

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 225**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2006 E 06776572 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 1917026**

54 Título: **Estimuladores del factor X activado como nuevos agentes antihemorrágicos de uso tópico**

30 Prioridad:

03.08.2005 EP 05380179

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

16.06.2014

73 Titular/es:

**THROMBOTARGETS EUROPE, S.L. (100.0%)
Parc Mediterrani de la Tecnologia, Avinguda del
Canal Olímpic s/n, Edifici B6, 2 planta
08860 Castelldefels - Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**PEDREÑO EGEE, JAVIER y
CAVEDA CATASÚS, LUIS**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 468 225 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

Estimuladores del factor X activado como nuevos agentes antihemorrágicos de uso tópico

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el tratamiento tópico de hemorragias en un sujeto mediante el uso de estimuladores de FXa. Esta invención está basada en el descubrimiento de que el Factor Tisular (FT) lipidado ejerce un nuevo papel regulador estimulando todas las actividades proteolíticas (actividad hidrolítica de protrombina y
10 amidolítica) de ambas formas de FXa, la soluble y la unida al complejo protrombinasa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 1. Fisiología de la coagulación

La hemostasis es el mecanismo por el que los seres vivos responden ante una hemorragia e implica la participación de dos procesos que adquieren funcionalidad inmediatamente después de una lesión y se mantienen activos durante un largo período de tiempo. El primero de ellos se conoce como hemostasia primaria y se caracteriza por la
20 aparición de vasoconstricción en el punto de la lesión vascular y la formación del agregado plaquetario. El segundo se conoce como hemostasia secundaria, siendo la fase en la que se forma el coágulo de fibrina por la acción de las diferentes enzimas proteolíticas de la cascada de la coagulación.

El agregado plaquetario juega un papel clave en la hemostasis de los capilares, teniendo especial relevancia en las
25 hemorragias mucocutáneas. Por el contrario, la formación del coágulo de fibrina es mucho más importante en la hemostasia de los grandes vasos, adquiriendo mayor relevancia en las hemorragias internas (gastrointestinales, cerebrales, etc.). Durante la formación del agregado plaquetario se pueden distinguir las siguientes fases: (i) adhesión de las plaquetas a la superficie del sub-endotelio expuesta por la lesión; (ii) liberación del contenido granular de las plaquetas, como respuesta a su activación; (iii) agregación de las plaquetas con el consiguiente
30 secuestro y concentración de más plaquetas en el lugar de la lesión; y (iv) unión del fibrinógeno, así como de otras proteínas de coagulación a la superficie de las plaquetas para producir trombina y formar el coágulo de fibrina que permitirá que las plaquetas se fusionen y consoliden, estabilizando de ese modo el coágulo hemostático. Además, es bien conocido que la cantidad de plaquetas es crítica para la formación del coágulo de fibrina; contajes de plaquetas por debajo de 20.000 por μl están acompañados de episodios de sangrado severos.

35 En la segunda fase del proceso de coagulación sanguínea, participan diversas enzimas proteolíticas y cofactores, referidos todos ellos como factores de coagulación, y consiste en varias fases que finalizan con la formación de fibrina a partir de la hidrólisis del fibrinógeno por la acción de la trombina. Adicionalmente, la producción de trombina potencia el agregado plaquetario al aumentar la activación y agregación de más plaquetas. La trombina es
40 previamente formada por la hidrólisis proteolítica de un apoenzima, la protrombina. Esta proteólisis es realizada por la FXa serinproteasa que se une a la superficie de las plaquetas activadas y sólo en presencia de su cofactor, el Factor de coagulación V activado (FVa), e iones calcio, esta serinproteasa es capaz de hidrolizar la protrombina. FXa puede ocurrir por dos vías separadas, la vía intrínseca y la vía extrínseca.

45 La vía intrínseca consiste en una serie de reacciones que involucran principalmente el Factor de coagulación VIII (FVIII), el Factor de coagulación IX (FIX) y el Factor de coagulación XI (FXI), en las que cada proenzima es hidrolizada dando lugar a su forma proteásica activa (FVIIIa, FIXa y FXIa). En cada paso, la enzima proteolítica recién formada catalizará la activación de la siguiente proenzima para dar lugar sucesivamente a la forma activa. La activación de los diferentes factores de la coagulación implicados en la vía intrínseca tiene lugar; por tanto, a modo
50 de cascada, una deficiencia de cualquiera de las proteínas de la vía intrínseca bloquea la activación del siguiente paso, impidiendo la formación del coágulo y aumentando la tendencia hemorrágica. Deficiencias en distintos factores de coagulación, por ejemplo, en FVIII, FIX o FXI causan síndromes hemorrágicos severos, tales como la Hemofilia A, B y C, respectivamente.

55 En la vía extrínseca de coagulación sanguínea, el FT expuesto por las células de la adventicia en el lugar de la lesión, se une al Factor de coagulación VII/Factor de coagulación VII activado (FVII/FVIIa) circulante para formar el complejo FT::FVIIa y, en presencia de calcio, actuar como sustrato para la activación del FX. La vía extrínseca es considerada actualmente como la vía de mayor relevancia en la coagulación sanguínea y se acepta que, ante una hemorragia producida por una lesión vascular, la coagulación se desencadena por la activación de la vía extrínseca,
60 que implica la interacción del FT con su ligando, FVII/FVIIa.

Otro de los papeles asignados al complejo FT::FVIIa en la coagulación es el de actuar como sustrato para que tenga lugar la activación del FX por el FVIIa. Como consecuencia, aumentan los niveles basales de FXa (<150pM),

que inicialmente son insuficientes para generar la formación del coágulo de fibrina. Este aumento en las concentraciones basales del FXa en presencia de su cofactor, FVa, y de una superficie procoagulante celular, sí que sería capaz de producir la trombina necesaria para la formación del coágulo de fibrina. Actualmente se acepta que las plaquetas una vez activadas, juegan un papel clave en la coagulación sanguínea. Aportan la superficie procoagulante rica en fosfolípidos aniónicos y, por otro, exponen los factores FVa y FXa almacenados en su interior. Todo ello permite el correcto ensamblaje de los diferentes agentes implicados en la coagulación sobre la superficie de sus membranas plasmáticas formando el bien conocido complejo protrombinasa (que incluye FXa, FVa, protrombina, y una superficie fosfolipídica plaquetaria procoagulante aniónica).

10 La teoría de la activación de la vía extrínseca es capaz de explicar cómo comienza la coagulación a través del papel que se le ha atribuido al complejo FT::FVIIa. Un ejemplo que ilustra la relevancia biológica del complejo FT::FVIIa en el proceso de coagulación sanguínea es el Síndrome de Coagulación Intravascular Diseminada (DIC). Esta condición clínica está asociada con la liberación intravascular del FT y puede ocurrir en el curso de condiciones clínicas severas (shock, sepsis, paro cardiaco, trauma mayor, enfermedades del hígado, cirugía mayor, quemaduras, etc.)

Evidentemente, en un contexto en que el FVIIa no está presente, como ocurre en una deficiencia congénita de este factor, la coagulación hipotéticamente nunca tendrá lugar ya que FX no se activará a niveles suficientes y, como consecuencia, las manifestaciones hemorrágicas serán fatales. Modelos murinos confirman esta teoría y la deficiencia en FVII es incompatible con la vida, estando acompañada de hemorragias fatales severas. Sin embargo, hasta ahora las deficiencias de FVII congénitas descritas en humanos hasta ahora, no siempre están acompañadas de hemorragias. Se ha informado de casos de deficiencia completa de FVII sin ningún síntoma clínico y que ocurren en individuos sanos sin complicaciones hemorrágicas. Todo esto sugiere que deben existir en los humanos otros mecanismos desencadenantes de la coagulación independientes del FVII.

