



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 132**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/36** (2006.01)  
**A61P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05724134 .1**  
96 Fecha de presentación : **28.02.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1755652**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Factor IXa para el tratamiento de trastornos hemorrágicos.**

30 Prioridad: **19.03.2004 US 554726 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.04.2011**

73 Titular/es: **BAXTER INTERNATIONAL Inc.**  
**One Baxter Parkway**  
**Deerfield, Illinois 60015, US**  
**BAXTER HEALTHCARE S.A.**

72 Inventor/es: **Donovan, Shane y**  
**Baker, Donald, A.**

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 357 132 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Factor IXa para el tratamiento de trastornos hemorrágicos

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos 60/554.726, presentada a 19 de marzo de 2004.

### 5 Campo de la Invención

La presente invención se refiere al tratamiento de patologías de la coagulación sanguínea con preparaciones farmacéuticas que contienen Factor IXa.

#### Antecedentes de la Invención

10 La coagulación de la sangre es un proceso biológico dinámico y complejo que depende de una serie de reacciones bioquímicas interdependientes. En cada etapa de la serie se genera una proteasa activa a partir de un precursor inactivo. Cada proteasa nuevamente generada, a su vez, actúa en su sustrato, otra proteasa precursora, para generar una reacción en cascada. Esta cascada produce esencialmente la suficiente trombina activa para generar un coágulo estable.

15 La parte terminal de esta cascada tiene lugar en la membrana fosfolipídica de las plaquetas. En su superficie, el Factor IXa (activado por el Factor XIa o VIIa, ilustrado en la Figura 1), y en presencia de su co-factor, el Factor VIII, activa el Factor X en Factor Xa. El Factor Xa activa la protrombina en trombina, que activa luego el fibrinógeno para formar el coágulo de fibrina; el papel específico del Factor VIII consiste en potenciar la catálisis del Factor X por el Factor IXa, ya que el Factor IXa solo sólo puede activar lentamente el Factor X *in vitro* (Van Dieijen y col., J. Biol. Chem. 10 de abril de 1981:256(7):3433-42).

20 La patología de la coagulación sanguínea más común, la Hemofilia A, es una deficiencia hereditaria ligada a X que conduce a niveles reducidos de Factor VIII circulante en la sangre de los individuos afectados. Se utilizan preparaciones concentradas de Factor VIII para tratar a estos individuos con el fin de restablecer sus niveles de FVIII circulante a niveles funcionales. Sin embargo, en aproximadamente un 20% de estos pacientes se producen allo-anticuerpos inhibidores contra FVIII, anulando la eficacia de este tratamiento.

25 El tratamiento de pacientes que se han vuelto refractarios a la terapia de reemplazo de FVIII incluye la inducción de tolerancia inmune (ITI), la terapia de reemplazo por FVIII Porcino y una variedad de preparaciones de las que se supone emulan los requisitos para el tratamiento con FVIII en la coagulación. Estas preparaciones alternativas incluyen FVIIa recombinante, Concentrados de Complejo de Protrombina y Concentrados de Complejo de Protrombina activado (aPCCs).

30 Se ha especulado sobre la posibilidad de que las sustancias terapéuticamente eficaces sobre los aPCCs sean diversas combinaciones de los factores siguientes: Trombina, Factor VIIa, Factor IXa, Factor Xa, Factor XIa, Factor XIIa, complejo Protrombina/Factor Xa. Sin embargo, el mecanismo preciso de acción *in vivo* para los aPCCs sigue siendo controvertido.

35 La EP 1 635 861 de NIBSC representa la técnica anterior bajo A54(3) y describe la utilización en medicina de una preparación que comprende Factor IXa. Esta preparación contiene Factor VIII o se emplea para la administración de forma simultánea, simultánea por separado o secuencialmente, en el mismo régimen de tratamiento, con una segunda preparación que comprende Factor VIII, objeto que es rechazado por el presente paciente.

#### Sumario de la Invención

40 La presente invención proporciona un método para tratar trastornos hemorrágicos en un sujeto mediante la administración de una preparación enriquecida con Factor IXa. El Factor IXa para su utilización en la presente invención se puede producir por medio de la activación proteolítica de Factor IX obtenido de forma recombinante. El ADNc que codifica para el Factor IX se aísla, se caracteriza y se clona en vectores de expresión. Véase, por ejemplo, Choo y col., Nature 299:178-180 (1982); Fair y col., Blood 64:194-204 (1984) y Kurachi y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79:6461-6464 (1982). Se ha obtenido un Factor IX recombinante mediante técnicas recombinantes, tal como se describe en la Patente US 4.770.999, de Kaufmann y col., Sep. 13, 1988, la cual se incorpora aquí como referencia. La invención proporciona asimismo un método para preparar y aislar Factor IXa de una fracción plasmática tal como pasta de la Fracción IV-1 de Cohn. Se lleva a cabo por catálisis lenta la conversión del Factor IX en Factor IXa, introduciéndose una etapa de intercambio iónico como modificación de los procedimientos existentes, (descritos en las Patentes US 3.560.475 y 4.286.056) para purificar selectivamente el Factor IXa de las impurezas presentes. Esta preparación enriquecida con Factor IXa es capaz de corregir el fenotipo hemorrágico del Factor VIII del ratón deficiente en Factor VIII (ratón-*fviii-l*). Por tanto, posee utilidad clínica en el tratamiento de trastornos hemorrágicos asociados a la Hemofilia. Además, otra utilidad adicional de la invención consiste en que elimina la actividad de la precalicreína (PKA) del material de partida de Autoplex-T.

### Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: muestra la activación del Factor IX por el Factor XIa y calcio o el factor tisular-Factor VIIa, que resulta en la segmentación de un enlace de Arginina (Arg) Alanina (Ala) y la formación del Factor IX $\alpha$ , intermedio inactivo del Factor IXa. La segmentación de un segundo enlace, Arg 180-Valina 181 (Val) resulta en la formación del Factor IX $\alpha\beta$ , la forma activa del Factor IX (denominado Factor IXa) y la liberación de un fragmento peptídico de aproximadamente 10 kDa (la figura se modifica a partir de Royal A McGraw y col., Clinics in Haematology-Vol. 14, 2 de junio de 1985). Los experimentos de inmunoblot utilizados en las figuras posteriores emplean una electroforesis en gel de poliacrilamida y sulfato de dodecil-sodio (SDS-PAGE) para reducir las proteínas en preparaciones específicas. Debido a que estos geles se obtuvieron en condiciones de reducción, el enlace disulfuro que une el heterodímero se rompe y las cadenas pesadas y ligeras del Factor IX se reducen como especies discretas. Por ejemplo, en el caso del Factor IX $\alpha\beta$ , las cadenas pesadas y ligeras se reducirán a aproximadamente 30 y 20 kDa respectivamente. En esta estrategia, la concentración de las enzimas catalíticas sería significativamente más baja que el Factor IX, facilitando su eliminación posterior mediante una cromatografía adicional, tal como una columna de afinidad monoclonal para el Factor IX.

Figura 2a: es un inmunoblot que mide la cantidad de Factor IX activado en preparaciones específicas de Autoplex-T mediante un anticuerpo monoclonal específico de la cadena pesada del Factor IX. Se cargaron en el gel las cantidades indicadas de Factor IXa purificado activado. Se cargaron en cada calle cinco  $\mu$ l de cada preparación de Autoplex-T. Por tanto, la concentración aproximada de Factor IX activado en 2839B065 y 2839B055 se encuentra entre 20 y 50 ng/ $\mu$ l. Las Unidades de Corrección del Factor Ocho (FECUs) para cada preparación de Autoplex-T (Números de lotes 2839B065, 2839B055, 2839B053) vienen indicadas debajo de la calle apropiada. Estos resultados indican también que la cantidad de Factor IX activado está en correlación positiva con la potencia FECU.

Figura 3: es un inmunoblot con un anticuerpo monoclonal específico de la cadena pesada del Factor IX que utiliza un panel de lotes de fabricación de Autoplex-T producidos en 2002 y 2003 que se situaban por encima de la potencia mínima aceptable (> a 6 unidades FECU por ml). Las Unidades de Corrección del Factor Ocho (FECUs) para cada preparación de Autoplex-T vienen indicadas debajo de cada calle apropiada. En todos los casos, el Factor IX ha sido activado en Factor IXa.

Figuras 4A y B: muestran la dosis-respuesta del Factor IX purificado activado en una prueba de coagulación FECU. En este experimento se utilizan cantidades crecientes de Factor XIa (0, 10, 20, 30, 50 y 75 ng por ml) para regular la cantidad de Factor IXa activado, que se utilizó posteriormente en una prueba de coagulación FECU. La Figura 4A es un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie que muestra que, a concentraciones crecientes de Factor XIa, se produce más Factor IX activado. Para comparar, se redujeron en el mismo gel estándares purificados de Factor IXa y Factor IX. En la Figura 4B, cada parte alícuota del producto de digestión se analizó entonces mediante un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada procedente de plasma deficiente en FVIII. Las cantidades de Factor XIa (0-75 ng/ml) añadidas no tienen una actividad FECU significativa en este experimento. Estos resultados muestran que el Factor IX activado tiene una actividad emuladora del Factor VIII.

Figura 5a: representación esquemática que muestra el esquema de purificación para purificar el Factor IXa de las preparaciones de Autoplex-T.

Figura 5B: demuestra por inmunoblot (con un anticuerpo monoclonal específico de la cadena pesada del Factor IX) que la concentración de Factor IX activado en el eluato de Q-separosa mezclado es similar a una preparación de Autoplex-T.

### Descripción Detallada de la Invención

La invención proporciona un método para tratar a un sujeto con un trastorno hemorrágico mediante la administración de una preparación farmacéutica que contiene FIXa concentrado que no tiene actividad PKA detectable. Sorprendentemente, el FIXa inicia la coagulación en un sujeto sin FVIII endógeno o con una forma endógena inactiva de FVIII.

Para elaborar el concentrado de Factor IXa, el material de partida puede ser el Factor IX producido de forma recombinante, tal como se describe en la patente de Estados Unidos N° 4.770.999, que se incorpora aquí como referencia. Brevemente, se incuban 114  $\mu$ g/ml (2  $\mu$ M) de Factor IX recombinante a 37°C con 2,4  $\mu$ g por ml (30 nM) de Factor XIa en una solución salina tamponada con Tris a 7,4 que contiene 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Se deja digerir esta reacción a 37°C durante dos horas. Alternativamente, se incuban 114  $\mu$ g/ml (2  $\mu$ M) de Factor IX recombinante con Factor VIIa y Factor Tisular a 1  $\mu$ g por ml (20 nM) a 37°C en una solución salina tamponada con Tris que contiene 5 mM Ca<sup>2+</sup> y 1 mM adaptado a partir de Zhong y col., Proc Natl Acad Sci U.S.A., 26 de abril de 1994; 91(9):3574-8. Además, en ambas reacciones de activación se elimina una parte alícuota, se añade un volumen igual de tampón de muestra 2X para SDS-PAGE de reducción y se reduce en geles de poliacrilamida al 10% para asegurar que el Factor IX se convierte cuantitativamente en Factor IXa. La preparación de Factor IX activado se diluye en una solución salina de citrato heparinizada en partes alícuotas individuales que son adecuadas para la administración a un sujeto mamífero. Si se desea, los catalizadores, el Factor XIa o el TF/Factor VIIa se podrían eliminar mediante purificación selectiva del Factor IXa utilizando una columna Sepharose 4B con anti-FIX:Mg(II) IgG (1 mg de IgG/ml de gel) tal como se describen en Wojcik y col., Biochem. J. (1997) 323 (629-636). El FIXa unido se eluye de la columna mediante un tampón que contiene 5 mM Tris EDTA Acetato (pH 7,5), 150 mM NaCl, 10 mM benzamidina y 10 mM EDTA. El Factor IXa eluido se dializa

posteriormente en un tampón que contiene una solución salina de citrato heparinizada y se divide en partes alícuotas en concentraciones adecuadas para la administración a un sujeto mamífero.

