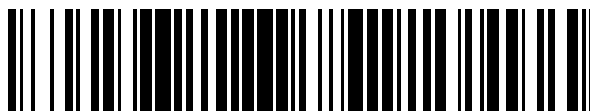


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 118**

51 Int. Cl.:
A61K 31/5377 (2006.01)
C07C 257/00 (2006.01)
C07D 207/04 (2006.01)
C07D 211/60 (2006.01)
C07D 223/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04022378 .6**
96 Fecha de presentación: **21.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1637141**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2006**

54 Título: **Composición de proteasa estabilizada que comprende una serina proteasa, derivados de morfolino e inhibidores inversos de dicha serina proteasa**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.03.2012

73 Titular/es:
TROBIO AB
SICKLA ALLÉ 55
SE-131 65 NACKA, SE

72 Inventor/es:
Andersson, Lars-Olov y
Ageland, Hans

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 377 118 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de proteasa estabilizada que comprende una serina proteasa, derivados de morfolino e inhibidores inversos de dicha serina proteasa

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una composición enzimática en la que la enzima se estabiliza mediante ciertos aditivos en una combinación de la invención. Más particularmente, la invención atañe a una composición de serina proteasa que comprende un inhibidor reversible de la serina proteasa y un compuesto estabilizante adicional M como se define más adelante.

Antecedentes

- 10 Las serina proteasas son un grupo de enzimas proteolíticas que se caracterizan por tener un residuo de serina y de histidina en su sitio activo. Muchas enzimas bien conocidas pertenecen a este grupo, por ejemplo tripsina, calicreína, trombina y plasmina. Varias de ellas tienen utilidad práctica, La tripsina se usa en la industria del cuero. La trombina se usa como agente hemostático para detener las hemorragias por heridas. La uroquinasa y el activador del plasminógeno tisular, otras dos serina proteasas, se usan clínicamente como agentes trombolíticos en el tratamiento del infarto de miocardio agudo. Algunas de estas enzimas se han usado ampliamente como herramientas de investigación en, por ejemplo, la determinación de la estructura proteica. Además, las enzimas se usan en varios kit diagnósticos.

- 20 Común a la mayoría de las serina proteasas es su limitada estabilidad en solución. Esto se debe principalmente a la autodegradación cuando se queda en solución, debido a su propiedad como proteasas. Esta limitada estabilidad es un problema cuando el material se tiene que almacenar en solución. Las preparaciones comerciales de serina proteasa disponibles actualmente están esencialmente, siempre, en forma de soluciones congeladas o polvos liofilizados, con los inconvenientes obvios. El tiempo adicional necesario para la disolución del polvo o la descongelación de la solución congelada a la temperatura correcta es el aspecto más importante. No obstante, con estas preparaciones existen otros problemas. Para las soluciones congeladas, existe la necesidad de temperaturas controladas (-20 °C) en todas las etapas desde la fabricación, el transporte y el almacenamiento hasta el almacenamiento de nuevo en el "kit de emergencia". Para los polvos liofilizados, existe la necesidad de una solución de reconstitución con un grado aceptable de pureza y estabilidad. Asimismo, el material con frecuencia tiene que prepararse en condiciones de asepsia (mezclando las dos partes) en un ambiente que puede ser no controlado (tal como clima inclemente o ausencia de un suministro de agua limpia) y existe la necesidad de verificar que los polvos se han mezclado adecuadamente. Estos son inconvenientes importantes de los productos disponibles hoy en día, añadiendo a su complejidad de uso sus costes.

- 35 Para la trombina, que, preferentemente, tiene que estar disponible inmediatamente para usar detener la hemorragia, los problemas de estabilidad han forzado a los fabricantes a usar trombina liofilizada o soluciones en congelación profunda. Por tanto, requieren cierta cantidad de tiempo para preparar el uso. Los dos agentes trombolíticos uroquinasa y activador del plasminógeno tisular se venden en forma de preparaciones liofilizadas que se tienen que disolver antes de usar. Dado que el tratamiento trombolítico del infarto de miocardio agudo tiene que iniciarse lo antes posible tras el inicio del infarto, cualquier retraso de tiempo causado por dicha preparación supone un problema.

- 40 Se han realizado muchos esfuerzos para encontrara modos de estabilizar las diversas serina proteasas. Para la tripsina, que se degrada bastante rápido, un agente simple y estabilizante eficiente es el ion calcio (Sipos T y Merkel J, Biochemistry 9:2766 (1970)). La disminución del pH a menos de 4 también es un procedimiento que funciona con algunas de las enzimas, como la tripsina y la plasmina, pero no es viable con la trombina, ya que ésta se inactiva de forma irreversible a un pH inferior a 5. Se pueden usar inhibidores reversibles de la proteasa, pero son menos frecuentes, ya que interfieren de un modo perjudicial en la acción de la enzima con son usados (véase más adelante).

Para la estabilización del activador del plasminógeno tisular (tPA), normalmente se usa la adición del aminoácido arginina. El material de tPA en uso clínico hoy en día contiene arginina como estabilizante.

- 50 Asimismo, se han dedicado muchos esfuerzos a encontrar modos de estabilizar las soluciones de trombina. Como ejemplos de aditivos estabilizantes se pueden mencionar las propuestas siguientes: ácidos carboxílicos a concentraciones altas, EDTA, varios aminoácidos, albúmina, polímeros como polietilenglicol, polivinilpirrolidona y alcohol polivinílico, glicerol, varias sales inorgánicas, hidratos de carbono, gelatina, colágeno.

La solicitud de patente de EE.UU. 2001/0033837 describe una preparación de trombina que contiene un inhibidor del enlace no covalente como estabilizante. Además, el inhibidor se combina con otros aditivos estabilizantes, como azúcares o ácidos carboxílicos, que previamente se han descrito en patentes u otras publicaciones.

- 55 El documento JP 2000300250 describe la estabilización de las soluciones de trombina mediante la adición de alcohol polivinílico, gelatina o polivinilpirrolidona en diferentes soluciones tampón.

En el documento GB 1354761, las proteasas y las amilasas se estabilizan en diversos grados mediante una serie de sustancias, tales como alcoholes alifáticos, ácidos carboxílicos, compuestos heterocíclicos que contienen grupos hidroxilo y aminas alifáticas o alicíclicas.

5 Por tanto, se ha descrito la estabilización de una serina proteasa usando inhibidores (documento US 2001/0033837, ant.). El problema con este enfoque es que el inhibidor disminuye totalmente el efecto de la enzima, si no se ha eliminado antes de usar la preparación. Si se usa un inhibidor potente, se pierde la mayoría de la actividad enzimática. Un enfoque mejor es usar un inhibidor reversible de la fuerza intermedia. No obstante, incluso en este caso, se perderá una parte considerable de la actividad enzimática inicial, dado que la concentración del inhibidor aumenta con el fin de obtener un buen efecto de estabilización.

