilizados de forma combinada tienen un efecto sinérgico sobre la generación de la trombina.

53
REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende:
 - a. Factor VII transgénico, y
 - 5 b. un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X.
2. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho factor VII transgénico es un factor VII
10 humano procedente de una producción por células epiteliales de las glándulas mamarias de un mamífero no humano transgénico.
3. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho mamífero transgénico es el conejo.
15
4. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el anticuerpo es emicizumab.
- 20 5. Producto de combinación que comprende:
 - a. Factor VII transgénico, y
 - b. un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X,
para su uso en la prevención o el tratamiento de un
25 trastorno de la coagulación en un paciente.
6. Producto de combinación de acuerdo con la reivindicación 5, en el tratamiento de la hemofilia A.
- 30 7. Producto de combinación de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 o 6, en el tratamiento de la hemofilia A

54

con inhibidores del factor VIII.

8. Producto de combinación para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 7, estando dicho producto de combinación en forma de una composición farmacéutica tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

9. Producto de combinación para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 8, estando dicho factor VIIa y dicho anticuerpo en una forma adaptada para una administración simultánea al paciente.

10. Producto de combinación para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 8, estando dicho factor VIIa y dicho anticuerpo en formas adaptadas para una administración separada a dicho paciente.

11. Kit que comprende

- Un recipiente que contiene un factor FVII transgénico; y
- Otro recipiente que contiene un anticuerpo dirigido contra el factor IX y el factor X.

12. Método para tratar un trastorno de la coagulación en un paciente, comprendiendo dicho método la administración, simultánea o secuencial, a dicho paciente, de Factor VII transgénico, y de un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X.

13. Uso de una combinación de Factor VII transgénico, y de un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y el factor X, para el tratamiento de un trastorno de la coagulación

en un paciente, preferentemente una hemofilia A con inhibidores del factor VIII.

COMBINACIÓN DE FACTOR VII Y DE UN ANTICUERPO BIESPECÍFICO

DIRIGIDO CONTRA LOS FACTORES IX Y X

5

La invención se refiere a una combinación que comprende Factor VII transgénico y un anticuerpo multiespecífico dirigido contra el factor IX y X, para una administración simultánea o separada.