5 Para elaborar el concentrado de Factor IXa, el material de partida puede ser también un precipitado de la fracción IV-1 de plasma de Cohn. El precipitado se disuelve en una solución salina hasta una concentración del 10% en peso/volumen a aproximadamente 20°C y luego se purifica parcialmente mediante adsorción en fosfato de calcio tribásico, tal como se describe en la patente de Estados Unidos N° 3.560.475.

El eluyente de fosfato de calcio tribásico se purifica después y se concentra mediante precipitación de polietilenglicol (PEG) tal como se expone en la patente de Estados Unidos N° 3.560.475. El precipitado resultante se disuelve en una solución de citrato de sodio 0,2M y su pH se ajusta tal como se describe en la patente de Estados Unidos N° 4.286.056.

10 Se utiliza sílice a una concentración de 0,5 mg/l para activar el Factor XI en Factor XIa. El Factor XI es un constituyente de las pasta de Fracción IV-1. El Factor XIa activa el Factor IX en la pasta en Factor IXa.

15 La solución en masa que contiene el Factor IXa activado entonces se purifica aún más y se concentra en una resina de Q-Sepharose. Se elimina el flujo y se eluyen las proteínas unidas mediante una solución de citrato de sodio con un gradiente de concentración creciente en NaCl. Entonces se realizan las pruebas apropiadas de las fracciones de eluyente. Se agrupan las fracciones que contienen la concentración más alta de Factor IXa. Esta fracción de Q-Sepharose está enriquecida en Factor IXa y no posee actividad de PKA.

20 La invención se llevó a cabo después de que una caracterización bioquímica de un aPCC, Autoplex-T, revelara que, inesperadamente, contiene una alta concentración de Factor IX activado (20-50 µg por ml). Además, la concentración de Factor IX activado está en correlación con la Actividad de las Unidades de Corrección del Factor Ocho (FECU) del Autoplex-T (Figura 2). La prueba de actividad FECU mide lo rápido que una preparación de Autoplex coagula un plasma deficiente en Factor VIII (descrito en la patente de Estados Unidos N° 4.286.056). Esta prueba se utiliza para indicar la potencia del producto Autoplex-T, ya que se piensa que emula la utilidad clínica del Autoplex-T: a saber la capacidad para emular la necesidad en Factor VIII de la coagulación.

25 Las Figuras 2 y 3 demuestran que, en múltiples lotes de fabricación de Autoplex-T, el Factor IX se activa en Factor IXa. La correlación entre el contenido en Factor IXa del Autoplex y la actividad FECU indica que el Factor IXa podría ser el ingrediente activo farmacéutico de Autoplex. La Figura 4 demuestra que el Factor IXa purificado corrige el tiempo de coagulación del plasma deficiente en Factor VIII de forma dosis-dependiente, coherentemente con esta noción. Para evaluar esta hipótesis, obtuvimos una preparación más purificada de Factor IXa a partir de Autoplex-T utilizando una etapa cromatográfica de intercambio iónico, la preparación Q-purificada del Factor IXa, a partir de Autoplex-T utilizando una etapa cromatográfica de intercambio iónico, Q-sefarosa (Figuras 5A y 5B). Luego comparamos la eficacia biológica de esta preparación mediante un estudio hemorrágico en ratones deficientes en el gen del *fviii-1*. Los resultados (Tablas 3 y 4) demuestran que la preparación de Factor IXa purificado es capaz de salvar el fenotipo hemorrágico de estos ratones hemofílicos.

35 El Autoplex-T contiene cantidades significativas de Actividad de Precalicroína debido a la presencia de βFXIIa, fragmento proteolítico del Factor XII. La actividad del PKA es un atributo marcado no deseable del Autoplex-T, ya que está asociado a síntomas clínicos significativos tales como dolor e hipotensión. Una utilidad adicional de la invención consiste en que la purificación del Factor IXa en la columna de Q-sefarosa elimina sustancialmente la actividad de PKA de la preparación (Tabla 1).

40 Los siguientes ejemplos se refieren al aislamiento inicial de dicha preparación de Factor IXa y a la demostración de que es eficaz en el tratamiento de trastornos hemorrágicos.

#### Ejemplo I

45 Una cantidad suficiente de precipitado de fracción IV-1 de la Fracción de Cohn se suspendió en una solución salina al 0,9% para elaborar una solución al 10% peso/volumen fabricada de forma típica tal como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 3.560.475 y 4.286.056. Se ajustó el pH a 7,2 con hidróxido de sodio 1N, creando el sedimento. Después de centrifugación, se añadió fosfato de calcio al sobrenadante. Se mezcló la solución y se centrifugó para recuperar el precipitado adsorbido en fosfato de calcio. El precipitado se resuspendió en citrato de sodio 0,1M con un volumen igual al 4% del volumen de la pasta de IV-1 suspendido. Se centrifugó la suspensión y se recuperó el sobrenadante que contenía los Factores de coagulación.

#### Ejemplo II

50 Este sobrenadante se ajustó con 0,5 g/l de sílice durante el tiempo determinado para alcanzar un nivel de Factor XIa de aproximadamente 0,02 U/ml según se mide en el ensayo cromogénico basado en el péptido S-2222 con una parte alícuota tal como se ha descrito anteriormente. La activación finalizó con la filtración de la mezcla por un filtro de 1,5 micras.

**Ejemplo III**

El producto del Ejemplo II se purificó luego mediante precipitación con polietilenglicol (PEG). Primero, se llevó la solución a un 5% peso/volumen de PEG mediante la adición de PEG sólido con un peso molecular medio de 4.000. Se centrifugó la suspensión, se ajustó el pH del sobrenadante a 5,2 con ácido clorhídrico 1N, luego se llevó a una solución al 20% peso/volumen de PEG mediante la adición de PEG sólido adicional. Se centrifugó esta suspensión, se disolvió el precipitado en una disolución de citrato de sodio 0,02M que contenía un 0,72% de cloruro de sodio y 1,5 unidades de heparina/ml (denominada en adelante solución salina de citrato heparinizada) y se ajustó el pH a 7,0. Se determinó que la potencia de este material era de 23 unidades FECU por ml.