10 La solicitud de patente japonesa JP2004191367 describe un reactivo de ensayo que contiene trombina estabilizada para analizar la capacidad de coagulación de la sangre. El reactivo de ensayo contiene trombina y un inhibidor de la trombina, y también puede comprender uno o más compuestos estabilizantes de la trombina seleccionados de ion calcio, un ácido orgánico, un tensioactivo y un proteína.

15 Los documentos WO 02/100830, WO 02/22575, WO 00/20394, WO 99/11658, WO 02/37937 y US 5,409,927 describen todos ellos diferentes compuestos inhibidores de la serina proteasa y su uso en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como la trombosis, en las que está indicada la inhibición de las correspondientes serina proteasas.

Divulgación de la invención

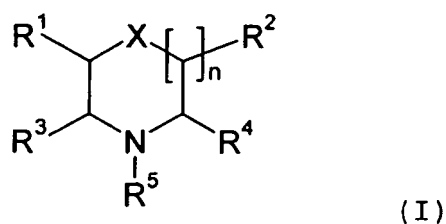
20 Por tanto, es un objeto de la presente invención conseguir una composición de serina proteasa que sea estable en solución y conserve un grado de actividad enzimática que sea suficiente para el uso práctico de la composición.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición de serina proteasa que pueda usarse directamente sin etapas de preparación previas de material en congelación profunda o liofilizado.

Es otro objeto de la presente invención permitir un uso práctico de inhibidores reversibles de serina proteasas con fines de estabilización, mediante la condición de de un componente estabilizante adicional.

25 Estos y otros objetos evidentes a partir del presente texto se consiguen mediante los diferentes aspectos de la presente invención, según se reivindican.

Por lo tanto, un aspecto de la invención proporciona una composición que comprende a) una serina proteasa; b) un inhibidor reversible de dicha serina proteasa; y c) un compuesto M que tiene la fórmula I:



30 en la que
n es 0, 1 ó 2;

X es O, N o CH₂;

R¹-R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan entre H, -CH₂-R⁶, -CH₂-O-R⁶, -CH₂-S-R⁶, -CH₂-NH-R⁶, -CO-O-R⁶, -CO-NH-R⁶, -CH₂-NH-CO-R⁶, -CH₂-O-CO-R⁶, -CH₂-NH-CO-NHR⁶, -CH₂-NH-CO-OR⁶, -CH₂-NH-CS-NHR⁶ y -CH₂-O-CO-NHR⁶;

35 R⁵ es como R¹-R⁴ o P-Q;

P se selecciona entre -(CH₂)_m- y -(CH₂)_m-Y-(CH₂)_m-, en las que m es 1-6 e Y es O, NH o S;

Q se selecciona entre H, -SO₃, -COOH, -NH₂, -OH y -CONH₂;

40 seleccionándose cada R⁶ individualmente entre H, alquilo inferior sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, bencilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir o anillo o anillos heteroaromáticos mono-, bi- o tricíclicos sin sustituir o sustituidos con uno o más heteroátomos y heterociclos no aromáticos, seleccionándose los sustituyentes de los grupos sustituidos entre alquilo inferior, halógenos, arilo sustituido o sin sustituir, compuestos heteroaromáticos sustituidos o sin sustituir, heterociclos no aromáticos, alquiloxi, alquilamino; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 La presente invención deriva de los resultados iniciales de un estudio sobre la estabilidad de la trombina, en el que, sorprendentemente, se descubrió que la combinación de la invención de un inhibidor reversible de la enzima y un compuesto M como se ha definido anteriormente tenían un fuerte efecto de estabilización sobre la enzima en

solución. Tanto el inhibidor de la trombina como el compuesto M solos tenían efectos de estabilización sobre la trombina, pero la combinación fue varias veces mejor que cualquiera de ellos (véase el Ejemplo 1). Por tanto, cuando se combinó una concentración baja del inhibidor de la enzima con morfolina, MOPS o compuestos relacionados, se obtuvo un efecto de estabilización de la enzima muy fuerte. Algunas composiciones analizadas eran estables, como indica una disminución menor del 30 % de la actividad, durante más de 2 meses a 37 °C. De acuerdo con los datos de publicaciones anteriores y confirmado por los presentes inventores, esto correspondería a 6 meses a temperatura ambiente o 2,5 años a temperatura de refrigerador. Los resultados del estudio inicial se ampliaron para incluir experimentos sobre otras serina proteasas y, en estos experimentos, también se observó el sorprendente efecto estabilizante.

Como se pone de ejemplo más adelante, la composición de acuerdo con la invención exhibe una estabilidad considerablemente mejorada en comparación con las composiciones enzimáticas sin la combinación de los ingredientes b) y c) de la invención. Con el enfoque de la invención se puede usar una concentración baja de inhibidor de la serina proteasa y seguir obteniendo un grado satisfactorio de estabilización. Por ejemplo, la concentración del inhibidor puede ser menor de lo sugerido anteriormente, por ejemplo en el documento US 2001/0033837. Con una concentración tan baja del inhibidor, en la solución enzimática estabilizada se retiene mucha más actividad enzimática.

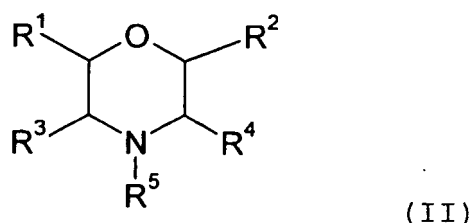
En una realización de la invención, la serina proteasa en la composición se selecciona del grupo que consiste en tripsina, calicreína, trombina, plasmina, uroquinasa, activador del plasminógeno tisular, forma activa del factor IX, forma activa del factor X forma activa del factor XI. En una realización más específica, la serina proteasa es trombina. En otra realización específica, la serina proteasa es plasmina. En otra realización específica más, la serina proteasa es tripsina.

Los expertos en la técnica conocen los inhibidores reversibles de las serina proteasas y cuál es el óptimo para usar variará en función de qué serina proteasa específica se use. En general, es importante para el efecto previsto que el inhibidor no tenga una fuerza grande. En otras palabras, el efecto inhibidor tiene que ser lo suficientemente moderado como para que la actividad enzimática siga siendo útilmente elevada. Como guía, se ha descubierto que los inhibidores que tienen una K_i entre 0,1 mM y 2 mM son adecuados para usar en la composición de acuerdo con la invención, siendo un intervalo preferido de 0,04 nM a 0,5 nM.