25 El FT es una glicoproteína integral de membrana perteneciente a la superfamilia de receptores de citocinas clase II que se une específicamente al FVII/FVIIa y juega un papel relevante en la vía extrínseca de coagulación sanguínea. Las funciones fisiológicas asignadas al FT son bien conocidas; por un lado, es un receptor específico para el FVIIa y, una vez se ha formado el complejo FT::FVIIa, actúa como sustrato para que tenga lugar la activación de FX. De hecho, después de una lesión vascular, el FT, que normalmente está secuestrado en la superficie de las células de la adventicia que rodean externamente a los vasos sanguíneos, entra en contacto e interacciona con su ligando, el FVII presente en la sangre, para formar el complejo FT::FVII. Una vez formado este complejo tiene lugar la autoactivación de FVII dando su forma activa FVIIa. Actualmente se dispone de amplia información sobre la estructura del complejo FT::FVII. Los principales sitios de unión de FVII que participan en la interacción con FT se localizan en el primer dominio similar al del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y en el dominio proteásico. Por otro lado, también se ha descrito que participan otros sitios de unión con menor relevancia (dominio rico en 4-carboxiglutamato (dominio Gla) y el segundo dominio EGF). Los sitios de unión presentes en el FT se localizan en los dos dominios de fibronectina tipo III y en la región intermedia entre ambos dominios.

40 Estudios recientes han permitido identificar que son los residuos Lisina 165 y Lisina 166 del FT los que interaccionan con el dominio Gla del FX, tanto en la forma activada como en la forma no activada. Sin embargo, al contrario de lo que sucede con la información referente al complejo FT::FVIIa, poco se sabe de la interacción de FT con FX y FXa. Primero, los datos sugieren que los residuos de Lisina (165 y 166) actúan como sustrato para la activación de FX. Por otro lado, recientemente se ha descrito que el FT puede actuar como cofactor de FXa para la activación de FVII. Es decir, que la unión del FVII a FT estimula la autoactivación de FVIIa y la activación de FX. Después, el FXa unido al FT estimula la activación de FVII el cual, a su vez, aumentará la activación de FX y, como consecuencia, la hidrólisis de la protrombina y la formación del coágulo de fibrina.

Los inventores han descubierto que el papel postulado del FT como cofactor de FXa es mucho más relevante, llegando a ser crítico para la hemostasis. A pesar del papel aceptado del FT como receptor de membrana para el FVII, los inventores han demostrado que el FT es también un potente estimulador del FXa. El FT actúa como estimulador del FXa produciendo un aumento significativo de su actividad proteolítica. "Estimuladores del FXa" como se usa en la presente descripción hace referencia a todas las formas del FXa, tales como el FXa soluble y el FXa unido al complejo protrombinasa.

55 Es bien conocido que el FXa a concentraciones picomolares es incapaz de producir cualquier efecto en la coagulación, incluso en presencia de su bien conocido cofactor, el FVa (ver Tabla 9). Por lo tanto, bajo estas condiciones el complejo protrombinasa no está activo. Sorprendentemente, en presencia de FT (es decir, administración endógena o daño), el FXa en concentraciones picomolares (es decir, concentraciones fisiológicas basales o administradas de forma exógena) causa hidrólisis de protrombina, conduciendo a la formación del coágulo de fibrina, incluso en la ausencia de FVII/FVIIa (Tabla 7).

En la presente solicitud de patente los inventores describen que la interacción FT::FXa es un nuevo mecanismo desencadenante del mecanismo de coagulación independiente de los complejos FT::FVIII y la vía de coagulación extrínseca.

5 Finalmente, es bien conocido que hay ciertas enfermedades plaquetarias que ocurren con trastornos en la agregación plaquetaria y una mayor tendencia de episodios hemorrágicos, entre las que destacan la enfermedad de Glanzmann y el Síndrome de Bernard-Soulier, en donde se han descrito defectos congénitos que afectan al receptor de fibrinógeno o al receptor Gp1b, respectivamente. Por otro lado, están presentes episodios hemorrágicos severos en trastornos trombocitopénicos adquiridos y congénitos cuando el conteo de plaquetas desciende por debajo de
10 20.000 por μ l.

En la presente solicitud de patente, los inventores han demostrado que el FT lipídado es también efectivo en el tratamiento de hemorragias presentes en enfermedades plaquetarias adquiridas, congénitas y en trastornos trombocitopénicos severos (por debajo de 9.000 por μ l).

15

2. Patología de la coagulación

Las deficiencias congénitas de cada factor de coagulación se pueden asociar con la aparición de hemorragias y generalmente involucran una sola proteína; así, por ejemplo, la Hemofilia A es una enfermedad hemorrágica
20 hereditaria que afecta a FVIII. Las enfermedades de coagulación adquiridas aparecen en individuos sin historial previo de sangrado y pueden tener múltiples orígenes; a modo ilustrativo, la presencia de inhibidores específicos para factores de coagulación puede aparecer en individuos que se han sometido a muchas transfusiones. Aunque las deficiencias adquiridas de factores de coagulación son una entidad etiológica desconocida que también provocan graves problemas hemostáticos, son también uno de los problemas más importantes en la politransfusión a la que
25 se ven sometidos pacientes con coagulopatías congénitas. Otra fuente importante de trastornos en la coagulación adquiridos son las terapias anticoagulantes, tales como los fármacos heparina y warfarina. Un porcentaje significativo de los pacientes tratados con fármacos anticoagulantes (5-10%) presentan episodios de sangrado, la mayoría de ellos difíciles de manejar.

30 Como se ha mencionado previamente, los trastornos plaquetarios adquiridos y congénitos también pueden estar asociados a hemorragias. Descensos en el conteo de plaquetas (por debajo de 20.000 por μ l) pueden causar impedimento del coágulo de fibrina frecuentemente acompañado de episodios de sangrado severos.

El arsenal terapéutico disponible actualmente ante una hemorragia de carácter leve/moderado o grave/mortal (por
35 cirugía o trauma externo), es muy limitado. Existen diferentes agentes hemostáticos que son capaces de acelerar la coagulación sanguínea y prevenir hemorragias, por ejemplo, (1) productos sanguíneos derivados de humanos, como el colágeno fibrilar, pegamento de fibrina y concentrados de complejo protrombina; (2) proteínas humanas recombinantes; (3) fármacos antifibrinolíticos, tales como ácido aminocaproico, ácido tranexámico; y (4) agentes hemostáticos locales inorgánicos, tales como superficies de caolín y sílice.

40

Se ha informado de las siguientes limitaciones críticas:

- (1) Administración intravenosa
- (2) Requerimiento de un dispositivo especial para la administración
- (3) Enfoque terapéutico estrecho
- 45 (4) Tratamiento molesto o inapropiado a ser administrado en episodios de sangrado específicos
- (5) Carencia de efecto agudo
- (6) Inestabilidad del coágulo de fibrina
- (7) Efectos secundarios muy peligrosos
- (8) Tratamiento caro

50

Productos sanguíneos derivados de humanos (factores de coagulación y concentrados plaquetarios)

El tratamiento que siempre se debe administrar de forma intravenosa es muy caro y está poco disponible. Tiene un enfoque terapéutico muy estrecho, es sólo útil para tratar su deficiencia específica. No es adecuado para el
55 tratamiento tópico de cualquier episodio de sangrado. No es útil para tratar con agudeza una hemorragia porque requiere protocolos de administración prolongada para que sea eficaz y, sobre todo, es un tratamiento muy peligroso: el 20% de los pacientes hemofílicos han desarrollado hepatitis, 5% HIV, y hasta el 15% presentan anticuerpos plasmáticos contra FVIII o FIX (hemofilia adquirida) que requiere tratamientos de sustitución muy caros y especiales (inmunosupresores, altas dosis de factores de coagulación, plasmaféresis, etc.). Por estas razones, las
60 organizaciones de salud pública (WHO, FDA, EMEA, etc.) están muy interesadas en el desarrollo de nuevos agentes hemostáticos mejor que los concentrados de factor de coagulación.