En el ensayo FECU, una unidad de FECU se define como aquella cantidad de complejo de protrombina activada diluida al 1:20 que, al ser añadida a igual volumen de plasma deficiente en Factor VIII o conteniendo el inhibidor de FVIII, corregirá el tiempo de coagulación (tiempo de tromboplastina parcial activada por ácido eláxico) a 35 segundos (normal).

**Ejemplo IV**

Se empacó una columna estéril con Q-Sefarosa Fast Flow™ (Amersham Biosciences). Se equilibró la columna con la solución salina de citrato heparinizada estéril conteniendo NaCl 0,025M. Tras la aplicación del producto procedente del Ejemplo III, se lavó la columna con el mismo tampón. Se eluyó el Factor IXa con la solución salina de citrato heparinizada conteniendo cantidades crecientes de NaCl desde 0,025 a 0,25M. Se tomaron muestras a intervalos durante la elución y se agruparon aquellas con la más alta concentración de Factor IXa, según se determina por inmunoblot. Este pool entonces se diluyó posteriormente en la solución salina de citrato heparinizada, pH 7,0 para controlar el incremento de la concentración durante la cromatografía. Pequeñas partes alícuotas de la masa se diluyeron con la solución salina de citrato heparinizada y se ensayaron en busca de la actividad de corrección del Factor VIII con el fin de determinar qué dilución haría bajar los niveles de potencia a 23 FECU/ml (potencia del material de partida). La cantidad de Factor IXa activado en la preparación se determinó por inmunoblot (Figura 4B) y demostró ser similar a una preparación de Autoplex-T.

La calicreína (calicreína en plasma) es una enzima que está implicada en la conversión del quinínogeno en quininas, que a su vez pueden favorecer la hipotensión y los síntomas no deseados asociados en un paciente. El activador de la precalicreína (PKA) es una enzima que convierte la precalicreína en calicreína. La referencia CBER utilizada como estándar para el ensayo de PKA cita el beta-factor XIIa como componente del PKA (CBER Laboratory of Standards and Testing DMPQ/CBER/FDA Product Information Circular for Reference Prekallikrein Activator (PKA) lot #3, date printed 3/31/99). Se midió la concentración de activador de precalicreína (PKA) en el Autoplex-T y en la preparación de FIXa purificado mediante un ensayo cromogénico (Tankersley y col., Blood, 62 (2):448-456, 1983).

La Tabla 1 muestra que la actividad de PKA se elimina de la preparación mediante la introducción de la etapa con Q-sefarosa. La actividad de PKA se presenta como porcentaje del Centro para la Evaluación e Investigación Biológica (CBER). Los resultados indican que la mayoría de la actividad de PKA en el material de partida no se recupera en el eluato de Q-sefarosa.

**Tabla 1**

Muestra	Autoplex-T	Flujo por Q	Q-eluato agrupado
% de actividad de PKA	> 675%	> 675%	No detectable

**Ejemplo V**

A continuación se describe el protocolo experimental que evalúa la hemorragia y la coagulación en ratones con *fviii-l*. Se congelaron partes alícuotas de muestras de prueba a -70°C en una solución salina de citrato heparinizada y se utilizaron una vez descongeladas rápidamente. Se inyectaron a grupos de cinco ratones con *fviii-l* dosis crecientes de Factor IXa o de complejo coagulante anti-inhibidor Autoplex-T. Se inyectaron a los grupos con Factor IXa las siguientes dosis de Factor IX activado, 0,002 µg/g, 0,01 µg/g, 0,02 µg/g, 0,13 µg/g ó 0,26 µg/g. Se inyectaron los grupos con Autoplex-T 0,01 FECU/g, 0,075 FECU/g ó 0,150 FECU/g como control positivo. Se inyectó a los cinco ratones con *fviii-l* una solución salina de citrato heparinizada. Después de un período de incubación de 30 minutos para todos los ratones, se realizó un estudio hemorrágico de la vena lateral de la cola. De forma específica, se realizó una incisión en la vena lateral de la cola y la cantidad de sangre que se descargó se recogió durante un período de treinta minutos. Al final de este período, se cauterizó la herida para impedir la letalidad debido a una pérdida excesiva de sangre. Además, se realizó una incisión en un grupo de 14 ratones con *fviii-l* sin tratamiento alguno y se midió la cantidad de sangre que se recogió en momentos específicos.

La evaluación de la eficacia hemostática de estas preparaciones se evaluaría mejor midiendo la letalidad del ratón debida a la hemorragia. Los métodos que miden la hemostasis mediante el registro de la pérdida de sangre en determinado período de tiempo se ven bloqueados por una gran variación de las velocidades de hemorragia de un ratón

a otro, como lo demuestran los resultados en el Tabla 3. Sin embargo, para evitar una letalidad innecesaria de los ratones, concebimos la prueba para buscar una clara evidencia de hemostasis en ratones individuales tratados con estas preparaciones, quedando bien entendido que no todos los ratones de cada grupo tratado pararía de sangrar en el marco temporal de treinta minutos durante el cual se registró la pérdida de sangre.