En una realización, en la que la serina proteasa es trombina, el inhibidor reversible puede seleccionarse entre N-(2'-fenoxi)-4-aminopiridina y derivados de la misma, benzamidina, N,N-dietiletilendiamina, aminobenzamidina, amidinopiridina y terc-butilamidina. En otra realización, en la que la serina proteasas es plasmina, el inhibidor reversible se selecciona entre N,N-dietil-etilendiamina, aminobenzamidina y benzamidina. En otra realización, en la que la serina proteasa es tripsina, el inhibidor reversible se selecciona entre aminobenzamidina y benzamidina. Estas combinaciones de enzimas e inhibidores son ejemplos ilustrativos, y no deben interpretarse como limitantes.

La composición de acuerdo con la invención comprende un compuesto M con la fórmula general I dada anteriormente.

En realizaciones de la invención, el compuesto M es un compuesto de fórmula II:



en la que

R^1 - R^4 son iguales o diferentes y se seleccionan entre H, $-\text{CH}_2\text{-R}^6$;

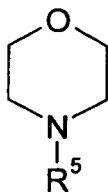
R^5 es como R^1 - R^4 o P-Q;

P se selecciona entre $-(\text{CH}_2)_m-$ y $-(\text{CH}_2)_m\text{-Y-(CH}_2)_m-$, en las que m es 1-6 e Y es O, NH o S;

Q se selecciona entre H, $-\text{SO}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ y $-\text{CONH}_2$;

seleccionándose cada R^6 individualmente entre H, alquilo inferior sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, bencilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir o anillo o anillos heteroaromáticos mono-, bi- o tricíclicos sin sustituir o sustituidos con uno o más heteroátomos y heterociclos no aromáticos, seleccionándose los sustituyentes de los grupos sustituidos entre alquilo inferior, halógenos, arilo sustituido o sin sustituir, compuestos heteroaromáticos sustituidos o sin sustituir, heterociclos no aromáticos, alquiloxi, alquilamino; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el compuesto M es un compuesto de fórmula III:



(III)

en la que

R⁵ es -CH₂-R⁶ o P-Q;

P se selecciona entre -(CH₂)_m- o -(CH₂)_m-Y-(CH₂)_m-, en las que m es 1-6 e Y es O, NH o S;

- 5 Q se selecciona entre H, -SO₃, -COOH, -NH₂, -OH y -CONH₂,
seleccionándose cada R⁶ individualmente entre alquilo inferior sustituido o sin sustituir, sustituido o cicloalquilo sin
sustituir, bencilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, seleccionándose los sustituyentes de los
grupos sustituidos entre alquilo inferior, halógenos, arilo sustituido o sin sustituir, compuestos heteroaromáticos
10 sustituidos o sin sustituir, heterociclos no aromáticos, alquiloxi, alquilamino; o una sal farmacéuticamente aceptable
del mismo.

En algunas realizaciones de la invención, el compuesto M se selecciona entre el grupo que consiste en morfolina,
ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido morfolino butil sulfónico, ácido morfolino propil carboxílico,
morfolino etilo alcohol y ácido morfolino etil sulfónico. Por lo tanto, son ejemplos de compuestos M para su uso en
las composiciones de este aspecto de la invención, morfolina y ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS).

- 15 Una composición de acuerdo con la invención que muestra el efecto de estabilización es una en la que la serina
proteasa es trombina, el inhibidor reversible es N-(2'-fenoxi)-4-aminopiridina y el compuesto M es morfolina.

Otra composición de acuerdo con la invención que muestra el efecto de estabilización es una en la que la serina
proteasa es trombina, el inhibidor reversible es aminobenzamidina y el compuesto M es morfolina.

- 20 Otra composición de acuerdo con la invención que muestra el efecto de estabilización es una en la que la serina
proteasa es plasmina, el inhibidor reversible es N,N-dietiletilendiamina y el compuesto M es morfolina.

Otra composición de acuerdo con la invención que muestra el efecto de estabilización es una en la que la serina
proteasa es plasmina, el inhibidor reversible es aminobenzamidina y el compuesto M es morfolina.

- 25 En las composiciones de serina proteasa para administración tópica, por ejemplo en el lugar de la herida, se ha
producido el problema de que la composición puede fluir fácilmente o se la puede eliminar del lugar en el que se
aplica. Con el fin de resolver este problema, es posible añadir a la composición enzimática un polímero adhesivo
que, después, sirve para el fin de hacer la composición más viscosa y adherente a la piel o en lugares de heridas.
Como realización de la presente invención, tal adición de un polímero adhesivo a la composición de la invención
puede tener un efecto beneficioso adicional e inesperado sobre su estabilidad. La adición de un polímero sirve para
30 el doble fin de incrementar la viscosidad y la capacidad de adherencia de la composición, al tiempo que ayuda a la
estabilización de la enzima todavía más.

- 35 En algunas realizaciones de la invención, la composición comprende además un polímero viscoso y adhesivo
seleccionado de polisacáridos y gelatina. Por tanto, el polímero puede ser, por ejemplo, un polisacárido, tal como
uno seleccionado de almidón, sus derivados, celulosa, sus derivados, y mezclas de los mismos. Ejemplos
específicos no limitantes de almidones útiles como aditivos a la composición de acuerdo con la invención incluyen
almidón de maíz y almidón de patata mezclas de los mismos, mientras que ejemplos no limitantes de derivados de
celulosa útiles son carboximetilcelulosa y etilhidroxietilcelulosa y mezclas de los mismos. No obstante, también se
prevé que el polímero sea gelatina, tal como gelatina de un pez de agua fría.

De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención proporciona el uso de una composición tal como se
ha descrito anteriormente como medicamento.

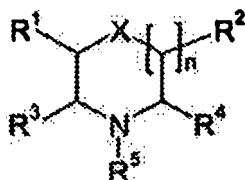
- 40 Otro aspecto de la invención atañe al uso de dicha composición, en la que la serina proteasa es trombina, para la
preparación de un medicamento para establecer hemostasia en un sujeto que sufre una hemorragia. También se
describe un procedimiento para establecer hemostasia en un sujeto que sufre una hemorragia, que comprende
aplicar una composición de acuerdo con la invención, composición en la que la serina proteasa es trombina, en el
lugar de la hemorragia en una cantidad suficiente para disminuir o detener dicha hemorragia.

- 45 En relación con dicho uso o procedimiento que usa una composición de trombina de acuerdo con la invención como
medicamento, la estabilidad de la composición de la invención ofrece beneficios en las circunstancias en las que se
usa. A menudo, las composiciones de trombina se usan en el contexto de situaciones de emergencia, en las que es
crucial que los sujetos dejen de sangrar. En estas mismas situaciones, es difícil el uso de preparaciones
hemostáticas de trombina convencionales, ya que a menudo requieren etapas de descongelación (si están

congeladas) y/o disolución (si están liofilizadas) complicadas y que requieren tiempo. La presente invención permite la producción de, por ejemplo, dichos agentes hemostáticos en forma de soluciones, cuya estabilidad es tal que pueden almacenarse con facilidad durante amplios periodos de tiempo, por ejemplo en una ambulancia o un helicóptero de urgencias, hasta que sean necesarias en el lugar de un accidente o similar. En ese momento se pueden usar como tales, sin ningún retraso por preparación.