Agentes hemostáticos locales

Es un tratamiento caro, inapropiado para ser administrado en algunos episodios de sangrado (es decir, epistaxis), molesto para el tratamiento dental, forma un coágulo de fibrina inestable, y como concentrados de factor de coagulación tienen los mismos efectos secundarios peligrosos potenciales. No deberían usarse en pacientes que nunca han recibido productos sanguíneos derivados de humanos o aquellos que están recibiendo tratamiento con FIX o FVIII recombinantes debido al riesgo potencial de transmisión viral humana.

Proteínas recombinantes humanas

Es el tratamiento más caro (un coste medio de 6.000 euros) sólo disponible para los países desarrollados. Como concentrados de factor de coagulación, siempre debe ser administrado intravenosamente, tiene un enfoque terapéutico muy estrecho porque es sólo útil para tratar su deficiencia específica, es inapropiado para tratar tópicamente hemorragias, no es útil para tratar con agudeza una hemorragia porque también requiere protocolos de administración prolongados para ser efectivo y, aunque no se ha informado de transmisión viral humana, se ha descrito el mismo porcentaje de hemofilia adquirida (hasta el 15% presentan anticuerpos anti FVIII o FIX). Como concentrados de factor de coagulación, las autoridades públicas limitan mucho su uso.

Fármacos antifibrinolíticos

Tienen un estrecho enfoque terapéutico, siendo esta su limitación más relevante. Estos fármacos requieren formación previa del coágulo de fibrina para ser efectivos. Por lo tanto, son sólo útiles en sujeto sanos, sin embargo cuando el coágulo de fibrina se forma de manera inapropiada (es decir, coagulopatías congénitas, tales como hemofilia, deficiencia de FVII) su eficacia terapéutica disminuye dramáticamente. Además, no son útiles para tratar de forma aguda una hemorragia porque también requieren protocolos de administración prolongados para ser efectivos.

Agentes hemostáticos locales inorgánicos

La restricción más importante para el uso de estos agentes hemostáticos es que son inapropiados para ser administrados en muchos tipos de hemorragias, tal como epistaxis, dental y quirúrgica. Además, se ha informado de una reacción exotérmica dolorosa, que reduce de manera significativa su uso solo para el sangrado mucocutáneo en situaciones críticas (guerras).

En conclusión, sorprendentemente hoy en día todavía no se dispone de fármacos útiles para el tratamiento tópico de un simple episodio de epistaxis o de un sangrado gingival dental después del cepillado dental o simplemente ante una herida cotidiana producida por el afeitado, por la punción venosa en una extracción sanguínea, o por la herida de una caída fortuita en el calle. El problema se agudiza aún más en el caso de pacientes con diátesis hemorrágicas, por ejemplo, con coagulopatías congénitas del tipo de hemofilia o de la enfermedad de von Willebrand o pacientes con alteraciones plaquetarias congénitas, del tipo de la Enfermedad de Glanzmann o del Síndrome de Bernard-Soulier, o coagulopatías adquiridas. Estos pacientes tienen serios problemas para afrontar el día a día, y ante una sencilla extracción dental o ante cualquier pequeño trauma que ocasione una herida sangrante, no disponen de ningún tratamiento médico que les mejore su calidad de vida. Evidentemente el problema se transforma en otro mucho mayor cuando estos pacientes sufren un trauma externo o un accidente sangrante grave ya que su vida corre un serio peligro. Ante todas estas situaciones tan solo se dispone, como herramienta farmacológica, de la administración de plasma humano que contiene factores deficientes o el factor recombinante humano específico para cada factor de coagulación. Todas estas terapias comportan la utilización de la vía parenteral y, por tanto, no están ideadas para ser utilizadas con elevada frecuencia, como debería de ser, por ejemplo ante cualquier sangrado cotidiano de leve o moderada importancia. Finalmente, está ampliamente aceptado que nuevos agentes hemostáticos locales sin las limitaciones previamente descritas, representarán una mejora significativa del presente tratamiento que reducirá tanto el coste como la alta prevalencia de los efectos secundarios.

3. Antecedentes de la invención

Hasta ahora se ha aceptado que el FT es el principal elemento responsable de desencadenar la coagulación sanguínea. Para el comienzo de la coagulación, es absolutamente necesaria la activación del FX a FXa para comenzar la hidrólisis de protrombina. La fuente de este FXa ha sido atribuida principalmente a la interacción del FVIIa con su receptor, FT. Aunque se ha descrito que FXa está presente en los gránulos plaquetarios y que puede estar expuesto en la superficie cuando tiene lugar su activación, las concentraciones fisiológicas de FXa (<150 pM) presentes en sangre son insuficientes para comenzar la formación de trombina, incluso en presencia de su cofactor, FVa y de una superficie procoagulante plaquetaria (figura 1). Por tanto, actualmente se acepta que la coagulación puede comenzar solo cuando las concentraciones basales de FXa se incrementan de manera significativa. La fuente

del incremento de las concentraciones basales de FXa se ha atribuido siempre a ambos, el complejo FT::FVIIa y las actividades proteolíticas de FIXa (figura 2).

5 Proteínas recombinantes de FT lipiado solo han sido capaces de acelerar la coagulación en condiciones *in vitro*, tanto en muestras de sangre hemofílica como sana, atribuyendo esta acción al papel clásico asignado al FT como receptor de FVIIa. Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales, el FT no lipiado ha demostrado ausencia completa de efecto, lo que indica que la lipiación es necesaria para alcanzar la funcionalidad del FT (apartado 6.1 de los resultados).

10 Nunca se ha descrito el uso del FT lipiado como agente hemostático tópico como tratamiento único para sangrados letales, severos o leves (hemorragias quirúrgicas venosas o arteriales y traumáticas).

La patente europea EP266993 describe el uso del FT no lipiado como agente hemostático para el tratamiento parenteral de síndromes hemorrágicos. Sin embargo, la misma patente describe las diferencias importantes en
15 actividad entre el FT no lipiado reivindicado por EP266993 y el FT lipiado objeto de la presente solicitud de patente.

De hecho, es bien conocido que el FT lipiado es activo en condiciones *in vitro* y su administración parenteral inicia inmediatamente la coagulación intravascular diseminada con fatales consecuencias. Por el contrario, el FT no
20 lipiado no es activo en condiciones *in vitro*, sin embargo se ha reivindicado (EP266993) para el tratamiento de coagulopatías por administración parenteral.

Hasta la fecha, no hay datos sobre el efecto de ambos, el FT lipiado y no lipiado en el tratamiento tópico individual de episodios de sangrado. En la presente solicitud de patente, usando el modelo de transección de cola de rata, los
25 inventores han demostrado que el FT no lipiado era incapaz de detener el sangrado. Por el contrario, los inventores han demostrado por primera vez que el FT lipiado es un agente hemostático útil en el tratamiento tópico de todo tipo de hemorragias, que incluyen condiciones patológicas (animales tratados con heparina y warfarina) y saludables (ratas control sin alteración de la coagulación). En conjunto, indica que el FT lipiado y no lipiado son compuestos claramente diferentes. Como consecuencia, el uso de FT lipiado como un agente para el tratamiento tópico
30 individual de hemorragias no es obvio para el experto en la materia.

Por otro lado, EP266993 se llevó a cabo según el estado de la técnica que postula que la FVII serinproteasa se activa solo cuando se une a su receptor, FT. Por tanto, según EP266993 y el estado de la técnica, cuando FVII/FVIIa no está presente, el FT no debe estar activo. No era obvio pensar para cualquier experto en la materia que el FT
35 (lipiado y no lipiado) podía ser efectivo en el tratamiento de pacientes deficientes en FVII. Los inventores han descubierto que incluso en ausencia de FVIIa, FT actúa como cofactor para FXa. Este descubrimiento es fundamental para comprender que el FT no lipiado también puede actuar como agente hemostático parenteral para hemorragia en pacientes deficientes en FVII.