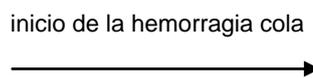
5 **Tabla 2** Protocolo experimental para evaluar la capacidad de un control negativo (HCS), Autoplex-T y Factor IXa Purificado para corregir el fenotipo hemorrágico de ratones con *fviii-l*

**A)** *FVIII* -/- (14 ratones)

**B)** Vehículo HCS (5 ratones)

**C)** Autoplex-T (15 ratones)

**D)** Factor IXa purificado (25 ratones)



Prueba por vol. de pérdida de sangre y concentración en hemoglobina

Autoplex-T			
<b>Grupo</b>	1	2	3
<b>Dosis</b>	0,01 FECU/g	0,075 FECU/g	0,150 FECU/g
<b>Nº de ratones</b>	5	5	5

Factor IXa					
<b>Grupo</b>	1	2	3	4	5
<b>Dosis</b>	0,002 µg/g	0,01 µg/g	0,02 µg/g	0,13 µg/g	0,26 µg/g
<b>Ratones</b>	5	5	5	5	5

**Tabla 3** Cantidad de volumen de sangre perdida y concentraciones de Hemoglobina en ratones con *fviii-l*

Ratón #	Genotipo	Tiempo Transcurrido	Producto Utilizado	Conc.	Pérdida Sangre	Hemoglobina
14'35	Hemofílico	5 min.	Ninguno	N/a	340 µl	14,2 g/dl
14'37	Hemofílico	5 min.	Ninguno	N/a	200 µl	14,7 g/dl
14'39	Hemofílico	5 min.	Ninguno	N/a	400 µl	14,7 g/dl
14'50	Hemofílico	5 min.	Ninguno	N/a	80 µl	9,8 g/dl
14'51	Hemofílico	5 min.	Ninguno	N/a	78 µl	10,3 g/dl
14'53	Hemofílico	5 min.	Ninguno	N/a	80 µl	10,2 g/dl
12'10	Hemofílico	15 min.	Ninguno	N/a	300 µl	14,5 g/dl
14'5	Hemofílico	15 min.	Ninguno	N/a	100 µl	12,2 g/dl
14'55	Hemofílico	15 min.	Ninguno	N/a	125 µl	13,6 g/dl
12'7	Hemofílico	30 min.	Ninguno	N/a	100 µl	13,2 g/dl
12'6	Hemofílico	30 min.	Ninguno	N/a	65 µl	7,6 g/dl
12'9	Hemofílico	30 min.	Ninguno	N/a	75 µl	8,7 g/dl
14'11	Hemofílico	30 min.	Ninguno	N/a	350 µl	17,6 g/dl
14'14	Hemofílico	30 min.	Ninguno	N/a	250 µl	17,8 g/dl

10

Como se puede observar a partir de los resultados de la Tabla 3, los ratones deficientes en Factor VIII sangran cuando se hace una incisión en sus colas. La cantidad de sangre recogida de cada ratón es variable y oscila entre 65 µl y 400 µl.

Tabla 4 Resultados del estudio hemorrágico de las colas

Ratón #	Genotipo	Tiempo	Producto	Conc.	Pérdida Sangre	Hemoglob.
1	Normal	30 min.	Ninguno	N/a	5 µl	3,9 g/dl
2	Normal	30 min.	Ninguno	N/a	10 µl	4,0 g/dl
3	Normal	30 min.	Ninguno	N/a	80 µl	12,4 g/dl
4	Normal	30 min.	Ninguno	N/a	5 µl	0 g/dl
5	Normal	30 min.	Ninguno	N/a	0 µl	0 g/dl
14,18	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,26 µg/g	275 µl	16,6 g/dl
14,16	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,26 µg/g	400 µl	17,6 g/dl
14'12	Hemofílico	13 m 30	Factor IXa	0,26 µg/g	500 µl	14,9 g/dl
14'89	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,26 µg/g	180 µl	9,9 g/dl
14'81	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,26 µg/g	395 µl	17,6 g/dl
14'75	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,13 µg/g	395 µl	16,7 g/dl
14'76	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,13 µg/g	70 µl	16,0 g/dl
14'72	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,13 µg/g	250 µl	13,1 g/dl
14'91	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,13 µg/g	300 µl	13,5 g/dl
14'87	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,13 µg/g	425 µl	14,2 g/dl
14,15	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,02 µg/g	5 µl **	3,8 g/dl
14,70	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,02 µg/g	205 µl	14,0 g/dl
14'2	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,02 µg/g	0 µl **	0 g/dl
14'28	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,02 µg/g	415 µl	15,7 g/dl
14'27	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,02 µg/g	200 µl	13,9 g/dl
14'86	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,01 µg/g	375 µl	18,0 g/dl
14'73	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,01 µg/g	75 µl	14,5 g/dl
14'77	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,01 µg/g	75 µl	15,7 g/dl
14'74	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,01 µg/g	16 µl **	5,8 g/dl
14'88	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,01 µg/g	205 µl	11,3 g/dl
14'67	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,002 µg/g	425 µl	15,3 g/dl
14'68	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,002 µg/g	175 µl	13,6 g/dl
14'19	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,002 µg/g	0 µl **	0 g/dl
14'10	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,002 µg/g	75 µl	14,0 g/dl
14'80	Hemofílico	30 min.	Factor IXa	0,002 µg/g	160 µl	13,8 g/dl
13'70	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,15FECU/g	35 µl **	9,3 g/dl
14'30	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,15FECU/g	370 µl	15,8 g/dl
12'78	Hemofílico	15 min.	Autoplex	0,15FECU/g	500 µl	No medido
14'98	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,15FECU/g	300 µl	15,4 g/dl
12'83	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,15FECU/g	195 µl	12,3 g/dl
13'3	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,075FECU/g	250 µl	19,0 g/dl
13'6	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,075FECU/g	30 µl **	11,9 g/dl
13'21	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,075FECU/g	400 µl	18,4 g/dl

Ratón #	Genotipo	Tiempo	Producto	Conc.	Pérdida Sangre	Hemoglob.
13'53	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,075FECU/g	400 µl	18,7 g/dl
13'28	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,075FECU/g	80 µl	15,4 g/dl
14'71	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,01 FECU/g	225 µl	13,2 g/dl
14'78	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,01 FECU/g	375 µl	16,5 g/dl
14'82	Hemofílico	15 min.	Autoplex	0,01 FECU/g	300 µl	16,8 g/dl
14'79	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,01 FECU/g	60 µl **	14,3 g/dl
14'90	Hemofílico	30 min.	Autoplex	0,01 FECU/g	475 µl	16,0 g/dl
13'55	Hemofílico	30 min.	Sol. Salina Heparinizada	N/a	170 µl	17,5 g/dl
14'22	Hemofílico	30 min.	Sol. Salina Heparinizada	N/a	375 µl	14,0 g/dl
14'23	Hemofílico	30 min.	Sol. Salina Heparinizada	N/a	185 µl	13,9 g/dl
14'24	Hemofílico	30 min.	Sol. Salina Heparinizada	N/a	280 µl	15,1 g/dl
14'25	Hemofílico	30 min.	Sol. Salina Heparinizada	N/a	125 µl	14,2 g/dl
*El ratón se cauterizó pronto debido a una hemorragia excesiva						
**El volumen se encuentra debajo del rango más bajo de pérdida de sangre para los animales deficientes en <i>fviii-l</i> .						