Otro aspecto de la invención explota las propiedades conocidas de la plasmina, la uroquinasa o el tPA como agentes trombolíticos. Por tanto, la invención proporciona el uso de una composición como se ha descrito anteriormente, en la que la serina proteasa se selecciona de plasmina, uroquinasa o activador del plasminógeno tisular, para la preparación de un medicamento para tratamiento trombolítico. También se describe un procedimiento para tratamiento trombolítico en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una composición como se ha descrito anteriormente, en cuya composición la serina proteasa se selecciona de plasmina, uroquinasa y activador del plasminógeno tisular, al sujeto en una cantidad suficiente para dicho tratamiento. El tratamiento trombolítico en cuestión puede realizarse, como ejemplos, no limitantes, para tratar un infarto de miocardio o para tratar ictus.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la estabilización de una serina proteasa, que comprende mezclar la serina proteasa con a) un inhibidor reversible de dicha serina proteasa; y b) un compuesto M de fórmula I:



(I)

en la que

n es 0, 1 ó 2;

X es O, N o CH₂;

R¹-R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan entre H, -CH₂-R⁶, -CH₂-O-R⁶, -CH₂-S-R⁶, -CH₂-NH-R⁶, -CO-O-R⁶, -CO-NH-R⁶, -CH₂-NH-CO-R⁶, -CH₂-O-CO-R⁶, -CH₂-NH-CO-NHR⁶, -CH₂-NH-CO-OR⁶, -CH₂-NH-CS-NHR⁶ y -CH₂-O-CO-NHR⁶;

R⁵ es como R¹-R⁴ o P-Q;

P se selecciona entre -(CH₂)_m- y -(CH₂)_m-Y-(CH₂)_m-, en las que m es 1-6 e Y es O, NH o S;

Q se selecciona entre H, -SO₃, -COOH, -NH₂, -OH y -CONH₂;

seleccionándose cada R⁶ individualmente entre H, alquilo inferior sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, bencilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir o anillo o anillos heteroaromáticos mono-, bi- o tricíclicos sin sustituir o sustituidos con uno o más heteroátomos y heterociclos no aromáticos, seleccionándose los sustituyentes de los grupos sustituidos entre alquilo inferior, halógenos, arilo sustituido o sin sustituir, compuestos heteroaromáticos sustituidos o sin sustituir, heterociclos no aromáticos, alquiloxi, alquilamino; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En este procedimiento de la invención para la estabilización de una composición de serina proteasa, las elecciones de los componentes particulares que pueden usarse y sustituyentes para los compuestos M son como se han descrito anteriormente en relación al aspecto de composición de de la invención.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de la composición como se ha descrito anteriormente para la adsorción sobre un objeto sólido, con el fin de que este objeto sólido pueda proporcionar la actividad enzimática en cuestión. En particular, es de interés en muchas aplicaciones quirúrgicas para entrar y, en particular, para salir de las arterias infligiendo el menor daño por hemorragia posible. Con el fin de detener la hemorragia de una arteria, anteriormente se ha sugerido el uso de una forma de "tapón arterial" (estos objetos también se conocen como dispositivos de sellado vascular, dispositivos de cierre del acceso femoral (cuando la arteria femoral se usa como entrada, por ejemplo en una angiografía), dispositivos de hemostasis vascular y dispositivos de cierre de punción), hechos, por ejemplo, de colágeno u otro material biodegradable. De acuerdo con el presente aspecto de la invención, dicho tapón puede estar recubierto de forma ventajosa con una composición de acuerdo con la invención, en la que la serina proteasa es trombina. Dicho tapón consigue un sellado más rápido de la abertura de la arteria, en cuando a que la trombina de la composición ayuda en la coagulación sanguínea alrededor del tapón. Por tanto, la invención proporciona, en este aspecto, un dispositivo de hemostasia vascular que tiene una cantidad de la composición de acuerdo con la invención, en la que la serina proteasa es trombina, adsorbida sobre el mismo. El dispositivo de hemostasia vascular está hecho, preferentemente, de un material sólido o semisólido biodegradable, tal como colágeno, quitosano u otro polímero biológico.

Generalmente se prefiere, para la realización de todas las ventajas de los diferentes aspectos de la invención, que la composición de acuerdo con la invención esté en una forma seleccionada de una solución y un gel. A este respecto,

son más preferidas las soluciones acuosas y los genes acuosos.

Definiciones

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "alquilo inferior" se refiere a un radical hidrocarbilo sin ramificar o ramificado, cíclico, saturado o insaturado (alqueno o alquino) que puede estar sustituido o sin sustituir. Cuando es cíclico, el grupo alquilo es preferentemente C3-C12, más preferentemente C5-C10, lo más preferido C5-C7. Cuando es acíclico, el grupo alquilo es preferentemente C1- C10, más preferentemente C1-C6, más preferentemente metilo, etilo, propilo (n-propilo, isopropilo), butilo (ramificado o no ramificado) o pentilo, lo más preferido metilo.

10 Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un grupo aromático, tal como fenilo o naftilo, o un grupo heteroaromático mono-, bi- o tricíclico que contiene uno o más heteroátomos seleccionados preferentemente entre N, O y S, tales como piridilo, pirrolilo, quinolinilo, furanilo, tienilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, tiazolilo, oxazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, imidazolilo, pirimidinilo, indolilo, pirazinilo, indazolilo, pirimidinilo, tiofenotilo, piranilo, carbazolilo, acridinilo, quinolinilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, purinilo, cinolinilo, pteridinilo.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo funcional" significa, en caso de estar sin proteger: hidroxilo-, tiolo-, función amino, ácido carboxílico, y en caso de estar protegido: alcoxi inferior, N-, O-, S- acetilo, éster del ácido carboxílico.

20 Como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a un grupo aromático que contiene uno o más heteroátomos seleccionados preferentemente entre N, O y S, tales como piridilo, pirrolilo, quinolinilo, furanilo, tienilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, tiazolilo, oxazolilo, pirazolilo, triazolilo, imidazolilo, pirimidinilo, indolilo, pirazinilo o indazolilo.