10

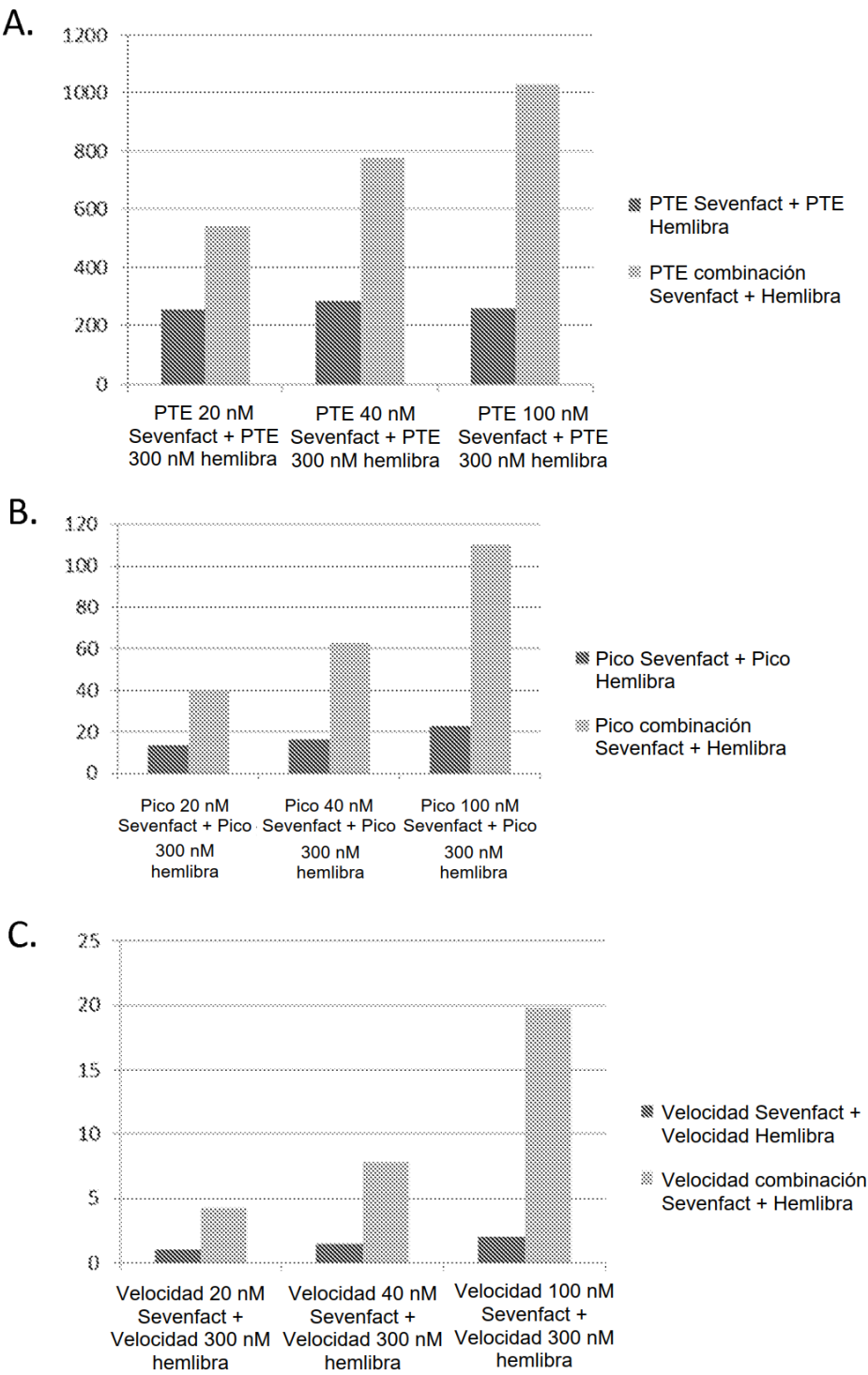


FIGURA 1.

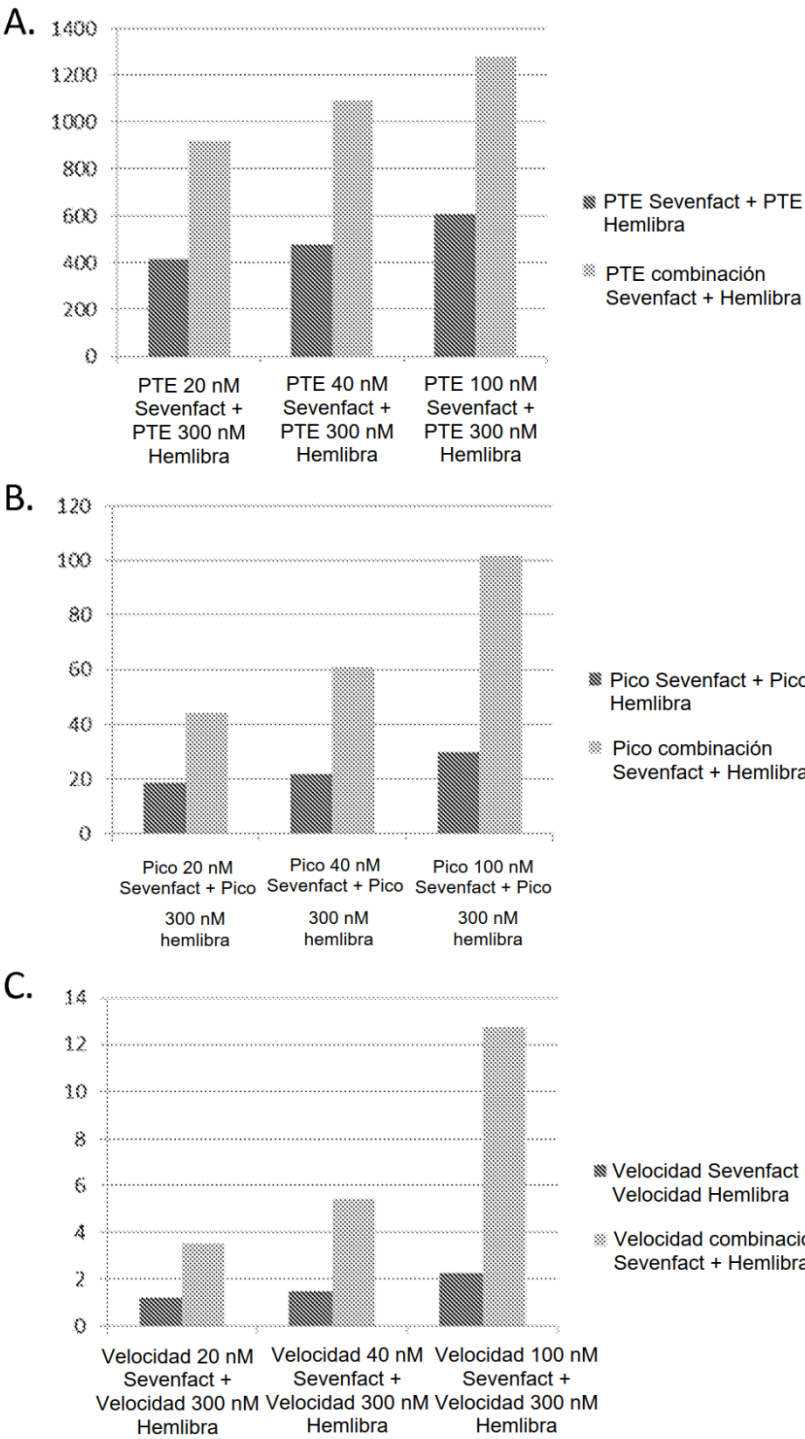


FIGURA 2