A diferencia de los ratones hemofílicos de la Tabla 3, cuando se realiza un sangrado de la vena lateral de la cola en ratones de tipo salvaje como se muestra en la Tabla 4, éstos son capaces de formar un coágulo, tal como lo indica el bajo volumen de sangre recogida (de 0 a 80 µl).

- 5 El Factor IXa en tres de las dosificaciones más bajas fue capaz de corregir el fenotipo hemorrágico de los ratones específicos con *fviii-l*. En cuatro de entre 15 ratones con estas tres dosis, la cantidad de sangre perdida fue inferior al rango más bajo de 65 µl, siendo coherente con la cantidad de sangre perdida medida en animales de tipo salvaje (de 0 a 80 µl). Estos casos proporcionan la clara evidencia de que la hemorragia ha sido interrumpida eficazmente por la preparación de Factor IXa. De forma similar, para tres de entre 15 ratones, el Autoplex-T fue capaz de restaurar la hemostasis a los niveles de tipo salvaje. Los científicos que realizaron los estudios observaron también que se había formado un tapón hemostático parcial en aquellos ratones tratados con Autoplex y Factor IXa que no mostraron evidencia de hemostasis con el ensayo de pérdida de sangre. Consecuentemente, estos resultados indican que el Factor IXa tiene una eficacia *in vivo* similar al producto comercial Autoplex-T.

- 15 Es interesante comprobar que en dos de entre las dosis más altas de Factor IXa y la máxima dosis de Autoplex-T parece que la hemorragia aumentó, lo que es coherente con estos agentes que provocan una Coagulación Intravascular Diseminada (CID). No es sorprendente, ya que la CID es una complicación bien conocida a dosis más altas de terapias de emulación.

- 20 Estos resultados proporcionan la clara evidencia de que el Factor IXa posee eficacia biológica en el tratamiento de trastornos hemorrágicos: redujo la hemorragia a los niveles de tipo salvaje en ratones específicos y su espectro de eficacia era comparable con la actual terapia de emulación con el Autoplex-T comercial. El Factor IXa es activo terapéuticamente entre 0,002 µg y 0,02 µg por g de peso corporal de ratones tratados. En base a estos resultados, el Factor IXa se puede dosificar en pacientes entre 2 y 20 mg por kg de peso corporal.

Dada la presente descripción, un especialista en la técnica pensará naturalmente en realizaciones adicionales de la invención, no pretendiendo limitar el alcance la misma las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

- 5 1.Utilización de Factor IXa en la fabricación de una primera preparación farmacéutica para tratar a un sujeto con una patología hemorrágica, caracterizada porque la primera preparación farmacéutica contiene al menos un 10% de Factor IXa (mg/mg de proteína total) y no contiene Factor VIII y no se debe administrar de forma simultánea, simultánea por separado o secuencialmente en el mismo régimen de tratamiento con una segunda preparación que comprende Factor VIII.
- 10 2.Primer preparación farmacéutica que contiene al menos un 10% de Factor IXa (mg/mg de proteína total) para su utilización en el tratamiento de un sujeto con patología hemorrágica, caracterizada porque la primera preparación farmacéutica no contiene Factor VIII y no se debe administrar de forma simultánea, simultánea por separado o secuencialmente en el mismo régimen de tratamiento con una segunda preparación que comprende Factor VIII.
- 15 3.Utilización según la reivindicación 1 de la primera preparación farmacéutica para su empleo según la reivindicación 2, caracterizada porque dicha primera preparación farmacéutica está exenta esencialmente de actividad de activador de la precalicreína.
- 4.Utilización según la reivindicación 1 de la primera preparación farmacéutica para su empleo según la reivindicación 2, caracterizada porque el Factor IXa se produce mediante activación proteolítica del Factor IX producido de forma recombinante.
- 5.Utilización según la reivindicación 1, 3 ó 4 de la primera preparación farmacéutica para su empleo según la reivindicación 2, 3 ó 4, caracterizada porque dicha patología hemorrágica es causada por la presencia de inhibidores del FVIII en la sangre del sujeto.
- 20 6.Utilización según la reivindicación 1, 3 ó 4 de la primera preparación farmacéutica para su empleo según la reivindicación 2, 3 ó 4, caracterizada porque dicha patología hemorrágica es causada por la ausencia de actividad endógena del FVIII en la sangre del sujeto.
- 7.Utilización según la reivindicación 1, 3 ó 4 de la primera preparación farmacéutica para su empleo según la reivindicación 2, 3 ó 4, caracterizada porque dicha patología hemorrágica es causada por la ausencia de actividad endógena del FIX en la sangre del sujeto.
- 25 8.Método para elaborar una preparación farmacéutica que contiene Factor IXa y que está exenta esencialmente de actividad de precalicreína, comprendiendo dicho método:
- a) disolución de una pasta de la fracción IV-1 de Cohn;
  - b) adsorción de los factores de coagulación contenidos en dicha fracción IV-1 de Cohn sobre fosfato de calcio;
  - c) elución de dichos factores de coagulación de dicho fosfato de calcio para formar un primer eluato;
  - 30 d) aplicación de dicho primer eluato a una resina de intercambio iónico, adsorbiendo así el Factor IXa en dicha resina y permitiendo que las impurezas que tienen actividad de precalicreína entren en una fracción de desecho; y
  - e) elución y recogida de dicho Factor IXa de dicha resina.

