

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 3 806 891

a nome: Laboratoire Français du Fractionnement et des
Biotechnologies

a: 92800 Puteaux - Francia

dal titolo: Combinazione di fattore VII e di un
anticorpo bispecifico anti-fattore IX e X.

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce a composizioni farmaceutiche utili per il trattamento di un disturbo della coagulazione, come l'emofilia A, specialmente in un paziente con emofilia di tipo A con sviluppo di anticorpi inibitori del fattore VIII.

Precedente tecnologico

La coagulazione coinvolge due vie, una intrinseca, l'altra estrinseca, che portano a una via finale comune. La combinazione dei due meccanismi assicura la formazione di un coagulo di sangue forte e flessibile, resistente alla pressione sanguigna. Sotto l'azione della trombina, il fibrinogeno subisce modifiche chimiche che portano alla formazione di fibrina. La fibrina è necessaria per la formazione di coaguli. La via intrinseca include i fattori presenti nella circolazione e il processo di coagulazione inizia

all'interno del vaso sanguigno stesso. La via estrinseca coinvolge fattori tissutali normalmente non presenti nella circolazione e che vengono rilasciati durante la lesione vascolare. Il fattore VII è una glicoproteina coinvolta nel percorso estrinseco della coagulazione del sangue. Per avviare la cascata della coagulazione, FVII deve essere attivato in FVIIa. Una volta attivato, FVIIa si complessa con fattore tissutale (FT), una proteina associata a fosfolipidi, che viene rilasciata durante la lesione vascolare. FvIIa da solo (non complessato al fattore tissutale) presenta una bassa attività proteolitica. Il complesso FVIIa-FT converte quindi il fattore X in fattore Xa in presenza di ioni calcio. Questo complesso agisce anche sull'attivazione del fattore FIX in FIXa, catalizzando così la via intrinseca. I fattori IXa e Xa, a loro volta, attivano il fattore VII attivato. Il fattore IX e il fattore X sono coinvolti nel percorso intrinseco della coagulazione. Il fattore IX attivato consente l'attivazione del fattore X in fattore Xa. Il fattore Xa complessato al fattore FV attivato e alla protrombinasi trasforma la protrombina in trombina. La trombina agisce quindi sul fibrinogeno per convertirlo in fibrina e consente anche l'attivazione di FVIII e FV rispettivamente in FVIIIa e FVa. La trombina, da

parte sua, consente di attivare il fattore XIII in FXIIIa, responsabile del consolidamento del coagulo di fibrina, in presenza di calcio, naturalmente presente nel plasma. Tuttavia, quando manca un fattore di coagulazione, la cascata della coagulazione è interrotta o carente e viene definita coagulazione anomala. Il fattore VII attivato agisce localmente in presenza del fattore tissutale rilasciato dopo una lesione tissutale che porta a sanguinamento, anche in assenza del fattore VIII o IX. Questo è il motivo per cui il fattore VII, preferibilmente in forma attivata, viene utilizzato per il trattamento di alcuni disturbi della coagulazione del sangue manifestati da emorragia. Il fattore VII è quindi utilizzato nel trattamento di pazienti affetti da emofilia, che presentano deficit del fattore VIII (emofilia di tipo A) o deficit del fattore IX (emofilia di tipo B), nonché di pazienti con altre carenze di fattori di coagulazione, ad esempio carenza ereditaria di FVII. FVII è raccomandato anche nel trattamento di ictus. Alcuni pazienti emofiliaci sviluppano anticorpi inibitori al fattore VIII somministrato, generalmente in forma concentrata, come trattamento per l'emofilia. Oggi è la complicazione più comune del trattamento dell'emofilia. Gli anticorpi bispecifici destinati a

FIX o FIXa e FX o FXa, come Emicizumab, sono usati per trattare pazienti affetti da emofilia A con inibitori anti-fattore VIII. Questi anticorpi sono funzionalmente sostituiti da FVIII promuovendo l'attivazione di FX da parte di FIXa riunendo queste due molecole. Questi anticorpi hanno un'azione duratura. È stata testata la combinazione ricombinante FVIIa derivata da colture cellulari (come NovoSeven®, prodotta in cellule BHK) con Emicizumab (come ACE910 o Hemlibra®) (*R. HARTMANN, et al. OR36 / Synergistic Effects of a Procoagulant Bispecific Antibody and FEIBA or Factor VIIA on Thrombin Generation (Haemophilia (2017), 23 (Suppl. 2), 11-27)*). Questa combinazione mostra solo un effetto additivo sul trattamento dei disturbi della coagulazione. Vi è quindi la necessità di una combinazione farmaceutica che consenta una migliore gestione dei pazienti emofiliaci A, e più in particolare dei pazienti con anti-fattore VIII.

Sommario dell'invenzione

L'invenzione propone di combinare il fattore VII transgenico con un anticorpo multispecifico diretto contro i fattori IX e X. Secondo l'invenzione, la combinazione dell'invenzione del fattore VII ottenuto per transgenesi e anticorpi diretti contro il fattore

IX e il fattore X induce un effetto sinergico nel trattamento dei disturbi della coagulazione, e in particolare per il trattamento di pazienti affetti da emofilia A che presentano inibitori anti-FVIII e di pazienti carenti di FVII. Un aspetto dell'invenzione è quindi una composizione farmaceutica comprendente:

- a. fattore transgenico VII, e
- b. un anticorpo multispecifico, preferibilmente bispecifico, diretto contro il fattore IX e il fattore X, come ad esempio emicizumab.

Preferibilmente, il fattore VII è sotto forma di fattore VII attivato (FVIIa). In una particolare forma di realizzazione, il fattore IX è sotto forma di fattore IX attivato (FIXa) e/o il fattore X è sotto forma di fattore X attivato (FXa). Preferibilmente, detto fattore transgenico VII è un fattore umano VII derivato da una produzione da parte delle cellule epiteliali delle ghiandole mammarie di un mammifero transgenico non umano, ad esempio un coniglio transgenico per il fattore VII umano. L'invenzione fornisce anche un prodotto combinato comprendente:

- a. fattore transgenico VII, e
- b. un anticorpo multispecifico diretto contro il fattore IX e il fattore X, da utilizzare nella prevenzione o nel trattamento di un disturbo della

coagulazione in un paziente come emofilia A, più in particolare emofilia A con inibitori di fattore VIII (FVIII).

Preferibilmente, il prodotto combinato è sotto forma di composizione farmaceutica che comprende sia il fattore transgenico VII che detto anticorpo. In alternativa, il fattore transgenico VII e l'anticorpo sono sotto forma di composizioni separate, idonee per la somministrazione simultanea o separata (ad esempio sequenziale) al paziente. Un altro oggetto dell'invenzione è anche un kit comprendente:

- un contenitore contenente un fattore FVII transgenico; e
- un altro contenitore contenente un anticorpo diretto contro il fattore IX e il fattore X.

Lista delle Figure:

FIG. 1: Valutazione dell'effetto trombogenico sinergico della combinazione Sevenfact™ + Hemlibra® sul lotto 1 di plasma emofilo A dopo induzione con TF/PL. (A) Valutazione dell'effetto trombogenico sinergico sul PTE, (B) Valutazione dell'effetto trombogenico sinergico sul picco di generazione della trombina, (C) Valutazione dell'effetto trombogenico sinergico sulla velocità.

FIG. 2: Valutazione dell'effetto trombogenico

sinergico della combinazione Sevenfact™ + Hemlibra® sul lotto 2 di plasma emofilo A dopo induzione con TF/PL. (A) Valutazione dell'effetto trombogenico sinergico sul PTE, (B) Valutazione dell'effetto trombogenico sinergico sul picco di generazione della trombina, (C) Valutazione dell'effetto trombogenico sinergico sulla velocità.

Descrizione dettagliata dell'Invenzione

Definizioni generali

Il fenomeno della coagulazione comprende una cascata di reazioni enzimatiche che coinvolgono fattori di coagulazione presenti sotto forma di proenzimi che, in presenza di determinati cofattori, vengono convertiti dalla scissione proteolitica nella loro forma "**attivata**". La forma attivata di ciascun fattore presente nel precursore inattivo è indicata dalla lettera A. Così, FVIIa risulta, in vivo, dalla scissione dello zimogeno da diverse proteasi (FIXa, FXa, FVIIa) in due catene unite da un ponte di disolfuro. Il termine "**trattamento**" o "**trattare**" si riferisce generalmente a un miglioramento, profilassi, o inversione di una malattia o di un disturbo, o almeno di un sintomo, ad esempio, il rallentamento della progressione di una malattia, o la stabilizzazione di un sintomo. È incluso anche il ritardo nell'insorgenza

di una malattia o disturbo, o di almeno un sintomo. Il termine "**prevenzione**" o "**prevenire**" indica una riduzione del rischio di sviluppare o acquisire una determinata malattia o disturbo. Si fini della presente invenzione, per "**paziente**" o "**soggetto**" si intende qualsiasi mammifero, e più in particolare l'essere umano, maschio o femmina, di qualsiasi età, compresi i bambini. L'espressione "**composizione farmaceutica**" si riferisce a preparati che consentono l'attività biologica dei principi attivi e che non contengono componenti aggiuntivi tossici per i soggetti ai quali viene somministrata la composizione.