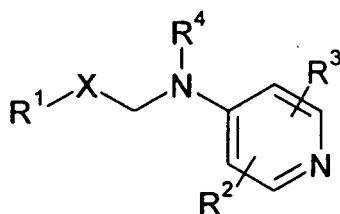
25 Como se usa en el presente documento, la expresión "heterociclo no aromático" se refiere a un grupo cíclico no aromático que contiene uno o más heteroátomos seleccionados preferentemente entre N, O y S, tales como un grupo amino cíclico, tal como pirrolidinilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo, o un éster cíclico, tal como tetrahydrofuranoilo, monosacárido.

Como se usa en el presente documento, el término "halógeno" significa flúor, cloro, bromo o yodo.

Como se usa en el presente documento, el término "sustituido" significa que, los grupos afectados están sustituidos con un grupo funcional, tal como hidroxilo, amina, sulfuro, sililo, ácido carboxílico, halógeno, arilo, etc.

30 Los ejemplos de sales de adición farmacéuticamente aceptables para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen las obtenidas a partir de ácidos minerales, tales como ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y ácidos orgánicos, tales como ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico y arilsulfónico. Los excipientes farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, transportadores o diluyentes, son bien conocidos para los expertos en la materia y están fácilmente disponibles para el público. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser uno que sea inerte químicamente para los compuestos activos y que no tenga efectos secundarios dañinos o toxicidad en las condiciones de uso. Pueden encontrarse formulaciones farmacéuticas, por ejemplo en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Mack Printing Company, Easton, Pennsylvania (1995).

40 Como se detalla en la descripción de la invención de la invención, una posible elección del inhibidor para su uso en la composición y procedimientos de acuerdo con la invención es "N-(2'-fenoxi)-4-aminopiridina y derivados de la misma". Por ésta se entiende un compuesto que tiene la fórmula IV:



en la que

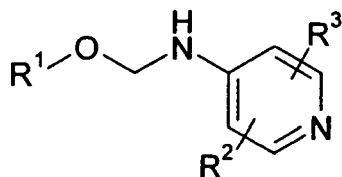
45 R¹ se selecciona entre H, alquilo-C1-C6, cicloalquilo-C3-C7, fenilo, bencilo acetilo y benzoilo;

X se selecciona entre oxígeno, nitrógeno y azufre;

cada R² y R³ se selecciona individualmente entre H, halógeno, hidroxilo, alquilo-C1-C6, cicloalquilo-C3-C7, alquilo-C1-C6; y

R⁴ se selecciona entre H, alquilo-C1-C6, arilalquilo y acilo.

Dichos inhibidores preferidos tienen la fórmula V:



(V)

en la que

- 5 R¹ se selecciona entre alquilo-C1-C6, cicloalquilo-C3-C7, fenilo y bencilo;
 cada R² y R³ se selecciona individualmente entre H, halógeno, hidroxilo, alquilo-C1-C6, cicloalquilo-C3-C7- y alquilo-C1-C6.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben interpretarse como limitantes.

- 10 En la descripción de experimentos siguientes realizados de acuerdo con la presente invención, el tiempo que tarda en alcanzar el 70 % de la actividad inicial se usa como valor numérico para la estabilidad de una solución enzimática. Este valor, denominado "T 70%", se escoge porque corresponde a lo que podría aceptarse como una pérdida máxima permitida de actividad durante un ciclo de vida de un producto comercial.
- 15 En los estudios experimentales se ha usado una temperatura alta (37 °C), así como una concentración alta de enzima. Esto se ha realizado con el fin de obtener datos de estabilidad en tiempos razonablemente cortos y no hay que esperar meses o años. Se ha estudiado la dependencia de la estabilidad de la temperatura y los resultados se facilitan en el Ejemplo 1. En este estudio se demostró que el proceso de inactivación es aproximadamente 3 veces más lento a temperatura ambiente y aproximadamente 20 veces más lento a la temperatura de refrigerador, que el proceso que se mide en realidad (a 37 °C).
- 20 Además, el proceso de inactivación depende de la concentración y es más rápido a concentraciones más altas de la enzima. La concentración de trombina usada en el Ejemplo 1 fue 1 mg/ml (o 3.300 unidades/ml), es decir superior a 0,1-0,3 mg/ml usada en las presentes preparaciones y/o dispositivos comercialmente disponibles. En los estudios de la dependencia de la concentración se ha demostrado que el proceso de inactivación es 3-4 veces más lento a dichas concentraciones en comparación a la concentración usada en el Ejemplo 1.
- 25 Tomando esto en conjunto se obtendría un factor de entre 10-12, con el cual multiplicar el valor de T 70 % con el fin de llegar a lo que corresponde a las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente para un producto comercial que contiene una serina proteasa tal como una preparación hemostática que contiene trombina. En la tabla 1, la composición con N-(2'-fenoxi)-4-amino piridina y MOPS tiene un exceso de T 70 % de 90 días. Esto correspondería a un valor, para un producto de 0,1-0,3 mg/ml, de más de 900 días en condiciones de temperatura ambiente, es decir más de dos años. Esto claramente supera cualquier cosa ya alcanzada, con respecto a la estabilización de la trombina en solución.
- 30

Ejemplo 1 – Estabilización de la trombina

Para determinar la actividad coagulante de las soluciones con trombina, se midió el tiempo hasta la coagulación de una solución de fibrinógeno (1,3 mg/ml) tras la adición de varias diluciones de una solución de trombina concreta.

35 Los tiempos de coagulación se midieron usando un coagulómetro Amelungen Kc 1 (Amelungen, Alemania). Para estudiar las estabilidades de las soluciones de trombina con diferentes aditivos, las muestras se incubaron en una cámara termostática a 37 °C. Se extrajeron alícuotas a varios intervalos de tiempo y se midió la actividad de trombina restante en estas alícuotas. A partir de los valores obtenidos se pudieron construir curvas de deterioro de la actividad.

- 40 Las curvas de deterioro de la actividad de 1 mg/ml de soluciones de trombina en HEPES 10 mM, tampón NaCl 0,13M, a pH 7,4, mostraron valores de T 70 % alrededor de 1,6 días a 37 °C. Los correspondientes experimentos a temperatura ambiente (aproximadamente 21 °C) mostraron un valor de T 70 % de 5,4 días, mientras que tras el almacenamiento en refrigerador (aproximadamente a 5 °C), el valor de T 70 % fue de 36 días. Por tanto, como cabría esperar, existe una fuerte dependencia de la temperatura.

- 45 Las soluciones que contienen 1 mg/ml de trombina en HEPES 10 mM y NaCl 0,13M a pH 7,4, con el(los) aditivo(s) estabilizante(s) indicado(s) se introdujeron en la cámara termostática y se determinaron sus curvas de deterioro de la actividad. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Los datos sobre la correspondiente solución de trombina de 1 mg/ml sin aditivos se incluyen para comparación.