40 La solicitud de patente internacional WO94/02172 enseña que la inhibición temporal de uno o más anticoagulantes naturales mediante administración sistémica de un inhibidor de un anticoagulante natural (un anticuerpo) puede inhibir el sangrado microvascular. Opcionalmente, el inhibidor puede administrarse en combinación con una administración tópica de trombina o FT lipiado. Es importante señalar que el uso de ambos compuestos fue siempre como tratamientos adyuvantes opcionales y nunca como tratamiento individual. Además, WO94/02172
45 reivindica el uso de estos tratamientos sinérgicos solo en el sangrado capilar (sangrado microvascular, es decir, quemaduras, superficies viscerales inflamadas, superficie de hígado sangrante...) y nunca para hemorragias letales o severas causadas por trauma externo o cirugía que implican daño venoso y arterial. Sin embargo, los inventores de WO94/02172 admiten que, aunque observaron un efecto sinérgico cuando administraron tópicamente trombina en combinación con el tratamiento sistémico, no se observó dicho efecto sinérgico cuando se administraba FT de
50 manera tópica (WO94/02172, figura 3 y página 22, líneas 14-15). Además, la dosis reivindicada en WO94/02172 es muy alta, de 0,1 a 10 mg.

Contrariamente a WO94/02172, la presente solicitud de patente está reivindicando el tratamiento individual de hemorragia venosa o arterial leve/moderada a severa/letal con únicamente FT lipiado mostrando ejemplos en los
55 que tal tratamiento es efectivo a una dosis de proteína activa de 1,2 µg/ml para hemorragias traumáticas (ver modelo severo en tablas 24 y 25). Tal tratamiento sorprendente y extraordinariamente efectivo no ha sido descrito hasta ahora porque no era obvio para cualquier experto en la materia que el FT lipiado actúe como estimulador de la actividad proteolítica de FXa. Los inventores han descubierto que en ausencia de FVIIa, el FT actúa como cofactor para FXa, incluso en ausencia de su bien conocido cofactor, FVa. Este descubrimiento es fundamental para
60 comprender que el FT lipiado solo puede actuar como agente hemostático de hemorragias severas en condiciones patológicas y saludables.

La patente US 4.721.618 enseña que la mezcla sinérgica de fosfolípidos (PCPS) y FXa administrada de forma intravenosa a altas concentraciones (0,2 a 0,5 U/Kg) puede circunvalar el Factor VIII: deficiencia C en un mamífero hemofílico, de forma que el proceso en cascada de la coagulación sanguínea puede continuar. Las altas concentraciones sugeridas de FXa son activas sin la necesidad de vesículas de lípidos PCPS (que pueden elevar esta actividad). También, WO02/086118 enseña que composiciones que incluyen una mezcla de al menos un fosfolípido específico y al menos un factor de coagulación sanguínea activado por serinproteasa son útiles en el tratamiento de alteraciones de la coagulación sanguínea que disminuyen la necesidad de administrar factores de coagulación sanguíneos.

10 Además, el ácido eláxico y otros aceleradores tales como zeolita, sílice y materiales óxido inorgánicos se han usado para aumentar la coagulación sanguínea y son reivindicados en WO02/30479.

Según WO02/086118, un factor de coagulación se define como un factor de coagulación sanguínea activado por serinproteasa (página 5, líneas 13-15). Por tanto, el FT no puede ser considerado como un factor de coagulación sanguínea, porque el FT no es una serinproteasa, sino un receptor de superficie celular específico para el factor VIIa.

La solicitud de patente internacional publicada WO2006/004675 se refiere a un factor tisular de mamífero recombinante producido en plantas y su uso en el tratamiento o prevención de pérdida de sangre. En el ejemplo 6 de la solicitud se usan el FT recombinante humano producido en *E. coli* (rhTF243) y la rhTF263 producida en lechuga en la hemostasis tópica practicada en cerdos.

En la presente solicitud de patente los inventores han demostrado que los fosfolípidos (fosfatidilserina y fosfatidilcolina a diferentes porcentajes y molaridades) no incrementan el efecto procoagulante mediado por el FT lipidado (tabla 21), lo que indica que el efecto sinérgico reivindicado por la patente US 4.721.618 y WO02/086118 es exclusivo para factores de coagulación sanguínea activados por serinproteasa, pero no para receptores de membrana como el FT. Sorprendentemente, cuando el FT lipidado se combinaba simultáneamente con superficies inorgánicas cargadas negativamente (SICN) se observaba un efecto sinérgico significativo en condiciones experimentales *in vivo* e *in vitro*. El SICN usado en esta descripción está constituido por una mezcla de lípidos y un acelerador de la coagulación sanguínea, el ácido eláxico. Los lípidos tienen carga neta negativa, lo que significa que la mezcla lipídica puede incluir lípidos neutros o zwitterónicos, pero debe contener una cierta cantidad de lípidos cargados negativamente que confieran carácter aniónico a la mezcla. A modo ilustrativo, no limitativo, ejemplos de lípidos cargados negativamente pueden ser esfingolípidos (tales como ceramida-1-fosfatos, fosfatidiletanolamina glicosilada, sulfatidos hidroxilados o no hidroxilados, gangliósidos) y lípidos basados en glicerol (tales como fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilinositol fosfato, ácidos fosfatídicos, fosfatidilgliceroles, cardiolipinas). Comercialmente hay disponibles SICN tales como Dade® Actin® (Dade Behring) marca, por ejemplo, DADE® Actin® FS.

En conclusión, la presente solicitud de patente describe un nuevo agente hemostático local caracterizado por las siguientes ventajas respecto a los fármacos disponibles comercialmente:

- (1) Fácil administración tópica
- (2) No requiere dispositivos especiales para su administración tópica
- (3) Enfoque terapéutico amplio (déficits de FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII y FXIII)
- 45 (4) Tratamiento apropiado para ser administrado en todos los episodios de sangrado (epistaxis, sangrado dental, mucocutáneo, hemorragias quirúrgicas y traumáticas)
- (5) Ejerce un efecto agudo potente
- (6) Formación del coágulo de fibrina fisiológico (extrema estabilidad del coágulo)
- (7) Sin efectos secundarios
- 50 (8) Tratamiento de bajo coste

La principal meta de WHO, FDA, EMEA y otras autoridades de salud públicas es reducir los peligrosos efectos secundarios asociados al consumo de productos sanguíneos derivados de humanos. La presente invención ha sido diseñada para cubrir estas necesidades.

55 RESUMEN DE LA INVENCION

El papel asignado al complejo FT::FVIIa en la coagulación es ampliamente conocido. El complejo FT::FVIIa actúa como sustrato de forma que tiene lugar la activación de FX. Estudios recientes han permitido identificar que los residuos de Lisina 165 y Lisina 166 del FT interaccionan con el dominio Gla de FX, en las formas tanto activada como no activada. Contrariamente al complejo FT:FVIIa, poco se sabe de la interacción de FT con FX y FXa. Únicamente se ha descrito que el FT puede actuar como estimulador de FXa para la activación de FVII. Estos es, la unión de FXa a FT estimularía la activación de FVII lo cual, sucesivamente, incrementará la activación de FX.

Los inventores han descubierto que el papel de FT como estimulador de FXa es mucho más relevante, llegando a ser crítico para la hemostasis (figura 3). Es bien conocido que FXa a concentraciones picomolares es incapaz de producir un efecto en la coagulación y la agregación plaquetaria. A pesar del papel aceptado de FT como receptor de membrana para FVII, los inventores han demostrado que el FT actúa también como estimulador de FXa para incrementar su principal actividad proteolítica, la hidrólisis de protrombina, llevando a la formación del coágulo de fibrina.

Sorprendentemente, en presencia del FT (es decir, administración exógena o por lesión), FXa a concentraciones picomolares, causa la hidrólisis de la protrombina, llevando a la formación del coágulo de fibrina, incluso en ausencia de su ligando, FVII/FVIIa. Los resultados globales, indican que el FT actúa como estimulador de FXa, y la unión específica de FXa al FT es el primer paso que desencadena la coagulación sanguínea.

Los datos de los inventores sugieren que la rapidez con la que tiene lugar la coagulación es dependiente de la interacción entre el FT y en todas las formas previamente descritas de FXa.

En presencia de concentraciones fisiológicas de FXa (<150 pM) incapaces por sí mismas de iniciar la coagulación, el FT lipídado es capaz de iniciar rápidamente la formación de trombina como resultado de su acción como un cofactor.