Fattore VII transgenico

Il termine "**Fattore VII**" o "**FVII**" comprende i polipeptidi che costituiscono la sequenza del fattore VII umano selvaggio 1-406 (come descritto nel brevetto U.S. 4,784, 950), o FVII derivato da un'altra specie (ad esempio bovini, suini, canini, murini). Comprende anche le variazioni alleliche naturali del fattore VII che possono esistere, e qualsiasi forma o grado di glicosilazione o altra modifica post-traslazionale. Il termine "Fattore VII" comprende anche varianti di FVII che hanno la stessa attività biologica o una più elevata rispetto all'attività della forma selvatica, queste varianti includendo in particolare polipeptidi

che differiscono dal tipo selvatico FVII per inserimento, cancellazione o sostituzione di uno o più aminoacidi. Salvo indicazione contraria, nella presente descrizione, il termine "Fattore VII" si riferisce indifferentemente a FVII (zimogeno) non clivato o al fattore VII attivato (FVIIa). FVIIa è quindi composto da una catena leggera di 152 aminoacidi con un peso molecolare di circa 20 kDa e da una catena pesante di 254 aminoacidi con un peso molecolare di circa 30 kDa collegati tra loro da un unico ponte di disolfuro (Cys135-Cys262). Per **"fattore VII ricombinante"** si intende qualsiasi fattore VII derivato dall'ingegneria genetica e risultante dall'espressione del gene corrispondente in qualsiasi microrganismo, pianta o pianta transgenica. Per "microrganismo" si intende qualsiasi sistema batterico, fungino, virale o cellulare. Il fattore VII ricombinante può anche essere prodotto da cellule eucariotiche in coltura, come cellule vegetali o di mammiferi, ad esempio cellule animali o umane. Per **"fattore VII transgenico"** si intende qualsiasi fattore VII ricombinante ottenuto da un animale transgenico per il fattore VII. Per **"animale transgenico"** si intende qualsiasi animale non umano che presenti una modifica del suo genoma destinata a consentire

l'espressione di una proteina di interesse (qui fattore VII). La modifica del genoma può derivare da alterazione, modifica o inserimento di un gene. Questa modifica può essere dovuta all'azione di agenti alteranti o mutageni convenzionali o ad altri interventi effettuati mediante mutagenesi sito specifica. La modifica del genoma può anche derivare dall'inserimento di gene o dalla sostituzione di gene nel suo tipo selvatico o nella sua forma mutata. L'animale transgenico può essere scelto, senza alcuna limitazione, tra coniglio, capra, mucca, cammello, criceto, topo, ratto, cavallo, scrofa, dromedario, pecora, lama. In una particolare forma di realizzazione, può essere scelto un animale che non esprime $\alpha 1,3$ -galattosiltransferasi. Per **"attività biologica del fattore VIIa"** si intende la capacità di FVIIa di generare trombina, ad esempio sulla superficie delle piastrine attivate. L'attività del fattore VII può essere valutata in diversi modi. L'attività biologica di FVIIa può, ad esempio, essere quantificata misurando la capacità di una composizione FVII di promuovere la coagulazione del sangue utilizzando un plasma carente di FVII e di tromboplastina, come descritto, ad esempio, nel brevetto US n. 5,997,864. In questo estratto,

l'attività biologica viene valutata rispetto a un campione di controllo e convertita in "unità di FVII" rispetto a un siero umano standard aggregato contenente 1 unità/ml di attività del Fattore VII. In alternativa, l'attività biologica del fattore VII può essere quantificata (i) misurando la capacità del fattore VIIa di produrre il fattore Xa in un sistema comprendente il fattore tissutale (FT) incorporato in una membrana lipidica e il fattore X (Persson et al. J. Biol. Chem. 272: 19919-19924, 1997); (ii) misurando l'idrolisi del fattore X in un sistema acquoso; (iii) misurando il legame fisico di FVIIa a FT attraverso la risonanza plasmatica superficiale (Persson, FEBS letts, 413:359-363, 1997), (iv) misurando l'idrolisi di un substrato sintetico o (v) misurando la generazione di trombina in un sistema in vitro indipendente da FT. In una forma di realizzazione preferita, FVII descritto nel presente documento è un polipeptide la cui sequenza peptidica può essere quella di FVII umano naturale, vale a dire la sequenza presente negli esseri umani che non presentano disturbi correlati a FVII. Tale sequenza è descritta nel documento EP 0 200 421. In modo vantaggioso, la sequenza di FVII utilizzata nell'invenzione è la sequenza SEQ ID NO: 1. Per **"sinergia"** o **"effetto**

sinergico" si intende preferibilmente un effetto della combinazione di due prodotti superiore a 2 volte la somma degli effetti di ciascuno dei prodotti presi da solo. Secondo la presente invenzione, un effetto sinergico si ottiene quando l'uso di un FVIIa transgenico in combinazione con un anticorpo multispecifico diretto contro il fattore IX e il fattore X consente di ottenere un effetto maggiore di 2 volte la somma dell'effetto ottenuto con un solo FVIIa transgenico e l'effetto ottenuto con un anticorpo multispecifico diretto solo contro il fattore IX e il fattore X, su almeno un parametro di generazione della trombina. Il parametro di generazione della trombina viene selezionato tra altezza di picco, velocità o potenziale di trombina endogena (PTE). In una particolare forma di realizzazione, FVIIa viene somministrato a una concentrazione inferiore o uguale a 105 nM, preferibilmente inferiore a 100 nM. In una particolare forma di realizzazione, l'anticorpo multispecifico diretto contro il fattore IX e il fattore X è somministrato a una concentrazione inferiore a 600 nM, preferibilmente inferiore a 550 nM, preferibilmente inferiore a 500 nM, preferibilmente inferiore a 450 nM, preferibilmente inferiore a 400 nM,

preferibilmente inferiore a 350 nM, preferibilmente inferiore a 325 nM. In una particolare forma di realizzazione, il fattore VII è ottenuto dal latte di un animale transgenico. Un metodo di produzione di una proteina ricombinante nel latte di un animale transgenico può comprendere le seguenti fasi: una molecola di DNA sintetico comprendente un gene che codifica una proteina di interesse (ad esempio, FVII umano), che è sotto il controllo di un promotore di una proteina naturalmente secreta nel latte, è integrata in un embrione di un mammifero non umano. L'embrione viene quindi posto in una femmina di un mammifero della stessa specie. Una volta che il mammifero derivato da embrioni si è sufficientemente sviluppato, viene indotto l'allattamento del mammifero e quindi viene raccolto il latte. Il latte contiene quindi il FVII di interesse secreto dall'animale transgenico. Un esempio di preparazione di proteina nel latte di una femmina di un mammifero diverso da un essere umano è fornito nella domanda di brevetto EP0527063, il cui insegnamento può essere ripetuto per la produzione del fattore VII dell'invenzione. La secrezione del fattore VII da parte delle ghiandole mammarie, che ne consente la secrezione nel latte del mammifero transgenico,

implica il controllo dell'espressione del fattore VII in modo dipendente dai tessuti. Tali metodi di controllo sono ben noti al tecnico del ramo. Il controllo dell'espressione è effettuato mediante sequenze che consentono l'espressione della proteina verso un particolare tessuto. Si tratta in particolare di sequenze promotrici WAP, beta-caseina, beta-lattoglobulina e sequenze di peptidi di segnale, l'elenco non è limitativo. In una forma di realizzazione preferita, il fattore VII secondo l'invenzione è prodotto nel latte dei conigli transgenici. In modo particolarmente vantaggioso, l'espressione nelle ghiandole mammarie dei conigli viene effettuata sotto il controllo del promotore della beta-caseina ben noto al tecnico del ramo. In particolare, un plasmide contenente il promotore di beta-caseina viene prodotto introducendo una sequenza contenente il promotore del gene della beta-caseina, che viene prodotto in modo da poter ricevere un gene estraneo posto sotto il controllo di questo promotore. Il gene codificante per l'FVII umano è integrato e posto sotto il controllo del promotore della beta-caseina. Il plasmide contenente il promotore e la codifica della sequenza per la proteina di interesse viene digerito con enzimi di restrizione per

rilasciare il frammento di DNA contenente il promotore di beta-caseina e la sequenza di FVII umano. Dopo la purificazione, i frammenti vengono introdotti per microiniezione nel pronucleo maschile di embrioni di coniglio selvaggio. Gli embrioni vengono quindi coltivati prima del trasferimento nell'ovidotto di femmine selvatiche preparate con ormoni. Al parto di queste femmine, la progenie viene valutata per PCR per determinare gli animali transgenici. Il numero di copie del transgene e la sua integrità sono rivelati dalla tecnica di Southern dal DNA estratto dai conigli transgenici ottenuti. La concentrazione di FVII umano espresso nel latte della prole femminile transgenica viene valutata mediante test immunoenzimatici. In una particolare forma di realizzazione, il fattore VII utile nell'invenzione è ottenuto mediante un metodo che comprende le seguenti fasi:

(a) l'inserimento di una sequenza di DNA comprendente un gene che codifica il fattore VII in un embrione di mammiferi non umano, il cui gene è sottoposto al controllo trascrizionale del promotore della beta-caseina,

(b) il trasferimento di embrioni ottenuti nella fase a) nell'ovidotto di femmine di un mammifero non umano in modo da trasformarsi in un mammifero adulto non

umano,

(c) l'induzione dell'allattamento nel mammifero non umano adulto di tipo femminile ottenuto nella fase b) o in una discendente femminile di tale mammifero non umano in cui il gene e il promotore sono presenti nel suo genoma,

(d) la raccolta di latte da detto mammifero non umano,
e

(e) la purificazione del FVII presente nel latte raccolto.