Tabla 1	
Estabilización de la trombina	
Aditivo(s) estabilizante(s)	T 70 % (días)
Ninguno	1,6
MOPS 0,20M	7,5
Morfolina 0,20M	8,5
Ácido morfolinobutilsulfónico 0,20M	4,0
Ácido morfolinopropilcarboxílico 0,20M	4,1
Alcohol morfolinoetílico 0,20M	3,8
Ácido morfolinoetilsulfónico 0,20M	3,2
Aminobenzamidina 0,5 mM	20
MOPS 0,20M + aminobenzamidina 0,5 mM	68
N-(2'-fenoxi)-4-aminopiridina 3,1 mM	74
N-(2'-fenoxi)-4-aminopiridina 1,9 mM	35
N-(2'-fenoxi)-4-aminopiridina 1,9 Mm + aminobenzamidina 0,5 Mm	68
MOPS 0,20M + N-(2'-fenoxi)-4-aminopiridina 1,9 mM	>120 ¹
N,N-dietiletilendiamina 0,20M	10
MOPS 0,20M + N,N-dietiletilendiamina 0,20M	22
¹ Continúa el estudio	

Es evidente que todos los compuestos analizados tienen un efecto de estabilización. No obstante, existe un efecto sinérgico de las combinaciones del inhibidor y el compuesto que contiene morfolina de acuerdo con la invención, como ponen de manifiesto los superiores resultados obtenidos con dichas combinaciones. Como ilustra la tabla anterior, la adición de MPOS 0,20M solo da un incremento en la estabilización por un factor de 4,7 y la adición de aminobenzamidina 0,5 mM da un incremento en la estabilización por un factor de 12,5. No obstante, la combinación de la invención estabiliza la composición de trombina mucho mejor, por un factor de 42,5. La combinación de la invención de MOPS y N,N-dietil-etilendiamina también es mejor a la hora de estabilizar la enzima que los componentes individuales. Asimismo, en un estudio en curso, se observa que la combinación de MOPS 0,20M y N-(2'-fenoxi)-4-aminopiridina 1,9 mM confiere un incremento muy alto de la estabilización (actualmente un factor de 75, ya que la composición todavía es estable, no obstante, este número podría ser mayor), mientras que los componentes individuales aumentan la estabilidad por un factor de 4,7 y 22, respectivamente.

Ejemplo 2 – Estabilización de la plasmina

Se analizó la estabilización de las soluciones de plasmina de acuerdo con la invención. La actividad de la plasmina se determinó usando el sustrato peptídico cromogénico Chromozym TH (Pentapharm, Suiza) y la medición de un cambio de absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro. Las soluciones que contienen 100 µg/ml de plasmina en HEPES 10 mM y NaCl 0,13M, a pH 7,4, así como estabilizantes como se indica en la Tabla 2 a continuación, se incubaron a 37 °C y se extrajeron muestras a varios intervalos de tiempo para determinar la actividad. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

20

Tabla 2	
Estabilización de la plasmina	
Aditivo(s) estabilizante(s)	T 70 % (horas)
Ninguno	3
Morfolina 0,20M	12
N,N-dietiletilendiamina 0,20M	8
Benzamidina 1 mM	16
aminobenzamidina 1,3 mM	52
Morfolina 0,20M + N,N-dietiletilendiamina 0,13M	22
Morfolina 0,20M + aminobenzamidina 1,3M	216

A partir de estos resultados, es evidente que se obtiene una estabilización muy fuerte usando la combinación de acuerdo con la invención. Morfolina 0,20M aumenta la estabilidad de la composición de plasmina por un factor de 4, N,N-dietiletilendiamina por un factor de 2,7 y aminobenzamina 1,3 mM por un factor de 17. No obstante, la combinación de morfolina y N,N-dietiletilendiamina aumenta la estabilidad de la composición de plasmina por un factor de 7,3 y la combinación de morfolina y aminobenzamidina aumenta la estabilidad por un factor de 72.

Ejemplo 3 – Estabilización de la tripsina

Se analizó la estabilización de las soluciones de tripsina de acuerdo con la invención. La actividad de la tripsina se determinó usando como sustrato éster de tosilarginiametilico (TAME) y midiendo el cambio de absorbancia a 247 nm en un espectrofotómetro. Las soluciones que contienen 100 µg/ml de tripsina en HEPES 10 mM y NaCl 0,13M, a pH 7,4, así como estabilizantes como se indica en la Tabla 3 a continuación, se incubaron a 37 °C y se extrajeron muestras a varios intervalos de tiempo para determinar la actividad. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3	
Estabilización de la tripsina	
Aditivo(s) estabilizante(s)	T 70 % (horas)
Ninguno	0,6
Morfolina 0,5M	8
Benzamidina 1 mM	43
Morfolina 0,5M + Benzamidina 1 mM	88

De nuevo, el efecto estabilizante es el mayor en la composición de acuerdo con la invención. Por tanto, morfolina 0,5M sola da un incremento en la estabilización por un factor de 13 y la benzamidina 1 mM sola da un incremento en la estabilización por un factor de 72. Por otro lado, la combinación de la invención da un incremento en la estabilización por un factor de 147.

Ejemplo 4 – Estabilización de la trombina con CMC

Los análisis de las soluciones de trombina que contienen entre 1,0 y 2,0 % de carboximetilcelulosa (CMC) para determinar su capacidad de adherencia a la piel humana mostraron que la adición de CMC aumentaba considerablemente tanto la viscosidad como la capacidad de adherencia. No obstante, sorprendentemente, también se ha descubierto que la estabilidad de estas soluciones de trombina aumentaba adicionalmente. Una solución de trombina de 1 mg/ml en aminobenzamidina 0,5 mM, MOPS 0,20M, HEPES 10 mM, NaCl 0,13M siendo 2,0 % con respecto a CMC se incubó a 37 °C y se determinó la curva de deterioro de actividad. El valor de T 70% es, actualmente, más de 150 días en un estudio en curso, en el que la preparación enzimática todavía es estable.

Ejemplo 5 - Estabilización con otros polímeros adhesivos

También se estudiaron otros cuatro polímeros: etilhidroxietilcelulosa (EHEC), almidón de patata, almidón de maíz y gelatina de pez de agua fría. Todos estos cuatro polímeros aumentaron la capacidad de adherencia y la viscosidad de las soluciones de trombina. La compatibilidad y la estabilidad de las soluciones de trombina con los polímeros se estudiaron además mediante incubación a 37 °C de soluciones de trombina de 1 mg/ml en MOPS 0,20M, aminobenzamidina 0,5 mM, HEPES 20 mM, NaCl 0,13M, a pH 7,4, que contienen los diversos polímeros. Las concentraciones de los polímeros usados fueron: EHEC, 0,6%; los dos almidones diferentes, 4,0%; y la gelatina, 12,8%. EHEC era completamente compatible con trombina y se obtuvo el mismo valor de T 70 %, es decir aproximadamente 65 días, que con la correspondiente solución sin EHEC. Las soluciones que contienen almidón tenían valores de T 70 % de 22 y 26 días. La estabilidad de la trombina fue muy buena en gelatina con un valor de T 70 % de más de 90 días, que demuestra un efecto estabilizante adicional de gelatina de pez de agua fría.