Sorprendentemente, estos efectos hemostáticos son independientes de la presencia de FVII y FVIIa, por lo que el efecto procoagulante mediado por el complejo endógeno FT::FXa (FXa < 150 pM) es especialmente útil y relevante en muestras deficientes en Factor VII. No obstante, también se han observado efectos hemostáticos potentes en muestras de pacientes con defectos congénitos de otros factores de coagulación como son: FVIII (hemofilia A), FIX (hemofilia B), FXI (hemofilia C), FV, FX, FXII y FXIII así como en individuos con alteraciones congénitas plaquetarias, tales como el síndrome de Bernard Soulier y la enfermedad de Glanzmann y alteraciones trombocitopénicas.

Por tanto, la presente invención se basa en el uso del FT lipídado, solo o en combinación con FXa y/o con SICN, como un nuevo estimulador del FXa, útil en el tratamiento tópico de hemorragias presentes en individuos sanos y en pacientes con diátesis hemorrágica.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un FT lipídado, o un fragmento funcional del mismo, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento tópico de hemorragias en un sujeto, con la condición que:

- (i) el FT lipídado no es un FT de mamífero recombinante o un fragmento funcional del mismo obtenido de plantas transgénicas, y
- (ii) el FT lipídado no es un FT lipídado que tiene un 70% de PC y un 30% de PS y que comprende un FT producido en E. coli que tiene la secuencia

```

SGTTNTVAAYNLTWKSTNEFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTD
TECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLG
QPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSG
KKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
IFYIIGAVVFVVIILVILAILSLH.
    
```

En otro aspecto, la invención se relaciona con un producto que comprende FT lipídado solo o en combinación con FXa y/o SICN. El uso de dicho producto como medicamento o en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de hemorragias en un sujeto constituye un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un complejo formado por FT lipídado y un compuesto seleccionado entre FXa, una SICN y combinaciones de ambos. El uso de dicho complejo como medicamento o en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de hemorragias en un sujeto constituye un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un FT lipídado, junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende, además, FXa y/o una SICN.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un producto que comprende dicha composición farmacéutica y un soporte. En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende, además, FXa y/o una SICN.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es una representación esquemática que muestra las concentraciones basales de FXa y la formación del coágulo de fibrina.

5

La figura 2 es una representación esquemática que muestra las vías intrínseca y extrínseca clásicas de la coagulación sanguínea.

La figura 3 es una representación esquemática que muestra el nuevo efecto regulador del FT lipidado como estimulador del FXa según la presente invención.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los hallazgos aquí descritos demuestran, por primera vez, que el FT lipidado en ausencia de su ligando, FVII/FVIIa, actúa como estimulador de FXa provocando que esta enzima inicie la hidrólisis de la protrombina y, en consecuencia, tenga lugar la coagulación. Este nuevo mecanismo de acción tiene especial relevancia en niveles de concentración de FXa muy bajos (por debajo de los considerados como fisiológicos 150 pM). Es bien conocido que existen determinadas enfermedades plaquetarias que cursan con alteraciones en la agregación plaquetaria y mayor tendencia a presentar episodios hemorrágicos. En consecuencia, el FT lipidado administrado exógenamente no solo es útil en las coagulopatías congénitas sino que, además, permitirá la hemostasia en las alteraciones plaquetarias congénitas y adquiridas, tales como la enfermedad de Glazmann, el síndrome de Bernard-Soulier y alteraciones trombocitopénicas.

La rapidez con la que tiene lugar la coagulación no es, por tanto, dependiente de la formación del complejo FT::FVIIa y la consecuente activación de FX, tal y como se ha postulado hasta la fecha, sino la interacción de FT y FXa a concentraciones basales fisiológicas (<150 pM). La consecuencia biológica más relevante de la formación de esta interacción es la generación rápida del inicio de la coagulación y que ésta solo requiere de la presencia de FXa a concentraciones fisiológicas presentes en sangre y de la interacción con su estimulador, el FT. El proceso se verá amplificado inmediatamente, gracias a la acción de la trombina inicialmente formada por el complejo y a la mayor producción de FXa ya sea por el complejo FT::FVIIa o por la misma trombina.

Por tanto, los hallazgos de los inventores ponen de manifiesto claramente que en ausencia de FVIIa y en presencia de FXa a concentraciones fisiológicas (< 150 pM) incapaces por sí mismas de iniciar la coagulación, el FT lipidado inicia rápidamente la formación de trombina gracias a que su nueva acción como cofactor del FXa, promoviendo el inicio de la hidrólisis de la protrombina. Por otra parte, los hallazgos de los inventores demuestran que el FT lipidado y el FXa a bajas concentraciones (que no son eficaces por sí mismas de ejercer efectos antihemorrágicos), cuando son administrados conjuntamente son capaces de causar rápidamente el inicio de la formación del coágulo de fibrina. Los efectos observados con las combinaciones FT::FXa, en concreto con una concentración de FXa <150 pM, son mucho mejores que los detectados cuando se administra solo el FT lipidado. La combinación de FXa y FT lipidado con SICN puede incrementar el efecto hemostático incluso más. Los resultados obtenidos apoyan la idea de que en presencia de concentraciones basales de FXa presentes en el plasma (<150 pM), incapaces de generar por sí mismas la respuesta procoagulante inicial, ésta tiene lugar cuando FT actúa como estimulador del FXa.

En consecuencia, el FT lipidado, solo o en combinación con FXa y/o SICN, se puede utilizar como nuevos agentes hemostáticos tópicos útiles en el tratamiento de las hemorragias presentes tanto en individuos sanos como en pacientes que padecen diátesis hemorrágica, con la condición que:

- (i) el FT lipidado no es un FT de mamífero recombinante o un fragmento funcional del mismo obtenido de plantas transgénicas, y
- (ii) el FT lipidado no es un FT lipidado que tiene un 70% de PC y un 30% de PS y que comprende un FT producido en *E. coli* que tiene la secuencia

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTD
TECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLG
QPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLTYWKSSSSG
KKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
IFYIIGAVVFVVIILVILAILSLH.

I. Uso del FT lipidado en el tratamiento tópico de hemorragias

Los inventores han encontrado, sorprendentemente, que el FT lipidado aumenta la actividad proteolítica del FXa y, en consecuencia, la producción de trombina [véase el apartado 1 de los Resultados del Ejemplo que acompaña a esta descripción]. Los inventores también han observado que el FT lipidado coagula el plasma y la sangre de sujetos sanos y de pacientes deficitarios en factores de coagulación, incluyendo deficitarios en FV, FVII, FVIII, FIX,

FX, FXI, FXII y FXIII, así como en pacientes con anticoagulación (mediante tratamientos anticoagulantes con fármacos como heparina, heparinas de bajo peso molecular o derivados de coumarínicos, siendo estos ejemplos no limitativos) tanto *in vitro* [véanse apartados 1 a 5 de los Resultados del Ejemplo que acompaña a esta descripción] como *in vivo* [véanse apartados 6 y 7 de los Resultados del Ejemplo que acompaña a esta descripción]. Además, los inventores han encontrado que el FT lipiado coagula la sangre de pacientes afectados por alteraciones plaquetarias [véase el apartado 5 de los Resultados del Ejemplo que acompaña a esta descripción]. Estos resultados ponen de manifiesto que el FT lipiado es un agente antihemorrágico útil para el tratamiento tópico de hemorragias en un sujeto.

10 Teniendo en cuenta el estado de la técnica, no resulta obvio pensar en el FT como un tratamiento individual tópico procoagulante en sujetos sanos o pacientes hemofílicos (deficientes en FVIII, FIX y FXI), con la condición que:

- (i) el FT lipiado no es un FT de mamífero recombinante o un fragmento funcional del mismo obtenido de plantas transgénicas, y
 15 (ii) el FT lipiado no es un FT lipiado que tiene un 70% de PC y un 30% de PS y que comprende un FT producido en *E. coli* que tiene la secuencia

20
 SGTNTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTD
 TECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLG
 QPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSG
 KKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
 IFYIIGAVVFFVVIILVILAILSLH.