Il FVII transgenico utile qui ha un punto isoelettrico sostanzialmente omogeneo. Per "**punto isoelettrico**" o "**pI**" si intende il pH al quale la carica elementare netta della molecola del fattore VII o del fattore Vlla è pari a zero, cioè, il pH al quale la molecola è elettricamente neutra (forma zwitterionica). Il punto isoelettrico del fattore VII secondo l'invenzione può essere misurato implementando una tecnica ben nota al tecnico del ramo come la focalizzazione isoelettrica o iso-electric focusing ("IEF"). Questa tecnica elettroforetica consente la separazione delle proteine sulla base del loro punto isoelettrico. Consiste in una migrazione, indotta da una corrente elettrica uniforme, delle proteine in un gradiente di pH fino a raggiungere un pH equivalente

al loro specifico punto isoelettrico, a quel punto cessano di migrare poiché la loro carica netta è zero. I gel IEF sono utilizzati per determinare il punto isoelettrico di una determinata proteina. Per **"sostanzialmente omogeneo"** si intende che almeno il 90%, preferibilmente almeno il 95%, delle molecole del fattore VII della composizione hanno un punto isoelettrico entro una differenza di unità di pH inferiore o uguale a 1,2. In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, almeno il 50%, preferibilmente almeno il 55%, preferibilmente il 60% delle molecole transgeniche del fattore VII della composizione hanno un punto isoelettrico all'interno di una differenza di unità di pH inferiore a 1, preferibilmente inferiore a 0,5. In un'altra forma di realizzazione preferita, almeno il 50%, preferibilmente almeno il 55%, preferibilmente il 60% delle molecole del fattore VII della composizione hanno un punto isoelettrico entro una differenza di unità di pH di 0,4. Per **"forme N-glicaniche"** si intendono tutte le forme N-glicaniche presenti sui due siti di N-glicosilazione del fattore VII dell'invenzione. Le forme N-glicaniche sono dette monocariche, se la loro carica totale è pari a 1. Ai fini della presente invenzione, per "riempitivo" si

intende un gruppo fosfato, un gruppo solfato o una molecola di acido sialico. Pertanto le forme N-glicaniche sono dette monocariche se contengono solo un gruppo fosfato o un gruppo solfato o una molecola di acido sialico. In contrasto con il termine "monocarica", il termine "bicarica" significa che la carica totale sostenuta dalle forme N-glicaniche è pari a 2, vale a dire che hanno due cariche scelte da un gruppo fosfato, un gruppo solfato e/o una molecola di acido sialico. In altre parole, le forme N-glicaniche bicariche possiedono una molecola di acido sialico e un gruppo fosfato, o una molecola di acido sialico e un gruppo solfato, o due molecole di acido sialico, o due gruppi fosfati, o due gruppi solfati, o un gruppo fosfato e un gruppo solfato. Il termine "tricarica" significa che la carica totale sostenuta dalle forme N-glicaniche è pari a 3, vale a dire che hanno tre cariche scelte da un gruppo fosfato, un gruppo solfato e/o una molecola di acido sialico. In altre parole, le forme N-glicaniche tricariche hanno una molecola di acido sialico e un gruppo fosfato e un gruppo solfato, o due molecole di acido sialico e un gruppo fosfato, o due molecole di acido sialico e un gruppo solfato, o un gruppo acido sialico e due gruppi fosfati, o un gruppo di acido sialico e due gruppi

solfati, o un gruppo fosfato e due gruppi solfati, o un gruppo solfato e due gruppi fosfati o tre molecole di acido sialico, o tre gruppi fosfati o tre gruppi solfati. Il termine "neutro" significa che le forme N-glicaniche non contengono carica. La carica delle forme N-glicaniche del fattore VII secondo l'invenzione può essere misurata utilizzando una tecnica ben nota al tecnico del ramo, in particolare mediante cromatografia liquida ad altissima prestazione con resina a scambio anionico accoppiata al rilevamento a fluorescenza (AEX-UPLC/FD). Questo metodo permette di separare le diverse forme N-glicaniche in funzione della loro carica apparente (si veda in particolare, Hermentin et al., *Glycobiology*, vol. 6, n. 2, 1996). Nella cromatografia a scambio anionico, come fase stazionaria viene utilizzata una resina con carica positiva. Queste resine a carica positiva sono generalmente costituite da un polimero reticolato o da un gel, sul quale vengono innestati gruppi con carica positiva. In una forma di realizzazione vantaggiosa dell'invenzione, viene utilizzata una colonna a scambio anionico debole di tipo amminopropilico. Nel caso della composizione del fattore VII secondo l'invenzione, sembra che, tra tutte le forme N-glicaniche del fattore VII della

composizione, almeno il 50% delle forme N-glicaniche, almeno il 60% delle forme N-glicaniche, preferibilmente almeno il 65%, preferibilmente almeno il 70%, preferibilmente almeno il 75%, preferibilmente almeno l'80%, preferibilmente almeno l'85%, preferibilmente almeno il 90%, preferibilmente almeno il 95%, sono monocariche. In una forma di realizzazione preferita, le molecole del fattore VII aventi forme N-glicaniche monocariche rappresentano tra il 50% e il 95% delle molecole del fattore VII della composizione, preferibilmente tra il 50% e il 90% delle molecole del fattore VII della composizione, preferibilmente tra il 50% e l'80% delle molecole del fattore VII della composizione, preferibilmente tra il 50% e il 75% delle molecole del fattore VII della composizione, preferibilmente tra il 50% e il 70% delle molecole del fattore VII della composizione, preferibilmente tra il 50 e il 65% delle molecole del fattore VII della composizione, preferibilmente tra il 50% e il 60% delle molecole del fattore VII della composizione. Il punto isoelettrico sostanzialmente omogeneo della composizione del fattore VII della combinazione secondo l'invenzione deriva dalla combinazione delle proprietà di glicosilazione e γ -carbossilazione delle molecole di FVII che la compongono. Il fattore VII

transgenico utile qui mostra caratteristiche di modifiche post-traslazionali. Si tratta in particolare di modifiche della glicosilazione, come due siti di N-glicosilazione con un livello zero o molto basso di Gal α 1,3Gal nella composizione FVII, o di altro livello sufficientemente basso da non essere immunogeno. Al contrario, il FVII qui descritto non è un FVII plasmatico, cioè non è un prodotto purificato da plasma umano o animale. Più in particolare, il FVII transgenico utile qui mostra modifiche post-traslazionali, così come due siti di O-glicosilazione con motivi glicani definiti, γ -carbossilazione e ponti di disolfuro specifici. L'FVIIa utile qui può avere diverse modifiche post-traslazionali: i primi nove o dieci acidi glutammici N-terminali sono γ -carbossilati, l'Asp₆₃ è parzialmente idrossilato, Ser₅₂ e Ser₆₀ sono o-glicosilati e trasportano rispettivamente i motivi glucosio(xilosio)₀₋₂ e fucosio, Asn₁₄₅ e ASN₃₂₂ sono N-glicosilati prevalentemente da strutture monosialilate del complesso biantennato. In modo vantaggioso, almeno l'80% delle molecole transgeniche del fattore VII utili qui presentano γ -carbossilazione su nove residui di acido glutammico. In un'altra forma di realizzazione, almeno l'85% di tali molecole mostra γ -

carbossilazione su nove residui di acido glutammico. In un'altra forma di realizzazione, tra l'85% e il 100%, preferibilmente tra il 90% e il 100%, preferibilmente tra il 95% e il 100% di dette molecole presentano γ -carbossilazione su nove residui di acido glutammico. Vantaggiosamente, il livello di γ -carbossilazione sul residuo di acido glutammico 35 (Glu 35) delle molecole del fattore VII della composizione è inferiore al 20%. In un'altra forma di realizzazione, il livello di γ -carbossilazione del residuo Glu35 è inferiore al 15%, preferibilmente inferiore al 10%, preferibilmente inferiore al 5%. Il motivo Gal α 1,3Gal è una struttura composta da due galattosi collegati in α 1,3. Si trova alla fine delle antenne oligosaccaridiche delle strutture collegate a N. Questo motivo è noto per la sua immunogenicità. Si preferisce quindi produrre un FVII o un FVIIa il cui rapporto di struttura Gal α 1,3Gal è pari o talmente basso da non poter essere distinto dal rumore di fondo ottenuto dalle misurazioni effettuate con le apparecchiature di analisi attualmente disponibili. Questa espressione designa, in modo equivalente, qualsiasi FVII transgenico il cui livello di Gal α 1,3Gal è vicino a quello del FVII plasmatico. Vantaggiosamente, il livello Gal α 1,3Gal della

composizione FVII qui descritta non è immunogeno per l'uomo. Inoltre, il FVII utile qui comprende preferibilmente, come il FVII umano, due siti di N-glicosilazione, alle posizioni 145 e 322, e 2 siti di O-glicosilazione, alle posizioni 52 e 60. In un sito di N-glicosilazione, le catene di oligosaccaridi sono collegate a un'asparagina (legate a N). In un sito di O-glicosilazione, le catene di oligosaccaridi sono legate a una serina. I motivi collegati su questi aminoacidi saranno diversi per ogni proteina della composizione. Tuttavia, è possibile quantificare, per tutta la composizione, il livello di ciascuna unità glicanica, oppure di ogni zucchero. Le percentuali dei diversi glicani indicate nella presente domanda non tengono conto della O-glicosilazione. Preferibilmente, la composizione di FVII è caratterizzata dal fatto che, tra tutte le unità glicaniche del FVII della composizione, almeno il 40% sono forme glicaniche biantennate, monosialilate. In un'altra forma di realizzazione, le forme biantennate monosialilate sono presenti ad almeno il 50%. In un'altra forma di realizzazione, le forme biantennate monosialilate sono presenti ad almeno il 60%, preferibilmente almeno il 65%, preferibilmente almeno il 70%. In modo vantaggioso, le forme glicaniche biantennate,

monosialilate di FVII sono prevalenti. La composizione di FVII è caratterizzata dal fatto che almeno alcuni degli acidi sialici del fattore VII implicano legami $\alpha 2-6$. In modo vantaggioso, almeno il 65% degli acidi sialici di FVII implica legami $\alpha 2,6$. In modo molto vantaggioso, almeno il 70%, o addirittura l'80% e, in particolare, almeno il 90% degli acidi sialici di FVII implicano legami $\alpha 2,6$. In modo particolarmente preferito, tutti gli acidi sialici implicano legami $\alpha 2,6$, vale a dire che tutti gli acidi sialici sono collegati al galattosio da un legame $\alpha 2,6$. La composizione di FVII qui descritta può comprendere anche acidi sialici con legami $\alpha 2-3$. Secondo forme di realizzazione dell'invenzione, dal 65% al 100% degli acidi sialici di FVII implicano legami $\alpha 2,6$. Preferibilmente, dal 70% o 80% al 100% degli acidi sialici di FVII implicano legami $\alpha 2,6$. In modo vantaggioso, tra le forme glicaniche biantennate monosialilate di FVII, le forme glicaniche predominanti sono non fucosilate. Preferibilmente, queste forme glicaniche biantennate monosialilate non fucosilate sono presenti nel FVII della composizione in una quantità superiore al 20%. Vantaggiosamente, tale quantità è superiore al 25%, oppure superiore al 40%. In modo particolarmente vantaggioso, il grado di