Figura 1

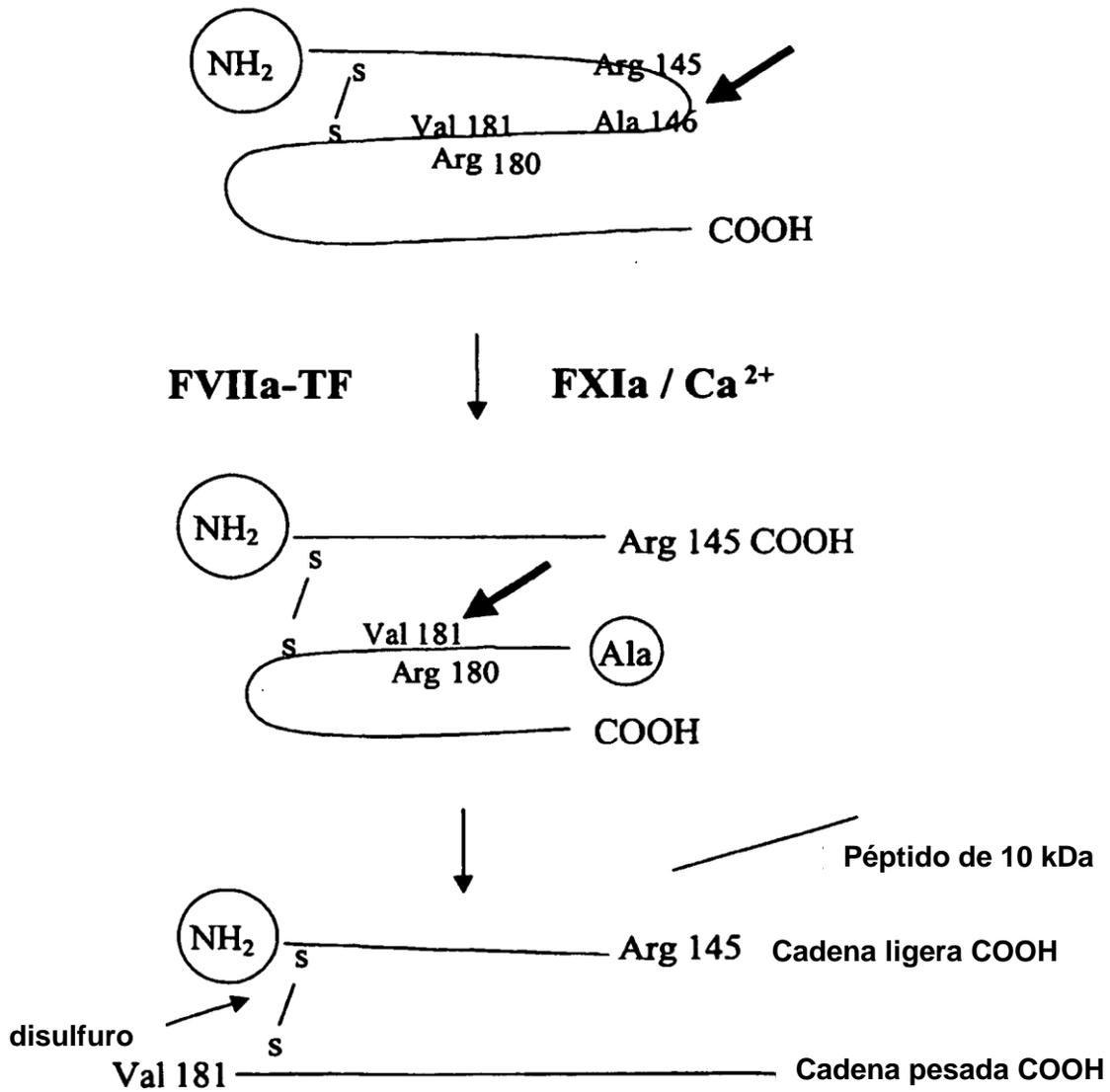


Figura 2

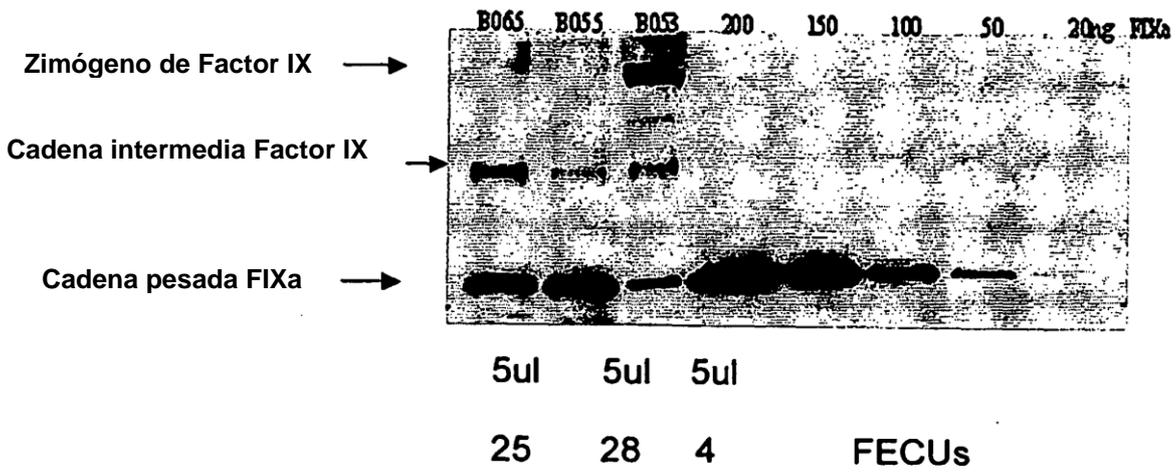


Figura 3

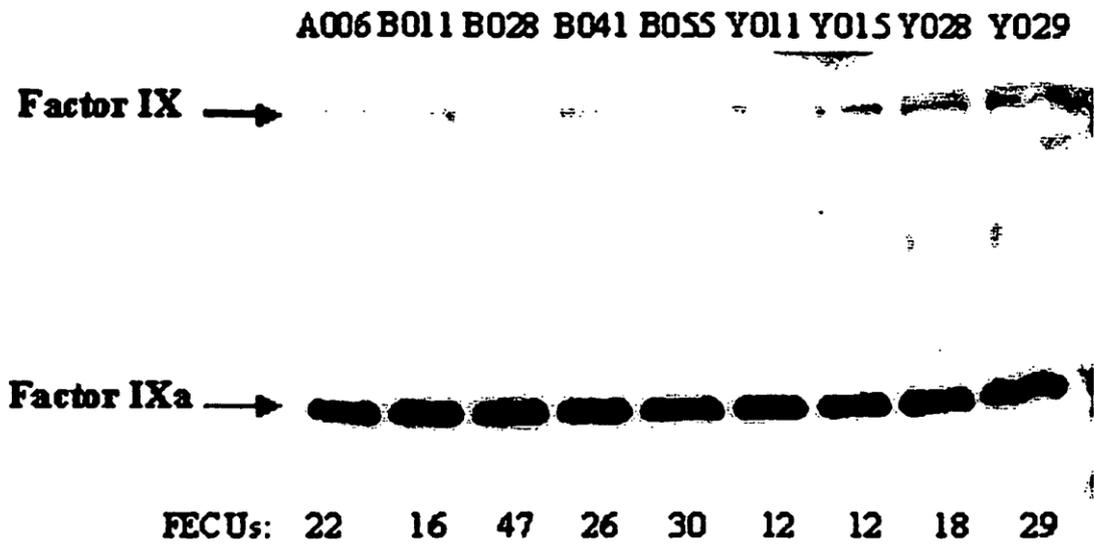




Figura 4A

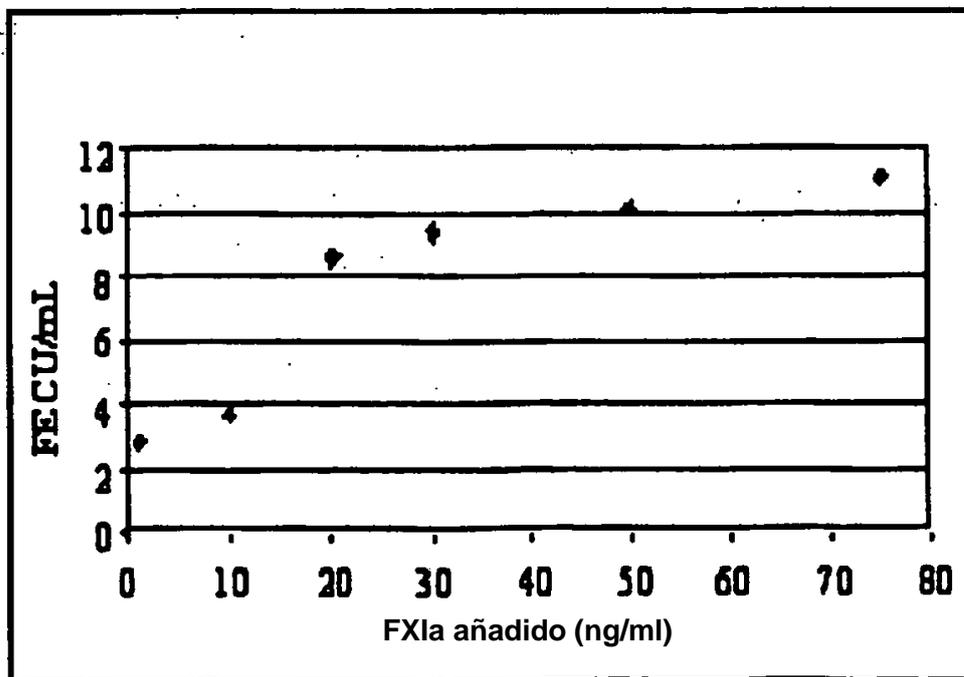


Figura 4B

**Preparaciones con Autoplex**



**Cromatografía