25 Era improbable pensar en pacientes deficientes en FVII porque el complejo FT-FVII no puede ensamblarse; en pacientes deficientes en FV o FX porque el complejo protrombina no puede ensamblarse; y en pacientes heparinizados porque la trombina y FXa están bloqueados por antitrombina III, y en pacientes tratados con warfarina porque la síntesis de todos los factores de coagulación dependientes de vitamina K (FVII, FIX y FX) están inhibidas.

Por tanto, en un aspecto, la invención va dirigida al uso del FT lipiado, o un fragmento funcional del mismo lipiado, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento tópico de hemorragias en un sujeto, con la condición que:

- 30 (i) el FT lipiado no es un FT de mamífero recombinante o un fragmento funcional del mismo obtenido de plantas transgénicas, y
 (ii) el FT lipiado no es un FT lipiado que tiene un 70% de PC y un 30% de PS y que comprende un FT producido en *E. coli* que tiene la secuencia

35
 SGTNTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTD
 TECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLG
 QPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSG
 KKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
 40 IFYIIGAVVFFVVIILVILAILSLH.

El FT es una glicoproteína integral de membrana ampliamente distribuida en el reino animal. La proteína FT presenta una estructura en dominios, es decir, es una proteína con regiones funcionales independientes. Cada uno de los dominios de la apoproteína del FT humano presenta unas características estructurales y funcionales únicas: (1) un péptido señal o una región con una secuencia líder de 32 aminoácidos que se procesa post-traduccionalmente al procesarse la proteína de la forma inmadura a la forma madura; (2) un dominio extracelular hidrofílico N-glicosilado que comprende aproximadamente 219 aminoácidos terminales; (3) un fragmento de aproximadamente 23 aminoácidos, principalmente hidrófobos, que se cree son los aminoácidos del dominio transmembrana; y (4) el extremo carboxilo de 21 aminoácidos, que se cree son los aminoácidos que forman parte del fragmento citoplasmático de la proteína. Esta estructura en dominios que presenta la proteína del FT humano permite la producción de, por ejemplo, el dominio extracelular de la proteína o fragmentos funcionales de la misma. La secuencia de aminoácidos de la proteína del FT humano es conocida y puede ser consultada en bases de datos de proteínas tales como, por ejemplo, NCBI (FT humano, N° de acceso: P13726).

El término "FT lipiado", tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier fuente de FT, siendo este FT total o parcialmente insertado en vesículas lipídicas o membranas celulares. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de fuentes de "FT lipiado" son: extractos que contienen FT lipiado (cuyo aislamiento puede llevarse a cabo a partir de varios tejidos como cerebral, placenta y tejido pulmonar, tejido de diferentes animales tales como ovejas, vacas, conejos, perros, seres humanos, etc.); componente proteico de FT purificado y (re)lipiado (purificado a partir de un extracto o a partir de un FT recombinante), es decir, que se le ha añadido el componente lipídico tras su purificación y que puede prepararse, a modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo, según el protocolo descrito previamente por Morrisey [véase el Ejemplo que acompaña a esta descripción]. En dicho protocolo, el FT no lipiado se incorpora dentro de vesículas de fosfolípidos usando un detergente no iónico, tal como por ejemplo, N-octil-beta-D-glucopiranosido. Los lípidos que pueden ser utilizados en el FT lipiado según la invención pueden tener cualquier origen (animal, vegetal

- o sintético). Prácticamente cualquier lípido puede ser utilizado en la elaboración del FT lipidado de la presente invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de lípidos que pueden utilizarse en la elaboración del FT lipidado incluyen fosfolípidos (tales como fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, etc.) esfingolípidos (tales como ceramida, esfingosina-1-fosfato, ceramida inositolfosfato, ceramida manosil-inositolfosfato, ceramida manosil-diinositolfosfato, etc.), fosfatidilinositol (tales como L- α -fosfatidilinositol, L- α -lisofosfatidilinositol, etc.) y fosfatos de fosfatidilinositol (tales como L- α -[fosfatidilinositol-4-fosfato], 1,2-dioctanol-sn-glicero-3-[fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato], etc.). La relación (molar, ponderal o volumétrica) componente proteico del FT: lípido puede variar en un amplio intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 1:50.000 a 1:3.000 aproximadamente.
- 10 El término FT, tal como aquí se utiliza incluye variantes y mutantes del FT tipo salvaje que mantienen, al menos, una de las funciones del FT tipo salvaje, ventajosamente, al menos una de las funciones del FT tipo salvaje relacionadas con la coagulación.

- En una realización particular, el FT lipidado utilizado para la puesta en práctica de la invención es FT humano lipidado y consiste en el FT obtenido a partir de extractos de tejido; o consiste en el componente proteico purificado de extractos de tejido e insertados en un componente lipídico (con una relación molar proteína:lípido de alrededor de 1:8700; o consiste en FT recombinante (FTr) obtenido por un proceso como el descrito, solo como ejemplo ilustrativo, pero no limitativo, en la patente US 6.261.803. La obtención de extractos y purificación del FT puede realizarse a partir de varios tejidos tal como, cerebro, placenta y pulmón, y de diferentes animales, tales como, oveja, 20 ternera, conejo, perro, humanos, etc.

- El término "fragmento funcional del FT lipidado" tal como se utiliza en esta descripción incluye, aunque no se limita a, derivados peptídicos del FT, en particular, del componente proteico del FT, incluyendo mutantes y variantes del componente proteico del FT tipo salvaje, que mantienen una o más de las funciones del FT, preferentemente 25 funciones relacionadas con la coagulación, por ejemplo la capacidad de unirse al FXa y/o a SICN y desarrollar su función antihemorrágica y formadora de vasos durante la cicatrización de heridas. La secuencia de aminoácidos de dicho fragmento funcional de FT puede ser idéntica a la de un fragmento del componente proteico del FT tipo salvaje o puede presentar inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos, con la condición de que conserven al menos una de las funciones del FT tipo salvaje, ventajosamente, al menos una función relacionada con la coagulación. Por simplicidad, el término "FT lipidado", tal como aquí se utiliza, incluye cualquier fragmento 30 funcional del FT lipidado.

- El componente proteico del FT utilizado en la puesta en práctica de la presente invención puede, además, formar parte de una proteína de fusión. En este sentido, dicha proteína de fusión puede contener una región A, constituida 35 por la proteína de FT o por un fragmento funcional de dicha proteína de FT, unida a una región B constituida por otro fragmento del FT. Dicha región B está unida a la región amino-terminal de dicha proteína del FT o de dicho fragmento de la proteína de FT, o bien, alternativamente, dicha región B puede estar unida a la región carboxilo-terminal de dicha proteína de FT o de dicho fragmento de la proteína del FT. Ambas regiones A y B pueden estar unidas directamente o a través de un polipéptido espaciador (linker) entre dichas regiones A y B. La proteína de 40 fusión puede obtenerse bien por síntesis química o bien mediante la expresión génica de la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión en células hospedadoras apropiadas.

- El término "tratamiento tópico", tal como aquí se utiliza, se refiere a la aplicación del tratamiento directamente en el lugar donde es necesario, por ejemplo, en secciones discontinuas de la piel (cortes, etc.), y de tejido vascular 45 (ruptura de vasos, etc.).

- De acuerdo con la presente invención, y tal como se demuestra en el Ejemplo que acompaña a la presente descripción, el FT lipidado actúa como estimulador del FXa, aumentando su actividad proteolítica, y, en consecuencia, la producción de trombina y, por tanto, puede ser utilizado para tratar o corregir trastornos 50 hemorrágicos, en particular, aquellas alteraciones hemorrágicas asociadas con la diátesis hemorrágica.