Ejemplo 6- Experimentos de hemorragia

La capacidad de las composiciones de la invención para detener hemorragias se analizó en una serie de experimentos con conejos. El modelo escogido fue la realización de incisiones en el hígado, que es un modelo de uso frecuente. El abdomen del conejo se abrió y se dejó expuesto el hígado. Se realizaron cortes estándar de 3 mm de longitud en la superficie del hígado y se aplicó a la herida una cantidad de 0,10 ml de la solución de ensayo usando una jeringuilla. Se midió el tiempo hasta la hemostasia. Con cada solución se realizaron de seis a siete experimentos. Se calculó un valor medio del tiempo de hemorragia tras eliminar los valores más alto y más pequeño de cada serie de experimentos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Composición	Tiempo medio de hemorragia (s)
HEPES 10 mM, NaCl 0,13M, pH 7,4	106
HEPES 10 mM, NaCl 0,13M, pH 7,4 + CMC 1,5%	65
HEPES 10 mM, NaCl 0,13M, pH 7,4 + CMC 1,5% + MOPS 0,20M+ 1000 unidades/ml	31
HEPES 10 mM, NaCl 0,13M, pH 7,4 + aminobenzamidina 2 mM + MOPS 0,20M+ 1000 unidades/ml de trombina	26

Como se pone de manifiesto con estos resultados, la solución de trombina estabilizada de acuerdo con la invención es la más eficaz a la hora de establecer rápidamente hemostasia en un sujeto que sangra.

Ejemplo 7 – Compatibilidad con materiales porosos

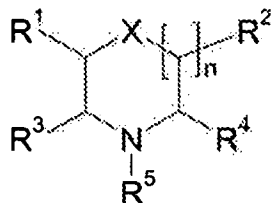
Una solución que contiene trombina 0,4 mg/ml en HEPES 10 mM, NaCl 0,14M, aminobenzamidina 0,5 mM, MOPS 0,20 a pH 7,4 se adsorbió en una pieza de yeso de poliuretano (comercializado como Ligasone por Hartmann Scandicare AB, Anderstorp, Suecia). Se usó una cantidad de solución suficiente para saturar la pieza de poliuretano. La pieza se transfirió a un tubo, que después se cerró para evitar la evaporación. El tubo se guardó a 37° C y se extrajeron muestras de la solución a intervalos mediante una presión ligera sobre la pieza de poliuretano. La curva de deterioro de la actividad mostró un valor de T 70 % de 74 días, correspondiente a un incremento de la estabilidad por un factor de 46.

Ejemplo 8- Adsorción de enzima sobre una fase sólida

Se abalizó la adsorción de la trombina en soluciones estabilizantes. Se incubaron copos sólidos de quitosano, de aproximadamente 3 x 3 mm, durante 10 minutos en soluciones de 400 unidades/ml de trombina en HEPES 10 mM, NaCl 0,13, a pH 7,4. Las soluciones tenían las adiciones siguientes: 1) ninguna, 2) morfolina 0,10 M, N-(2'-fenoxi)-4-aminopiridina 2 mM, 3) morfolina 0,10 M, N-(2'-fenoxi)-4-aminopiridina 2 mM, carboximetilcelulosa al 0,5 %. Los copos se suspendieron y se secaron sobre papel de filtro. Para obtener una medición de la actividad de la coagulación de la trombina, se introdujo un copo en un tubo de ensayo y se añadieron 0,4 ml de solución de fibrinógeno 1,3 mg/ml. Para mejorar la detección de la coagulación, el tubo también contenía una pequeña bola de acero. Los tiempos de coagulación obtenidos inicialmente con los copos de las diversas mezclas de incubación variaron entre 1 a 4 minutos. Tras incubación en tubos Eppendorf a 37 °C durante 7 días, los tiempos de coagulación para los copos incubados en la solución 1) fueron considerablemente prolongados. Los valores fueron entre 24 y 27 minutos. En contraste con ello, los tiempos de coagulación para los copos incubados en las soluciones 2) y 3) estaban en el intervalo de 1 a 2,5 minutos, es decir los mismos que los valores de partida. Evidentemente, usando las soluciones 2) y 3) se obtiene una estabilización fuerte de la actividad de la trombina.

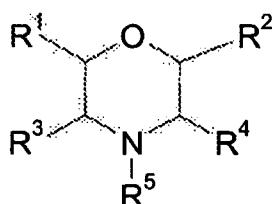
REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende a) una serina proteasa; b) un inhibidor reversible de dicha serina proteasa; y c) un compuesto M que tiene la fórmula I:



(I)

- 5 en la que
 n es 0, 1 ó 2;
 X es O, N o CH₂;
 R¹-R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan entre H, -CH₂-R⁶, -CH₂-O-R⁶, -CH₂-S-R⁶, -CH₂-NH-R⁶, -CO-O-R⁶, -CO-NH-R⁶, -CH₂-NH-CO-R⁶, -CH₂-O-CO-R⁶, -CH₂-NH-CO-NHR⁶, -CH₂-NH-CO-OR⁶, -CH₂-NH-CS-NHR⁶ y -CH₂-O-CO-NHR⁶;
 R⁵ es como R¹-R⁴ o P-Q;
 P se selecciona entre -(CH₂)_m- y -(CH₂)_m-Y-(CH₂)_m-, en las que m es 1-6 e Y es O, N H o S;
 Q se selecciona entre H, -SO₃, -COOH, -NH₂, -OH y -CONH₂;
 seleccionándose cada R⁶ individualmente entre H, alquilo inferior sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, bencilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir o anillo o anillos heteroaromáticos mono-, bi- o tricíclicos sin sustituir o sustituidos con uno o más heteroátomos y heterociclos no aromáticos, seleccionándose los sustituyentes de los grupos sustituidos entre alquilo inferior, halógenos, arilo sustituido o sin sustituir, compuestos heteroaromáticos sustituidos o sin sustituir, heterociclos no aromáticos, alquiloxi, alquilamino; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 20 2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la serina proteasa se selecciona entre el grupo que consiste en tripsina, kalicreína, trombina, plasmina, uroquinasa, activador de plasminógeno tisular, forma activa del factor IX, forma activa del factor X y forma activa del factor XI.
3. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el inhibidor reversible presenta un valor de K_i de entre 0,01 y 2 mM, por ejemplo entre 0,04 mM y 0,5 mM.
- 25 4. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que en la que la serina proteasa es trombina.
5. Composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el inhibidor reversible se selecciona entre N-(2'-fenoxi)-4-aminopiridina y derivados de la misma, benzamidina, N,N-dietiletilendiamina, aminobenzamidina, amidinopiridina y terc-butilamidina.
- 30 6. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la serina proteasa es plasmina.
7. Composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el inhibidor reversible se selecciona entre N,N-dietiletilendiamina, aminobenzamidina y benzamidina.
8. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la serina proteasa es tripsina.
9. Composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el inhibidor reversible se selecciona entre aminobenzamidina y benzamidina.
- 35 10. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el compuesto M es un compuesto de fórmula II:



(II)

en la que

R^1 - R^4 son iguales o diferentes y se seleccionan entre H, $-\text{CH}_2\text{-R}^6$;

R^5 es como R^1 - R^4 o P-Q;

P se selecciona entre $-(\text{CH}_2)_m$ - y $-(\text{CH}_2)_m\text{-Y-(CH}_2)_m$ -, en las que m es 1-6 e Y es O, NH o S;

5 Q se selecciona entre H, $-\text{SO}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ y $-\text{CONH}_2$;

seleccionándose cada R^6 individualmente entre H, alquilo inferior sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, bencilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir o anillo o anillos heteroaromáticos mono-, bi- o tricíclicos sin sustituir o sustituidos con uno o más heteroátomos y heterociclos no aromáticos, seleccionándose los sustituyentes de los grupos sustituidos entre alquilo inferior, halógenos, arilo sustituido o

10 sin sustituir, compuestos heteroaromáticos sustituidos o sin sustituir, heterociclos no aromáticos, alquiloxi, alquilamino; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Composición de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el compuesto M es un compuesto de fórmula III:



(III)

en la que

15 R^5 es $-\text{CH}_2\text{-R}^6$ o P-Q;

P se selecciona entre $-(\text{CH}_2)_m$ - o $-(\text{CH}_2)_m\text{-Y-(CH}_2)_m$ -, en las que m es 1-6 e Y es O, NH o S;

Q se selecciona entre H, $-\text{SO}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ y $-\text{CONH}_2$,

seleccionándose cada R^6 individualmente entre alquilo inferior sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, bencilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, seleccionándose los sustituyentes de los grupos sustituidos entre alquilo inferior, halógenos, arilo sustituido o sin sustituir, compuestos heteroaromáticos sustituidos o sin sustituir, heterociclos no aromáticos, alquiloxi, alquilamino; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20

12. Composición de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el compuesto M se selecciona entre el grupo que consiste en morfolina, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido morfolino butil sulfónico, ácido morfolino propil carboxílico, morfolino etil alcohol y ácido morfolino etil sulfónico.

25

13. Composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el compuesto M se selecciona entre morfolina y ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico.

14. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la serina proteasa es trombina, el inhibidor reversible es N-(2'-fenoxi)-4-aminopiridina y el compuesto M es morfolina.

30 15. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un polímero viscoso y adhesivo seleccionado de polisacáridos y gelatina.

16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el polímero viscoso y adhesivo es un polisacárido.

17. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el polisacárido se selecciona de almidón, sus derivados, celulosa, sus derivados, y mezclas de los mismos.

35 18. La composición de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el polisacárido se selecciona de carboximetilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa y mezclas de los mismos.

19. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el polímero viscoso y adhesivo es gelatina.

20. La composición de acuerdo con la reivindicación 19, en la que la gelatina es gelatina de peces de agua fría.

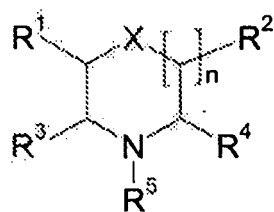
40 21. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que está en una forma seleccionada a partir de una solución y un gel, por ejemplo una solución acuosa o un gel acuoso.

22. El uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes como un medicamento.

45 23. El uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que la serina proteasa es trombina, para la preparación de un medicamento para establecer hemostasia en un sujeto que sufre una hemorragia.

24. El uso de composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que la serina proteasa se selecciona de plasmina, uroquinasa o activador del plasminógeno tisular, para la preparación de un medicamento para tratamiento trombolítico.

5 25. Procedimiento para la estabilización de una serina proteasa, que comprende mezclar la serina proteasa con a) un inhibidor reversible de dicha serina proteasa; y b) un compuesto M de fórmula I:



(I)

en la que

n es 0, 1 ó 2;

X es O, N o CH₂;

10 R¹-R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan entre H, -CH₂-R⁶, -CH₂-O-R⁶, -CH₂-S-R⁶, -CH₂-NH-R³, -CO-O-R⁶, -CO-NH-R⁶, -CH₂-NH-CO-R⁶, -CH₂-O-CO-R⁶, -CH₂-NH-CO-NHR⁶, -CH₂-NH-CO-OR⁶, -CH₂-NH-CS-NHR⁶ y -CH₂-O-CO-NHR⁶;

R⁵ es como R¹-R⁴ o P-Q;

P se selecciona entre -(CH₂)_m- y -(CH₂)_m-Y-(CH₂)_m-, en las que m es 1-6 e Y es O, NH o S;

15 Q se selecciona entre H, -SO₃, -COOH, -NH₂, -OH y -CONH₂;

20 seleccionándose cada R⁶ individualmente entre H, alquilo inferior sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, bencilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, o anillo o anillos heteroaromáticos mono-, bi- o tricíclicos, sin sustituir o sustituidos con uno o más heteroátomos, y heterociclos no aromáticos; seleccionándose los sustituyentes de los grupos sustituidos entre alquilo inferior, halógenos, arilo sustituido o sin sustituir, compuestos heteroaromáticos sustituidos o sin sustituir, heterociclos no aromáticos, alquilo, alquilamino; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

26. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que la serina proteasa es como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 6 y 8.

25 27. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-26, en el que el inhibidor reversible es como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 3, 5, 7 y 9.

28. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-27, en el que el compuesto M es como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 10-14.

29. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-28, que comprende además mezclar la serina proteasa con un polímero viscoso y adhesivo seleccionado de polisacáridos y gelatina.

30 30. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 29, en la que el polímero viscoso y adhesivo es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 16-20.

31. Dispositivo de hemostasia vascular que tiene una composición adsorbida sobre él de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, composición en la que la serina proteasa es trombina.

35 32. Dispositivo de hemostasia vascular de acuerdo con la reivindicación 31, que comprende un material biodegradable, seleccionado, por ejemplo, entre quitosano y colágeno.