fucosilazione della composizione di FVII è compreso tra il 20% e il 50%. In una forma di realizzazione, questa quantità può essere inferiore al 20%. In una particolare forma di realizzazione, almeno il 10%, preferibilmente almeno il 15%, preferibilmente almeno il 20%, preferibilmente almeno il 25% delle forme N-glicaniche dei fattori VII della composizione sono "high mannose/hybrid". Preferibilmente, il profilo di glicosilazione qui descritto fornisce al FVII una migliore attività biologica e stabilità. Le composizioni del fattore VII aventi un punto isoelettrico sostanzialmente omogeneo facilitano la fase di formulazione a un pH ottimale, preferibilmente a un pH ottimale di $6,0 \pm 0,2$, delle composizioni farmaceutiche evitando precipitazioni di FVII. Infatti, è noto che nel punto isoelettrico di una molecola, queste tenderanno ad aggregarsi e precipitare. Le molecole del fattore VII utilizzate nella composizione dell'invenzione hanno un punto isoelettrico compreso tra 6,6 e 7,0. Ciò comporta una migliore stabilità della composizione di fattore VII, soprattutto quando quest'ultima è formulata a un pH inferiore al punto isoelettrico e in particolare a pH 6,0. Il miglioramento della stabilità della composizione di fattore VII consente di evitare

interazioni elettrostatiche responsabili di fenomeni di precipitazione e aggregazione di tipo solubile e insolubile, oltre a evitare la perdita di materie prime e quindi un calo della resa che porta a una perdita di quantità di principio attivo e quindi potenzialmente a una perdita di attività. In una forma di realizzazione preferita, il FVII transgenico è prodotto dal coniglio nel suo latte, consentendo di ottenere una composizione in cui ogni molecola di fattore VII della composizione ha due siti di N-glicosilazione. Preferibilmente, tutte le molecole di FVII della composizione hanno un contenuto di motivi glicanici Gal α 1,3Gal inferiore al 4%, o addirittura zero. Quindi, vantaggiosamente, il FVII transgenico prodotto dal coniglio non possiede un motivo glicanico Gal α 1,3Gal. FVII può essere purificato dal latte con tecniche note a un tecnico del ramo. Ad esempio, un metodo per purificare una proteina di interesse dal latte, come descritto nel brevetto US 6,268,487, può comprendere le fasi seguenti, costituite da: a) sottoporre il latte a filtrazione tangenziale su una membrana di porosità sufficiente a formare un retentato e un permeato, il permeato contenente la proteina esogena, b) sottoporre il permeato a un apparecchio di cattura cromatografico in modo da

sostituire la proteina esogena e ottenere un effluente, c) combinare l'effluente e il retentato, d) ripetere le fasi da a) a c) fino a separare il FVII dai lipidi, dalle micelle di caseina e fino a recuperare il FVII. Vantaggiosamente, il FVII dell'invenzione è in forma attivata. In una forma di realizzazione, il FVII può essere attivato in vitro dai fattori Xa, VIIa, IIa, IXa o XIIa. FVII può essere attivato anche durante il metodo di purificazione, in particolare passando sopra colonne cromatografiche con carica positiva.

Anticorpo multispecifico

Per "**anticorpo multispecifico**" si intende qualsiasi anticorpo che possiede almeno due siti di legame specifico con almeno due antigeni diversi, o epitopi diversi dello stesso antigene. Il termine "specifico" significa che l'anticorpo ha la capacità di riconoscere e legare un antigene, sostanzialmente senza reazione crociata con un altro antigene. In modo vantaggioso, l'anticorpo presenta, rispetto a ciascun antigene, una costante di affinità K_d di almeno 10^{-6} M, preferibilmente almeno 10^{-7} M, preferibilmente ancora almeno 10^{-8} M, 10^{-9} M, o 10^{-10} M. Pertanto, gli anticorpi utili nell'invenzione hanno la capacità di legarsi specificamente sia al fattore di coagulazione

IX che al fattore di coagulazione X in forma attivata o meno. L'anticorpo utilizzato nell'invenzione, che ha la capacità di legarsi specificamente sia al fattore di coagulazione IX che al fattore di coagulazione X, preferibilmente ha la capacità di agire come sostituto del fattore VIII (FVIII), il che significa che l'anticorpo promuove l'attivazione di FX da parte di FIXa. Tali anticorpi multispecifici, preferibilmente bispecifici, possono essere ottenuti con vari metodi noti al tecnico del ramo, ad esempio mediante coniugazione chimica o mediante quadromi, che risultano dalla fusione tra due ibridi che producono due anticorpi monoclonali diversi; oppure per ricombinazione genetica. I polinucleotidi che codificano tali anticorpi possono quindi essere inseriti nei vettori di espressione ed espressi in cellule o organismi ospiti adattati mediante tecniche ben note al tecnico del ramo. Gli anticorpi qui utili possono essere di formato molto semplice, costruiti a partire da frammenti Fv a catena singola (scFv) di due o più anticorpi, associati da un idoneo linker peptidico. Per "Fv" si intende il più piccolo frammento di anticorpo che mantiene le proprietà di riconoscimento e di legame con l'antigene. Un frammento "Fv" è un dimero (dimero $V_H + V_L$) costituito

da una regione variabile (V_H) trasportata da una catena pesante (H) e da una regione variabile (V_L) adiacente trasportata da una catena leggera (L). In alternativa, possono essere anticorpi a lunghezza intera, preferibilmente contenenti una regione Fc. Sono possibili diversi formati. Ad esempio, in un primo formato, i frammenti scFv dell'anticorpo A sono fusi alle estremità (generalmente N-terminali) delle catene pesanti dell'anticorpo B. L'anticorpo risultante ha un singolo tipo di catena pesante, che contiene V_H , CH1, CH2 e CH3 dell'anticorpo B e i domini V_H e V_L dell'anticorpo A e un singolo tipo di catena leggera che contiene i domini V_L e CL dell'anticorpo B (Qu et al. Blood, 111, 2211-2219, 2008). In un secondo formato, la catena pesante e la catena leggera di un anticorpo A sono associate alla catena pesante e alla catena leggera di un anticorpo B. Se del caso, mutazioni, ad esempio di tipo "knob into holes" (Ridgway et al, Protein Eng, 9, 617-21, 1996; brevetto US 7,695,936) possono essere introdotte per evitare discorrispondenze. Salvo indicazione contraria, nella presente descrizione il termine "Fattore IX" si riferisce indifferentemente al Fattore IX non attivato o al Fattore IX attivato (FIXa). Salvo indicazione contraria, nella presente descrizione il

termine "Fattore X" si riferisce indifferentemente al Fattore X non attivato o al Fattore X attivato (FXa). Un anticorpo che riconosce (i) FIX e/o FIXa, e (ii) FX e/o FXa può essere ottenuto in particolare secondo i metodi descritti nelle domande di brevetto WO2005/035756, WO2006/109592 o WO2012/06717. In una forma di realizzazione preferita, detto anticorpo è l'emicizumab. La produzione di questo anticorpo è descritta, ad esempio, nella domanda di brevetto WO2018047813 o nella domanda di brevetto EP1688488.

Composizioni farmaceutiche e posologie

Il fattore VII e l'anticorpo possono essere formulati come composizioni farmaceutiche separate, o combinati all'interno della stessa composizione farmaceutica. In caso di somministrazione separata, il FVII e l'anticorpo possono essere formulati in modo adeguato alla somministrazione secondo vie diverse o identiche. Pertanto, FVII può essere somministrato, ad esempio, per via endovenosa, sottocutanea, o intramuscolare. L'anticorpo può altresì essere somministrato, ad esempio, per via endovenosa, sottocutanea, o intramuscolare. Una composizione del Fattore VII può, ad esempio, essere simile a quella descritta nella domanda di brevetto WO2010/149907. Pertanto, in una

forma di realizzazione esemplificativa, la composizione comprende:

- fattore VII, preferibilmente sotto forma di fattore VIIa;
- arginina, facoltativamente sotto forma di cloridrato;
- isoleucina;
- lisina;
- glicina;
- citrato trisodico o cloruro di calcio;
- e, se del caso, polisorbato 80 o polisorbato 20.

Più in particolare, la composizione può comprendere:

- fattore VII, preferibilmente sotto forma di fattore VIIa;
- da 10 a 40 g/l di arginina, facoltativamente sotto forma di cloridrato;
- da 4,2 a 6,6 g/l di isoleucina;
- da 0,6 a 1,8 g/l di lisina;
- da 0,6 a 1,8 g/l glicina;
- da 0 a 0,2 g/l di citrato di trisodio o da 1 a 2 g/l di cloruro di calcio;
- e, se del caso, da 0 a 0,5 g/l di polisorbato 80.

La composizione FVII, che facoltativamente comprende anche almeno un anticorpo multispecifico come descritto qui, può essere conservata in forma liquida

o solida, generalmente ottenuta mediante essiccazione. Le concentrazioni sopra indicate sono determinate in relazione alle composizioni in forma liquida, prima dell'essiccazione o dopo ricostituzione sotto forma di preparato iniettabile. L'essiccazione è un metodo di rimozione dell'acqua in uno stadio alto. Si tratta di una disidratazione per rimuovere quanta più acqua possibile. Questo fenomeno può essere naturale o forzato. Questa essiccazione può essere eseguita utilizzando tecniche di liofilizzazione, atomizzazione e crioatomizzazione. Il metodo preferito per ottenere la forma solida della composizione per uso farmaceutico descritto qui è la liofilizzazione. I metodi di liofilizzazione sono ben noti al tecnico del ramo, si veda ad esempio [Wang et al, Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, International Journal of Pharmaceutics, Vol 203, p 1-60, 2000]. Possono essere previsti altri metodi idonei a ridurre il grado di umidità o il tenore di acqua della composizione. Preferibilmente, il grado di umidità è inferiore o uguale al 3% in peso, preferibilmente inferiore o uguale al 2,5%, preferibilmente inferiore o uguale al 2%, preferibilmente inferiore o uguale all'1,5%. La composizione solida, preferibilmente in forma

liofilizzata, può essere disciolta in acqua per preparazioni iniettabili (o "water for injection o WFI"), al fine di ottenere una formulazione per uso terapeutico. La formulazione iniettabile può essere somministrata per via parenterale (per via endovenosa, sottocutanea, intramuscolare), in una quantità apprezzata dal medico. Non è esclusa la somministrazione della forma liquida (prima dell'essiccazione) o della forma solida, con qualsiasi via appropriata e con qualsiasi mezzo appropriato. Il dosaggio di FVII utile nell'invenzione può essere determinato in modo appropriato in base al tipo di formulazione, al metodo di somministrazione, all'età e al peso del paziente, ai sintomi del paziente, alla gravità della malattia, ecc. La dose di FVII da somministrare secondo l'invenzione può essere scelta in modo vantaggioso tra 270 µg/kg e 2,70 µg/kg. Preferibilmente, la dose di FVII da somministrare è inferiore a 270 µg/kg di peso corporeo, preferibilmente è inferiore a 225 µg/kg di peso corporeo, preferibilmente è inferiore a 180 µg/kg di peso corporeo, preferibilmente è inferiore a 135 µg/kg di peso corporeo, preferibilmente è inferiore a 90 µg/kg di peso corporeo, preferibilmente è inferiore a 45 µg/kg di peso corporeo, preferibilmente è inferiore

a 9 µg/kg, preferibilmente è inferiore a 5,4 µg/kg, preferibilmente inferiore a 2,7 µg/kg. Una composizione di anticorpo multispecifico, come l'anticorpo emicizumab, è, ad esempio, quella descritta nelle domande di brevetto WO2017/188356 e WO2018/047813. Pertanto, in una forma di realizzazione, la composizione è una composizione liquida. In un esempio di realizzazione la composizione comprende:

- anticorpo bispecifico del fattore IX e del fattore X,
- un tensioattivo come il poloxamer 188 o il polisorbato 20
- tampone istidina - acido aspartico
- arginina

Più in particolare, la composizione può comprendere:

- da 20 mg/ml a 180 mg/ml di anticorpo bispecifico del fattore IX e del fattore X,
- da 0,2 mg/ml a 1 mg/ml di poloxamer 188,
- da 10 mM a 40 mM di tampone istidina-acido aspartico
- da 100 mM a 300 mM di arginina,

a un pH compreso tra 4,5 e 6,5

Il dosaggio della composizione di anticorpo multispecifico, come l'anticorpo emicizumab, utile nell'invenzione, può essere adeguatamente determinato

in base al tipo di formulazione, al metodo di somministrazione, all'età e al peso del paziente, ai sintomi del paziente, alla gravità della malattia, ecc. La dose di anticorpo può essere, ad esempio, compresa tra 0,3 e 5 mg/kg, preferibilmente al massimo 3 mg/kg una volta alla settimana durante un periodo iniziale, che può durare ad esempio 4 settimane, seguita da una dose di mantenimento, preferibilmente inferiore, ad esempio 1,5 mg/kg una volta alla settimana. Preferibilmente, la dose di anticorpo somministrata è inferiore a 5 mg/kg di peso corporeo, preferibilmente inferiore è a 3 mg/kg di peso corporeo, preferibilmente è inferiore a 1,5 mg/kg di peso corporeo, preferibilmente è inferiore a 1 mg/kg di peso corporeo, preferibilmente è inferiore a 0,5 mg/kg di peso corporeo, preferibilmente è inferiore a 0,1 mg/kg di peso corporeo, preferibilmente è inferiore a 0,05 mg/kg di peso corporeo. La composizione di anticorpo utile nell'invenzione può essere somministrata a un paziente con qualsiasi via idonea, ad esempio per via endovenosa, intramuscolare, intraperitoneale, intracerebrospinale, transdermica, sottocutanea, intraarticolare, sublinguale, intrasinoviale, orale o per inalazione. Preferibilmente, è preferibile la via endovenosa o

quella sottocutanea. Secondo una particolare forma di realizzazione, il fattore VII e l'anticorpo vengono somministrati simultaneamente al paziente. Secondo un'altra particolare forma di realizzazione, il fattore VII e l'anticorpo vengono somministrati separatamente al paziente, preferibilmente in sequenza.

Indicazioni terapeutiche

La combinazione qui descritta consente di prevenire o trattare i disturbi della coagulazione, in particolare l'emofilia con deficit del fattore VIII (emofilia di tipo A, preferibilmente emofilia acquisita A). Preferibilmente, i pazienti sono pazienti che presentano emofilia di tipo A, con anti-fattore VIII. La combinazione qui descritta consente di prevenire o trattare i disturbi della coagulazione, in particolare le carenze nei fattori VII. La combinazione qui descritta consente di associare l'effetto rapido di FVII attivando la via estrinseca della cascata della coagulazione e l'effetto prolungato degli anticorpi multispecifici qui descritti che attivano la via intrinseca della cascata della coagulazione. La combinazione offre una migliore gestione del paziente.

Esempi:

Esempio 1: Purificazione ed estrazione di FVII

transgenico

Il metodo di purificazione ed estrazione del fattore VII utilizzato in questo esempio è quello descritto nella domanda EP12305882. Le fasi di questo metodo sono descritte di seguito. Il latte di conigli transgenici è ottenuto dalla linea di conigli transgenici. Il latte di conigli transgenici congelato viene scongelato e concentrato in un pool di latte di conigli transgenici. Il pool di latte di conigli transgenici così ottenuto viene quindi sottoposto a una fase di chiarificazione mediante un filtro di profondità con porosità di 0,2 µm, al fine di rimuovere i lipidi e i composti insolubili. Il latte così chiarificato viene quindi sottoposto a un trattamento di inattivazione virale con un solvente di tipo detergente, ad esempio il polisorbato 80 o il fosfato tri-n-butilico a 25°C ± 2°C per almeno due ore. Tale trattamento consente in particolare di inattivare efficacemente i virus e, in particolare, i virus di tipo virale non incapsulati. Il latte chiarificato e viralmente inattivato viene quindi sottoposto a una fase cromatografica di affinità utilizzando un ligando di affinità specifico del fattore VII/fattore VIIa. L'eluato del fattore VII ottenuto alla fine di questa fase cromatografica viene quindi sottoposto a una fase

di ultrafiltrazione e formulazione, consentendo così di ottenere un concentrato intermedio del fattore VII avente una purezza del 95%. Il concentrato intermedio del fattore VII viene quindi sottoposto a una fase di filtrazione utilizzando un filtro con porosità compresa tra 0,1 µm e 0,2 µm seguito da una fase di nanofiltrazione su filtri con porosità di 20 nm e poi di 15 nm. Il prodotto così ottenuto e contenente il fattore VII viene quindi sottoposto a una fase cromatografica del tipo gel Q Sepharose XL e successivamente a una fase cromatografica del tipo CHT-I seguita dalla cromatografia del tipo SEC Superdex 200. Il concentrato di fattore VII così ottenuto viene quindi sottoposto a una fase di stabilizzazione e quindi filtrato attraverso un filtro con porosità di 0,2 µm. Il metodo così descritto permette di ottenere un concentrato di fattore VII avente una purezza di circa il 99,9995%.

Esempio 2: Confronto del potenziale trombogenico di NovoSeven®, Sevenfact® e Hemlibra®

Un tecnico del ramo può misurare il potenziale trombogenico di NovoSeven®, Sevenfact® e Hemlibra® (chiamato anche Emicizumab) eseguendo il seguente protocollo.

Reagenti:

- calibratore trombina (Stago)
- reagente PPP 5 pm (Stago)
- reagente PPP low (Stago)
- CK-Prest (Stago)
- Fluo-buffer (Stago)
- Fluo-substrate (Stago)
- Plasma carente di FVIII (Siemens)
- Sevenfact® /fattore VII transgenico prodotto nel coniglio 1 mg/ml (LFB)
- PNP (Cryo pep)
- NovoSeven® (NovoNordisk)
- Hemlibra®/Emicizumab (Roche / Genentech / Chugai)

Metodo:

Il test di generazione della trombina consiste nell'attivare la coagulazione ex vivo con una miscela di fattore tissutale e fosfolipidi (TF/PL), oppure utilizzando cefalina e misurando quindi la concentrazione di trombina generata nel tempo.

- Misurazione del potenziale trombogenico di NovoSeven® dopo l'induzione della coagulazione con TF/PL:

Il test di generazione della trombina è effettuato su 80 µL di un pool di plasma carente di FVIII che imita un plasma di emofilia A in presenza di 20 µL di reagente PPP (Stago) contenente 0,5 pM di fattore

tissutale (TF) e 4 μm di fosfolipidi (PL). La reazione viene avviata con l'aggiunta di 20 μL di Fluca-kit (substrato + CaCl_2) che è l'inizio della misurazione della generazione di trombina. La dose terapeutica di FVIIa è di 270 $\mu\text{g/kg}$, che corrisponde a 6 $\mu\text{g/mL}$ di FVIIa nel plasma, considerando un recupero del 100%. Il test di generazione della trombina viene eseguito a dosi NovoSeven® di 0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 6 $\mu\text{g/mL}$, in presenza di 0,5 pM TF / 2 μM PL (induttore di coagulazione).

- Misurazione del potenziale trombogenico di NovoSeven® dopo l'induzione della coagulazione con cefalina:

Il test di generazione della trombina è effettuato su 80 μL di un pool di plasma carente di FVIII che imita un plasma di emofilia A in presenza di 20 μL di cefalina (CK-Prest ricostituito con 5 mL di H_2O distillata). La reazione viene avviata con l'aggiunta di 20 μL di Fluca-kit (substrato + CaCl_2) che è l'inizio della misurazione della generazione di trombina. Il test di generazione della trombina viene eseguito a dosi NovoSeven® di 0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 6 $\mu\text{g/mL}$, in presenza di 20 μL di cefalina (induttore della coagulazione).

- Misurazione del potenziale trombogenico di

Sevenfact® dopo l'induzione della coagulazione con TF/PL:

Il test di generazione della trombina è effettuato su 80 µL di un pool di plasma carente di FVIII che imita un plasma di emofilia A in presenza di 20 µL di reagente PPP (Stago) contenente 0,5 pM di fattore tissutale (TF) e 4 µM di fosfolipidi (PL). La reazione viene avviata con l'aggiunta di 20 µL di Fluca-kit (substrato + CaCl₂) che è l'inizio della misurazione della generazione di trombina. Il test di generazione della trombina viene eseguito a dosi Sevenfact® di 0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL e 6 µg/mL, in presenza di 0,5 pM TF / 2 µM PL (induttore di coagulazione).