- El término "diátesis hemorrágica" se refiere al proceso que causa una alteración en la hemostasia y que, como consecuencia de ello, da lugar a la aparición de un síndrome hemorrágico que puede cursar, en ocasiones, con sangrados prolongados y excesivos. La diátesis hemorrágica puede ser producida por una coagulopatía congénita o 55 adquirida y/o por una alteración plaquetaria congénita o adquirida.

- El término "coagulopatía" se refiere a una alteración de los factores de la coagulación. Esta alteración puede ser debida a una deficiencia o carencia específica de un factor de coagulación específico, cuya consecuencia será la aparición de un síndrome hemorrágico, o por una alteración en un factor de la coagulación. En general, la 60 coagulopatía puede ser una coagulopatía congénita o una coagulopatía adquirida.

Como ejemplos ilustrativos, no limitativos, de coagulopatías congénitas pueden citarse las deficiencias en factores de coagulación seleccionados de FV, FVII, FVIII FIX, FX, FXII, FXIII y sus combinaciones.

Las coagulopatías adquiridas pueden tener diversos orígenes. Ejemplos ilustrativos incluyen déficit de síntesis de factores de coagulación en la insuficiencia hepática grave, terapia anticoagulante (tal como heparina, heparinas de bajo peso molecular, warfarina, derivados de coumarina, dicoumarinas, etc.). Un mecanismo alternativo se basa en un consumo exagerado de los factores de coagulación de manera que ante una lesión sangrante no se dispone de ellos para formar el coágulo. Este mecanismo se da en el síndrome de coagulación intravascular diseminada o coagulopatía por consumo que aparece en múltiples enfermedades tales como en sepsis severa que daña el endotelio de la microcirculación activando las plaquetas y los factores de la coagulación con formación de múltiples microtrombos; en la invasión sanguínea por FT tal como en el desprendimiento placentario; en la retención de un feto muerto; en los politraumatismos con aplastamiento de tejidos; en las mordeduras de serpientes venenosas, etc. En las vasculitis, el daño parietal y endotelial libera activadores de la coagulación. El consumo de factores de coagulación se ve agravado por la lisis de la fibrina de numerosos microtrombos por acción de la plasmina con liberación de PDF que son antiplaquetarios y anticoagulantes.

15 El término “alteración plaquetaria” se refiere a una alteración, tanto en el número como en la funcionalidad, de las plaquetas, cuya consecuencia es la aparición de un síndrome hemorrágico. Dicha alteración plaquetaria puede ser congénita o adquirida.

En una realización particular, dicha alteración plaquetaria es una alteración plaquetaria congénita. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de alteraciones plaquetarias congénitas incluyen la enfermedad de Glanzmann, el síndrome de Bernard Soulier, el síndrome de Bolin-Jamieson, el síndrome de Wiskott-Aldrich, el síndrome de Paris-Trousseau-Jacobsen, la trombocitopenia del cromosoma X, el síndrome plaquetario de Gray, el síndrome de Sebastián y la anemia de Fanconi.

25 En otra realización particular, dicha alteración plaquetaria es una alteración plaquetaria adquirida. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de alteraciones plaquetarias adquiridas incluyen trastornos mieloproliferativos, tales como trombocitemia, policitemia, leucemia mielocítica crónica, etc.; en la metaplasia mieloide existen trastornos funcionales de las plaquetas con aumento del tiempo de sangrado, defectos de retención en perlas de vidrio, defecto de agregación plaquetaria, liberación anormal y defecto del factor III plaquetario. Se han hallado defectos funcionales plaquetarios en las disproteinemias en el escorbuto, y en la enfermedad cardíaca congénita y en la cirrosis.

El término “coagulopatía adquirida” y “alteración plaquetaria adquirida” se refieren al origen de la alteración, que puede ser iatrogénica o secundaria a otra enfermedad.

35 El término “sujeto”, tal como aquí se utiliza, incluye a cualquier miembro de una especie animal, incluida la especie humana; a modo ilustrativo, no limitativo, dicho sujeto puede ser un mamífero, tal como un primate, un animal doméstico, un roedor, etc., preferentemente, dicho sujeto es un hombre o una mujer de cualquier edad y raza. En una realización particular, dicho sujeto es un ser humano sin historial de alteraciones de la hemostasia, tal como un individuo que no presenta coagulopatías ni alteraciones plaquetarias. En otra realización particular, dicho sujeto es un ser humano que presenta una historial de alteraciones de la hemostasia, tal como un individuo que presenta una diátesis hemorrágica, por ejemplo, una coagulopatía, tal como una coagulopatía congénita o adquirida, o bien una alteración plaquetaria, tal como una alteración plaquetaria congénita o adquirida.

45 Por tanto, en una realización concreta, la invención se relaciona con el uso del FT lipidado, con la condición que:
 (i) el FT lipidado no es un FT de mamífero recombinante o un fragmento funcional del mismo obtenido de plantas transgénicas, y
 (ii) el FT lipidado no es un FT lipidado que tiene un 70% de PC y un 30% de PS y que comprende un FT producido en *E. coli* que tiene la secuencia

50
 SGTNTNTVAAYNLTWKSTNFKTI LEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTD
 TECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLG
 QPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSG
 KKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVSVQAVIPSRVTNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
 55
 IFYIIGAVVFWVIIILVILAI SLH.

en la elaboración de un medicamento para el tratamiento tópico de hemorragias en un ser humano sin historia de alteraciones de la hemostasia. En otra realización particular, la invención se relaciona con el uso del FT lipidado, con la condición que:

60 (i) el FT lipidado no es un FT de mamífero recombinante o un fragmento funcional del mismo obtenido de plantas transgénicas, y
 (ii) el FT lipidado no es un FT lipidado que tiene un 70% de PC y un 30% de PS y que comprende un FT producido en *E. coli* que tiene la secuencia

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTI LEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTD
 TECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLG
 QPTIQSFEQVGTKNVNTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLTYWKSSSSG
 KKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
 IFYIIGAVVFVVIILVILAI SLH.

en la elaboración de un medicamento para el tratamiento tópico de hemorragias en un ser humano que presenta una diátesis hemorrágica.

Para su administración al sujeto, el FT lipiado se formulará en una forma farmacéutica adecuada para su administración por vía tópica para el tratamiento tópico (local) de hemorragias. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas formas farmacéuticas incluyen aerosoles, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, pomadas, cremas, apósitos, parches, ungüentos, colutorios, etc. Para ello, la formulación farmacéutica que comprende FT lipiado incluirá los portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la elaboración de la forma farmacéutica de administración elegida (para una mayor información véase el apartado relativo a la "Composición farmacéutica" de la presente descripción).

La dosis de FT lipiado a administrar al sujeto puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre 0,01 µg de proteína activa/ml y 100 µg de proteína activa/ml aproximadamente. La dosis de FT lipiado a administrar dependerá de numerosos factores, entre los que se incluyen las características de la proteína FT empleada, como por ejemplo, su actividad y vida media biológica, la concentración de la proteína FT en la formulación, la situación clínica del sujeto o paciente, el trastorno hemorrágico a tratar, etc. (para una mayor información véase el apartado relativo a la "Composición farmacéutica" de la presente descripción).

II. Productos de combinación y aplicaciones

II.1 FT lipiado + FXa

Como es conocido, en la vía extrínseca de la coagulación sanguínea el FT se une al FVII/FVIIa circulante para formar el complejo FT::FVII y, en presencia de calcio, actuar como sustrato para que tenga lugar la activación de FX. La activación de la vía extrínseca implica la interacción de FT con su ligando, el FVII/FVIIa. Este complejo, FT::FVIIa actúa como sustrato para que tenga lugar la activación de FX por FVIIa. Ahora, los inventores, sorprendentemente, han descubierto que el FT lipiado junto al FXa, incluso en sujetos deficientes en FVII, induce la coagulación, de forma que el FT lipiado actúa como estimulador del FXa, permitiendo que esta serinproteasa inicie la hidrólisis de la protrombina, produzca trombina, y tenga lugar el origen de la coagulación. Tal como aquí se utiliza, "FXa" se refiere a una proteína, en particular, una serinproteasa que, en su forma activa, es la encargada de iniciar la hidrólisis de la protrombina y, en consecuencia, dar lugar al inicio de la coagulación. Esta proteólisis es efectuada por el FXa que se une a la superficie de las plaquetas activadas y, en presencia del FVa y calcio iónico, hidroliza la protrombina.