con Q-sefarosa**

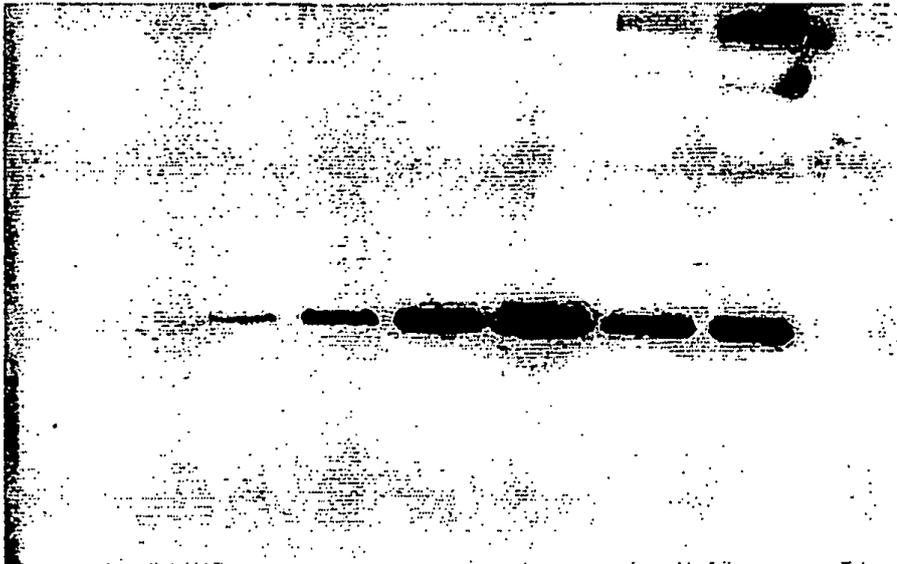


**Elución con sal**

**Pool eluato que contiene el Factor IXa**

**Figura 5A**

**FIXa 25 50 100 200 500ng Q A**



**Q: Pool eluato con Q-sefarosa**

**A: Autoplex (25 unidades FECU por ml)**

**Figura 5B**