- Misurazione del potenziale trombogenico di Sevenfact® dopo l'induzione della coagulazione con cefalina:

Il test di generazione della trombina è effettuato su 80 µL di un pool di plasma carente di FVIII che imita un plasma di emofilia A in presenza di 20 µL di cefalina (CK-Prest ricostituito con 5 mL di H₂O distillata). La reazione viene avviata con l'aggiunta di 20 µL di Fluca-kit (substrato + CaCl₂) che è l'inizio della misurazione della generazione di trombina. Il test di generazione della trombina viene

eseguito a dosi Sevenfact® di 0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL e 6 µg/mL, in presenza di 20 µL di cefalina.

- Misurazione del potenziale trombogenico di Hemlibra® dopo l'induzione della coagulazione con TF/PL:

Il test di generazione della trombina è effettuato su 80 µL di un pool di plasma carente di FVIII che imita un plasma di emofilia A in presenza di 20 µL di reagente PPP (Stago) contenente 0,5 pM di fattore tissutale (TF) e 4 µM di fosfolipidi (PL). La reazione viene avviata con l'aggiunta di 20 µL di Fluca-kit (substrato + CaCl₂) che è l'inizio della misurazione della generazione di trombina. Hemlibra® (Roche/Genentech/Chugai, USA), un anticorpo bispecifico che imita la funzione di FVIII, viene utilizzato a una concentrazione massima di 50 µg/mL, che è la concentrazione rilevata nel paziente in trattamento (Oldenburg et al. NEJM, 2017). Il test di generazione della trombina viene eseguito a dosi di Hemlibra® di 0 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL e 50 µg/mL, in presenza di 0,5 pM TF/4 µM PL (induttore della coagulazione).

- Misurazione del potenziale trombogenico di Hemlibra® dopo l'induzione della coagulazione con

cefalina

Il test di generazione della trombina è effettuato su 80 μ L di un pool di plasma carente di FVIII che imita un plasma di emofilia A in presenza di 20 μ L di cefalina (CK-Prest ricostituito con 5 mL di H₂O distillata). La reazione viene avviata con l'aggiunta di 20 μ L di Fluca-kit (substrato + CaCl₂) che è l'inizio della misurazione della generazione di trombina. Il test di generazione della trombina viene eseguito a dosi Hemlibra® di 0 μ g/mL, 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 30 μ g/mL, 40 μ g/mL e 50 μ g/mL, in presenza di 20 μ L di cefalina. Per tutti questi test, la comparsa della fluorescenza è misurata su un fluorimetro Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) a una lunghezza d'onda di eccitazione di 390 nm e a una lunghezza d'emissione di 460 nm. I trombinogrammi (curve che rappresentano l'intensità della fluorescenza nel tempo) vengono quindi analizzati utilizzando il software Thrombinoscope™, che converte il valore della fluorescenza in nM di trombina mediante un calcolo comparativo. Viene eseguita la generazione di trombina e vengono registrate e confrontate variabili chiave per valutare la potenza di diversi farmaci: Potenziale trombina endogena (FTE), altezza di picco, tempo di latenza e velocità.

Esempio 3: Valutazione dei potenziali trombogeni sinergici di NovoSeven® e Hemlibra® o Sevenfact® e Hemlibra®

Un tecnico del ramo può misurare il potenziale trombogenico delle combinazioni NovoSeven®/Hemlibra® e Sevenfact®/Hemlibra® eseguendo il seguente protocollo.

Reagenti:

I reagenti, l'automa e il protocollo sperimentale nel plasma carente di FVIII sono identici a quelli descritti nell'esempio 2.

Metodo:

- Misurazione del potenziale trombogenico della combinazione NovoSeven® + Hemlibra® dopo l'induzione della coagulazione con TF/PL:

Il test di generazione della trombina è effettuato su 80 µL di un pool di plasma carente di FVIII che imita un plasma di emofilia A in presenza di 20 µL di reagente PPP (Stago) contenente 0,5 pM di fattore tissutale (TF) e 4 µM di fosfolipidi (PL). La reazione viene avviata con l'aggiunta di 20 µL di Fluca-kit (substrato + CaCl₂) che è l'inizio della misurazione della generazione di trombina. Il test di generazione della trombina viene eseguito in presenza di 0,5 pM TF/4 µM PL (induttore della coagulazione) su diverse

combinazioni NovoSeven®/Hemlibra®. La composizione contenente la maggiore quantità di prodotto è composta al massimo da 6 µg/mL di NovoSeven® e 50 µg/mL di Hemlibra®. Il potenziale trombogenico ottenuto in presenza della combinazione di prodotti viene confrontato con il potenziale dei singoli prodotti. Per prevedere un effetto sinergico della combinazione di prodotti, si valutano dosi più basse per essere sicuri di non saturare il rilevamento della trombina. Le composizioni testate contengono:

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

- Misurazione del potenziale trombogenico della combinazione NovoSeven® + Hemlibra® dopo l'induzione della coagulazione con cefalina

Il test di generazione della trombina è effettuato su 80 µL di un pool di plasma carente di FVIII che imita un plasma di emofilia A in presenza di 20 µL di cefalina (CK-Prest ricostituito con 5 mL di H₂O distillata). La reazione viene avviata con l'aggiunta di 20 µL di Fluca-kit (substrato + CaCl₂) che è l'inizio della misurazione della generazione di

trombina. Il test di generazione della trombina viene eseguito in presenza di 20 µL di cefalina su diverse combinazioni NovoSeven®/Hemlibra®. La composizione contenente la maggiore quantità di prodotto è composta al massimo da 6 µg/mL di NovoSeven® e 50 µg/mL di Hemlibra®. Il potenziale trombogenico ottenuto in presenza della combinazione di prodotti viene confrontato con il potenziale dei singoli prodotti. Per prevedere un effetto sinergico della combinazione di prodotti, si valutano dosi più basse per essere sicuri di non saturare il rilevamento della trombina. Le composizioni testate contengono:

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

- Misurazione del potenziale trombogenico della combinazione di Sevenfact® + Hemlibra® dopo l'induzione della coagulazione con TF/PL

Il test di generazione della trombina è effettuato su 80 µL di un pool di plasma carente di FVIII che imita un plasma di emofilia A in presenza di 20 µL di reagente PPP (Stago) contenente 0,5 pM di fattore tissutale (TF) e 4 µM di fosfolipidi (PL). La reazione

viene avviata con l'aggiunta di 20 µL di Fluca-kit (substrato + CaCl₂) che è l'inizio della misurazione della generazione di trombina. Il test di generazione della trombina viene eseguito in presenza di 0,5 pM TF/4 µM PL (induttore della coagulazione) su diverse combinazioni Sevenfact®/Hemlibra®. La composizione contenente la maggiore quantità di prodotto è composta al massimo da 6 µg/mL di Sevenfact® e 50 µg/mL di Hemlibra®. Il potenziale trombogenico ottenuto in presenza della combinazione di prodotti viene confrontato con il potenziale dei singoli prodotti. Per prevedere un effetto sinergico della combinazione di prodotti, si valutano dosi più basse per essere sicuri di non saturare il rilevamento della trombina. Le composizioni testate contengono:

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

- Misurazione del potenziale trombogenico della combinazione Sevenfact® + Hemlibra® dopo l'induzione della coagulazione con cefalina

Il test di generazione della trombina è effettuato su 80 µL di un pool di plasma carente di FVIII che imita

un plasma di emofilia A in presenza di 20 µL di cefalina (CK-Prest ricostituito con 5 mL di H₂O distillata). La reazione viene avviata con l'aggiunta di 20 µL di Fluca-kit (substrato + CaCl₂) che è l'inizio della misurazione della generazione di trombina. Il test di generazione della trombina viene eseguito in presenza di 20 µL di cefalina su diverse combinazioni Sevenfact®/Hemlibra®. La composizione contenente la maggior quantità di prodotto è costituita al massimo da 6 µg/mL di Sevenfact® e 50 µg/mL di Hemlibra®. Il potenziale trombogénico ottenuto in presenza della combinazione di prodotti viene confrontato con il potenziale dei singoli prodotti. Per prevedere un effetto sinergico della combinazione di prodotti, si valutano dosi più basse per essere sicuri di non saturare il rilevamento della trombina. Le composizioni testate contengono:

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

Per tutti questi test, la comparsa della fluorescenza è misurata su un fluorimetro Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) a una lunghezza d'onda di

eccitazione di 390 nm e a una lunghezza d'emissione di 460 nm. I trombinogrammi (curve che rappresentano l'intensità della fluorescenza nel tempo) vengono quindi analizzati utilizzando il software Thrombinoscope™, che converte il valore della fluorescenza in nM di trombina mediante un calcolo comparativo. Si considera un effetto sinergico, ad esempio, quando almeno uno dei parametri calcolati dalla prova di generazione della trombina per una data combinazione è superiore alla somma di ciascuno di questi parametri ottenuta con i soli componenti, dedotto dal rumore di fondo dell'esperimento.

Esempio 4: Confronto tra il potenziale di Sevenfact™, Hemlibra® e la combinazione dei due nel plasma emofilo

A:

Reagenti:

- calibratore trombina (Stago)
- reagente PRP reagent 1pM TF (Stago)
- reagente MP 4µM PL (Stago)
- Fluo-buffer (Stago)
- Fluo-substrate (Stago)
- Sevenfact™: Fattore VII transgenico prodotto nel coniglio 1 mg/mL (LFB)
- Hemlibra®: Emicizumab (Roche / Genentech / Chugai)
- Plasma emofiliaco A (Cryopep)

- Owren Koller (Stago)

Metodo:

Il test di generazione della trombina consiste nell'attivare la coagulazione *ex vivo*, ad esempio con una miscela di fattore tissutale e fosfolipidi (TF/PL), e quindi nella misurazione della concentrazione di trombina generata nel tempo. I test di generazione della trombina vengono effettuati con 80 μ L di plasma emofilo A (Cryopep), in presenza di 20 μ M di una miscela di reagenti PRP e MP (Stago) contenente 0,5 μ M di fattore tissutale e 4 μ M di fosfolipidi. La reazione viene avviata aggiungendo 20 μ L di Fluca-kit (substrato Fluo + CaCl_2), che corrisponde al punto iniziale della misurazione della generazione di trombina (TG). La fluorescenza è misurata mediante fluorimetria utilizzando l'apparato Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) a una lunghezza d'onda di eccitazione di 390 nm e a una lunghezza d'onda di emissione di 460 nm. I trombinogrammi vengono analizzati utilizzando il software Thrombinoscope™ che converte, mediante calcolo comparativo, l'intensità della fluorescenza nella concentrazione molare della trombina (nM). Per misurare il potenziale trombogenico delle due molecole, vengono studiati diversi plasmi emofili A. La dose terapeutica più elevata di FVIIa è

di 270 µg/kg, corrispondente a 6 µg/ml di FVIIa (o 120 nM) nel plasma. L'uso di questa dose può essere considerato un potenziale massimo per la generazione di trombina. In base alle concentrazioni circolanti ottenute nei pazienti, vengono studiate anche concentrazioni di Sevenfact™ comprese tra 20 e 100 nM. Hemlibra® (Roche / Genentech / Chugai, USA), un anticorpo bispecifico che imita la funzione di FVIII, viene utilizzato a una concentrazione massima di 120 µg/ml. La concentrazione attualmente rilevata nei pazienti sottoposti a trattamento è di 50 µg/ml (o 300 nM) (Oldenburg et al. NEJM, 2017). Pertanto, Hemlibra® viene utilizzato qui a circa 300 nM (50 µg/ml). Le variabili studiate per misurare il potenziale trombotico di Hemlibra®, di Sevenfact™ sono:

- il potenziale di trombina endogena (ETP): area sotto la curva che rappresenta la quantità totale di trombina generata,
- l'altezza di picco: la concentrazione massima di trombina misurata, e
- la velocità di generazione della trombina: velocità di formazione della trombina.

2 - Risultati

2.1 - Effetto di Sevenfact™ o Hemlibra® sui plasmi

emofili A

2.1.1 - Valutazione nel lotto 1 del plasma emofilo A

In questa matrice si ottengono segnali di generazione di trombina molto deboli provenienti dai due composti, indipendentemente dalle concentrazioni utilizzate. Infatti, la generazione di trombina osservata è praticamente zero per Hemlibra® e Sevenfact™ a concentrazioni di 20 e 40 nM. Con 100 nM di Sevenfact™, si osserva un picco di generazione di trombina molto basso (Tabella 1).

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

Tabella 1: Parametri di generazione della trombina da plasma emofilo A del lotto 1 trattato con Sevenfact™ o Hemlibra®

Quindi, ogni molecola utilizzata individualmente induce solo una generazione molto piccola di trombina.

2.1.2 - Valutazione nel lotto 2 di plasma emofilo A

È stato testato un secondo lotto di plasma emofilo A. Anche in questo caso, si osserva una generazione molto bassa di trombina con l'uso di Hemlibra® e Sevenfact™, con un picco massimo di generazione di trombina a una concentrazione di 100 nM di Sevenfact™ (Tabella 2).

	Sevenfact™ 20 nM	Sevenfact™ 40 nM	Sevenfact™ 100 nM	Hemlibra® 300 nM
PTE (nM.min)	221,25	280,75	414,25	196
Picco (nM)	9,93	12,84	21,04	8,895
Velocità (nM/min)	0,7	0,96	1,75	0,51

Tabella 2: Parametri di generazione della trombina da plasma emofilo A del lotto 2 trattato con Sevenfact™ o Hemlibra®

In questa matrice, Sevenfact™ e Hemlibra® utilizzati separatamente hanno un basso potenziale trombogenerico.

Esempio 5: Valutazione del potenziale trombogenerico sinergico della combinazione Sevenfact™ + Hemlibra®

1 - Protocollo

I reagenti, l'automa e il protocollo sperimentale nel plasma emofilia A sono identici a quelli descritti nell'esempio 2.

2 - Risultati

Come mostrato nell'esempio 2, Sevenfact™ e Hemlibra®, utilizzati singolarmente inducono una debole generazione di trombina nei plasmi emofili A. L'effetto sinergico della combinazione Sevenfact™ e Hemlibra® è studiato qui. Vengono studiate tre concentrazioni di Sevenfact™ (20 nM, 40 nM e 100 nM) in presenza di una concentrazione di Hemlibra® di 300 nM. Un effetto sinergico viene preso in considerazione

se l'effetto della combinazione Sevenfact™ + Hemlibra® è almeno 2 volte superiore alla somma degli effetti di Sevenfact™ e Hemlibra® presi separatamente per almeno uno dei parametri del test di generazione della trombina (PTE, picco di generazione della trombina e velocità).

2.1 – Effetto di Sevenfact™ e Hemlibra® sui plasmi emofili A dopo l'induzione della coagulazione con TF/PL

2.1.1 - Valutazione nel lotto 1 di plasma emofilo A

I risultati sono presentati nella tabella 3 e nella FIG. 1. A una concentrazione Sevenfact™ molto bassa di 20 nM, i rapporti per PTE (FIG. 1A), per il picco di trombina (FIG. 1B) e per la velocità (FIG. 1C) della combinazione Sevenfact™ + Hemlibra® sono rispettivamente 2,14, 2,95 e 4,19. Pertanto, anche alla concentrazione più bassa testata, si osserva un effetto trombogenico sinergico. A una concentrazione di 40 nM, per tutti i parametri testati, il rapporto è superiore a 2. Il rapporto ottenuto per il PTE è 2,75 (FIG. 1A), il rapporto ottenuto per il picco della trombina è 3,96 (FIG. 1B) e quello ottenuto per la velocità raggiunge un valore di 6,21 (FIG. 1C). In altre parole, il tasso di formazione della trombina viene moltiplicato per 6 quando si utilizzano

Sevenfact™ e Hemlibra® in combinazione. È a una concentrazione di 100 nM di Sevenfact™ che l'effetto sinergico è maggiore. A una concentrazione di 100 nM, per tutti i parametri testati, il rapporto è superiore a 2. Il rapporto ottenuto per il PTE è 4,00 (FIG. 1A) e il rapporto per il picco della trombina è 4,81 (FIG. 1B), ciò significa che la concentrazione massima di trombina generata è quasi 5 volte superiore quando si utilizzano Hemlibra® e Sevenfact™ in combinazione. Il rapporto corrispondente alla velocità è di 9,58 (FIG. 1C), il che significa che la trombina viene generata quasi 10 volte più rapidamente quando si utilizzano Sevenfact™ e Hemlibra® in combinazione.

			Combinazioni			Rapporti combinazione/somma		
PTE 20 nM Sevenfac t™ + PTE 300 nM Hemlibra ®	PTE 40 nM Sevenfac t™ + PTE 300 nM Hemlibra ®	PTE 100 nM Sevenfac t™ + PTE 300 nM Hemlibra ®	PTE (20 nM Sevenfac t™ + 300 nM Hemlibra ®)	PTE (40 nM Sevanfac t™ + 300 nM Hemlibra ®)	PTE (100 nM Sevenfac t™ + 300 nM Hemlibra ®)	20 nM Sevenf act™	40 nM Sevenf act™	100 nM Sevenf act™
253,25	282,50	257	543	777,50	1029	2,14	2,75	4,00
			Combinazioni			Rapporti combinazione/somma		
Picco 20 nM Sevenfac t™ + Picco 300 nM Hemlibra ®	Picco 40 nM Sevenfac t™ + Picco 300 nM Hemlibra ®	Picco 100 nM Sevenfac t™ + Picco 300 nM Hemlibra ®	Picco (20 nM Sevenfac t™ + 300 nM Hemlibra ®)	Picco (40 nM Sevenfac t™ + 300 nM Hemlibra ®)	Picco (100 nM Sevenfac t™ + 300 nM Hemlibra ®)	20 nM Sevenf act™	40 nM Sevenf act™	100 nM Sevenf act™
13,515	15,87	22,965	39,915	62,9	110,565	2,95	3,96	4,81

			Combinazioni			Rapporti combinazione/somma		
Velocità 20 nM Sevenfac t™ + Velocità 300 nM Hemlibra ®	Velocità 40 nM Sevenfac t™ + Velocità 300 nM Hemlibra ®	Velocità 100 nM Sevenfac t™ + velocità 300 nM Hemlibra ®)	Velocità (20 nM Sevenfact ™ + 300 nM Hemlibra®)	Velocità (40 nM Sevenfac t™ + 300 nM Hemlibra ®)	Velocità (100 nM Sevenfac t™ + 300 nM Hemlibra ®)	20 nM Sevenf act™	40 nM Sevenf act™	100 nM Sevenf act™
1,01	1,42	2,06	4,24	7,86	19,78	4,19	6,21	9,58

Tabella 3: Parametri di generazione della trombina dal plasma emofilo A del lotto 1 trattato con combinazione Sevenfact™ + Hemlibra®

In conclusione, per tutte le concentrazioni di Sevenfact™ testate, Sevenfact™ e Hemlibra® utilizzati in combinazione hanno un effetto sinergico sulla generazione di trombina.

2.1.2 - Valutazione nel lotto 2 del plasma emofilo A

I risultati sono presentati nella tabella 4 e nella FIG. 2. A una concentrazione di Sevenfact™ molto bassa di 20 nM, si ottiene un rapporto di 2,21 per il parametro PTE (FIG. 2A), si ottiene un rapporto di 2,34 per il picco della trombina (FIG. 2B), e si ottiene un rapporto di 2,9 per il parametro di velocità (FIG. 2C) della combinazione Sevenfact™ +Hemlibra®. Pertanto, anche alla più bassa concentrazione testata di Sevenfact™, si osserva un effetto trombogenico sinergico. A una concentrazione di 40 nM, il rapporto corrispondente al PTE è 2,29 (FIG. 2A), quello corrispondente al picco della trombina è 2,79 (FIG.

			Combinazioni			Rapporti combinazione/somma		
Velocità 20 nM Sevenfac t™ + Velocità 300 nM Hemlibra ®	Velocità 40 nM Sevenfac t™ + Velocità 300 nM Hemlibra ®	Velocità 100 nM Sevenfac t™ + PTE 300 nM Hemlibra ®	Velocità (20 nM Sevenfac t™ + 300 nM Hemlibra ®)	Velocità (40 nM Sevenfac t™ + 300 nM Hemlibra ®)	Velocità (100 nM Sevenfac t™ + 300 nM Hemlibra ®)	20 nM Sevenf act™	40 nM Sevenf act™	100 nM Sevenf act™
1,21	1,48	2,27	3,52	5,44	12,77	2,9	3,68	5,63

Tabella 4: Parametri di generazione della trombina dal lotto 2 di plasma emofilo trattato con la combinazione Sevenfact™ + Hemlibra®

In conclusione, per tutte le concentrazioni di Sevenfact™ testate, Sevenfact™ e Hemlibra® utilizzati in combinazione hanno un effetto sinergico sulla generazione di trombina.

Rivendicazioni

1. Composizione farmaceutica comprendente:
 - a. fattore transgenico VII, e
 - b. un anticorpo multispecifico diretto contro il fattore IX e il fattore X.
2. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, in cui detto fattore transgenico VII è un fattore umano VII derivato dalla produzione da cellule epiteliali delle ghiandole mammarie di un mammifero transgenico non umano.
3. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 2, in cui detto mammifero transgenico è un coniglio.

4. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui l'anticorpo è emicizumab.

5. Prodotto combinato comprendente:

a. fattore transgenico VII, e

b. un anticorpo multispecifico diretto contro il fattore IX e il fattore X, da utilizzare nella prevenzione o nel trattamento di un disturbo della coagulazione in un paziente.

6. Prodotto combinato da utilizzare secondo la rivendicazione 5 nel trattamento dell'emofilia A.

7. Prodotto combinato per il suo uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5 o 6, nel trattamento dell'emofilia A con inibitori del fattore VIII.

8. Prodotto combinato per il suo uso secondo le rivendicazioni da 5 a 7, il cui prodotto combinato è sotto forma di composizione farmaceutica quale definita secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4.

9. Prodotto combinato per l'uso secondo le rivendicazioni da 5 a 8, detto fattore VIIa e detto anticorpo essendo in una forma idonea per la somministrazione simultanea al paziente.

10. Prodotto combinato per l'uso secondo le rivendicazioni da 5 a 8, detto fattore VIIa e detto

anticorpo essendo in forme idonee per la somministrazione separata a detto paziente.

11. Kit comprendente

- un contenitore contenente il fattore FVII transgenico; e
- un altro contenitore contenente un anticorpo diretto contro il fattore IX e il fattore X.

Per traduzione conforme al testo originale

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

DIDASCALIA DELLE FIGURE

FIGG. 1A, 1B, 2A, 2B

Combinazione.

FIGG. 1C, 2C

Velocità; velocità combinazione.

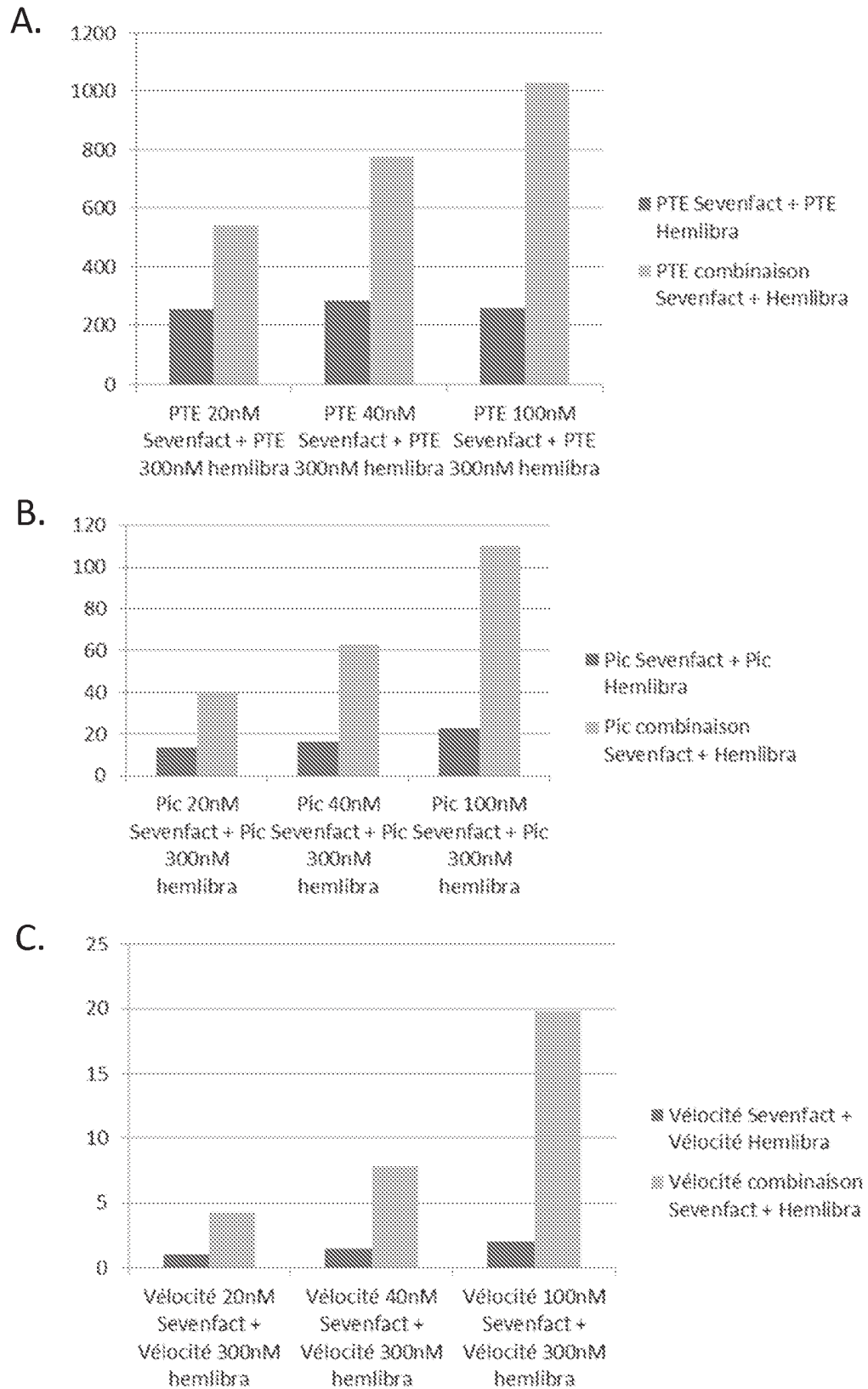


FIGURE 1

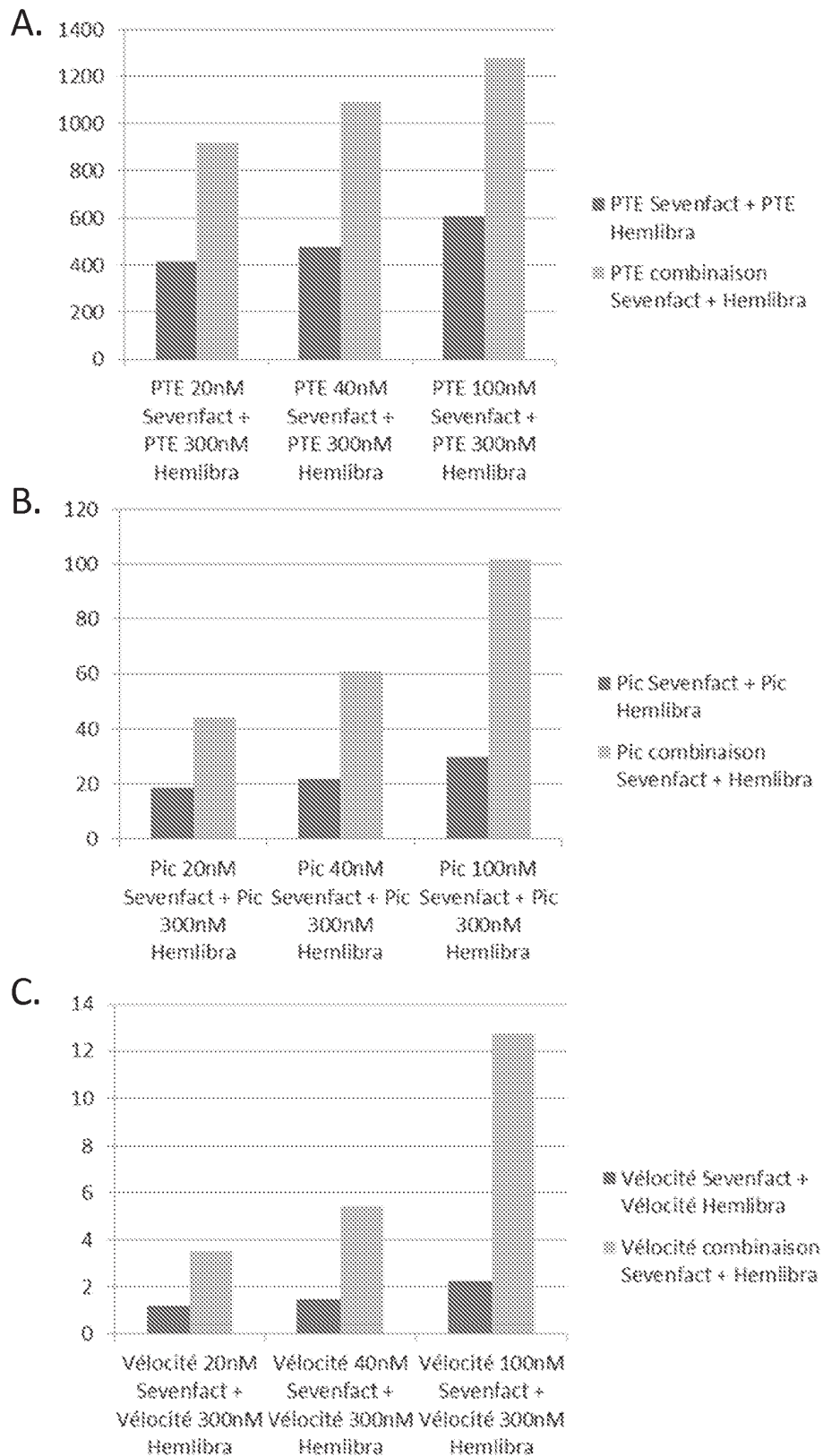


FIGURE 2