De forma más concreta, los inventores, sorprendentemente, han encontrado que la combinación de FT lipiado y FXa, incluso a concentraciones tan bajas de FXa que por sí mismas son incapaces de inducir la coagulación, coagula el plasma [véanse, por ejemplo, los apartados 1 (1.5) y 2 de los Resultados del Ejemplo que acompaña a esta descripción].

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un producto que comprende (i) FT lipiado y (ii) FXa. Dicho producto, a partir de los resultados mencionados previamente, puede ser utilizado como medicamento, en particular, puede ser utilizado en el tratamiento de hemorragias, por ejemplo, en el tratamiento tópico de hemorragias, en un sujeto. Dichos componentes (i) y (ii) pueden estar juntos o separados. En una realización particular, el FT lipiado utilizado en la preparación de este producto es FT humano lipiado.

En una realización particular, la invención proporciona un producto que comprende (i) FT lipiado y (ii) FXa. Ambos componentes pueden combinarse y estar juntos en la misma composición antes de su administración al sujeto.

En otra realización particular, la invención proporciona un producto que comprende, por separado, (i) FT lipiado y (ii) FXa. En otra realización particular, la invención proporciona un producto que comprende, por separado, (i) FT lipiado y (ii) FXa, como combinación para su administración simultánea o sucesiva a un sujeto. La administración combinada de dichos componentes (i) y (ii) al sujeto puede llevarse a cabo de forma simultánea o secuencial, separada en el tiempo, en cualquier orden, es decir, puede administrarse primero el FT lipiado y, a continuación, FXa, o viceversa. Alternativamente, dichos FT lipiado y FXa pueden administrarse simultáneamente.

Para su administración a un sujeto el producto definido previamente se formulará en una forma farmacéutica de administración, preferentemente, una forma farmacéutica de administración adecuada para su administración tópica,

para lo cual se incorporarán los excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la elaboración de la forma farmacéutica de administración deseada. Información sobre dichos portadores y excipientes, así como sobre dichas formas de administración adecuadas para la administración de dicho producto de la invención puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Para una mayor información véase el apartado relativo a la 5 "Composición farmacéutica" de la descripción.

La dosis de FT lipiado y de FXa a administrar al sujeto puede variar dentro de un amplio intervalo. A modo ilustrativo, la dosis de FT lipiado a administrar puede estar comprendida entre aproximadamente 0,01 µg de proteína activa/ml y 100 µg de proteína activa/ml. Asimismo, a modo ilustrativo, la dosis de FXa a administrar puede 10 estar comprendida entre aproximadamente 17 pM y 17 nM (0,001 µg de proteína activa/ml y 10 µg de proteína activa/ml). En general, las dosis de FT lipiado y de FXa a administrar dependerán de numerosos factores, entre los que se incluyen las características de la proteína de FT empleada y del FXa, tales como por ejemplo, su actividad y vida media biológica, la concentración de la proteína del FT y del FXa en la formulación, la situación clínica del sujeto o paciente, el trastorno hemorrágico a tratar, etc. (para una mayor información véase el apartado relativo a la 15 "Composición farmacéutica" de la presente descripción).

La relación ponderal entre el FT lipiado y el FXa presente en dicho producto puede variar dentro de un amplio intervalo; a modo ilustrativo, dicha relación ponderal FT lipiado:FXa está comprendida entre 10²:1 y 10:1, aunque también son posibles otras relaciones ponderales; en una realización particular, dicho producto de la invención 20 comprende FT lipiado y FXa en una relación ponderal de 1 a 0,001, es decir por cada miligramo de proteína FT hay presente en la mezcla 1 microgramo de proteína FXa.

El uso del producto previamente definido como medicamento, en concreto, el uso de dicho producto en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de hemorragias en un sujeto, especialmente, para el tratamiento 25 tópico de hemorragias en un sujeto, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

II.2 FT lipiado + SICN

Los inventores también han encontrado, sorprendentemente, que la combinación de FT lipiado y superficies 30 inorgánicas cargadas negativamente (SICN) coagula el plasma y la sangre de sujetos sanos y pacientes de deficitarios en factores de coagulación tanto *in vitro* [véase los apartados 1 (1.4), 2 (2.2), 3 (3.4), 4 (4.2) y 5 (5.2 y 5.4) de los Resultados del Ejemplo que acompaña a esta descripción] como *in vivo* [véanse el apartado 6.1 de los Resultados del Ejemplo que acompaña a esta descripción].

El término "superficie inorgánica cargada negativamente" o "SICN" tal y como se utiliza en esta descripción, está constituido por una mezcla de lípidos y aceleradores de la coagulación sanguínea, tales como ácido eláxico, zeolita, sílice, materiales oxido inorgánicos, etc. Los lípidos tienen carga neta negativa, lo que significa que la mezcla lipídica puede incluir lípidos neutros o zwitteriónicos, pero debe contener una cierta cantidad de lípidos cargados negativamente que confiera carácter aniónico a la mezcla. Un ejemplo ilustrativo, no limitativo, de lípidos cargados 40 negativamente pueden ser los esfingolípidos (tales como ceramida-1-fosfatos, fosfatidiletanolamina glicosilado, sulfatidos hidroxilados o no hidroxilados, gangliósidos, etc.) y lípidos basados en glicerol (tales como fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, fosfatidilinositol fosfatos, ácidos fosfatídicos, fosfatidilgliceroles, cardiolipinas). En la presente solicitud de patente, los productos comerciales Dade® Actin® (Dade Behring, marca) fueron utilizados como fuente de SICN.

45 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un producto que comprende (i) FT lipiado y (ii) una SICN. Dicho producto, a partir de los resultados mencionados previamente, puede ser utilizado como medicamento, en particular, puede ser utilizado en el tratamiento de hemorragias, por ejemplo, en el tratamiento tópico de hemorragias, en un sujeto. Dichos componentes (i) y (ii) pueden estar juntos o separados.

50 En una realización particular, la invención proporciona un producto que comprende (i) FT lipiado y (ii) una SICN. Ambos componentes pueden combinarse y estar juntos en una misma composición antes de su administración al sujeto.

55 En otra realización particular, la invención proporciona un producto que comprende, por separado, (i) FT lipiado y (ii) SICN. En otra realización particular, la invención proporciona un producto que comprende, por separado, (i) FT lipiado y (ii) SICN, como combinación para su administración simultánea o sucesiva a un sujeto. La administración combinada de dichos componentes (i) y (ii) al sujeto puede llevarse a cabo de forma simultánea o secuencial, separada en el tiempo, en cualquier orden, es decir, puede administrarse primero el FT lipiado y, a continuación, la 60 SICN, o viceversa. Alternativamente, dichos FT lipiado y SICN pueden administrarse simultáneamente.

Para su administración a un sujeto el producto definido previamente se formulará en una forma farmacéutica de administración, preferentemente, una forma farmacéutica de administración adecuada para su administración tópica,

para lo cual se incorporarán los excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la elaboración de la forma farmacéutica de administración deseada. Información sobre dichos portadores y excipientes, así como sobre dichas formas de administración adecuadas para la administración de dicho producto de la invención puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Para una mayor información véase el apartado relativo a la
5 “Composición farmacéutica” de la presente descripción.

La dosis de FT lipiado y SICN a administrar al sujeto puede variar dentro de un amplio intervalo. A modo ilustrativo, la dosis de FT lipiado a administrar puede estar comprendida entre aproximadamente 0,01 µg de proteína activa/ml y 100 µg de proteína activa/ml. Asimismo, a modo ilustrativo, la dosis de SICN (en volumen) a administrar puede
10 estar comprendida entre aproximadamente 0,1 y 100 µl por cada µg de FT lipiado activado. En general las dosis de FT lipiado SICN a administrar dependerán de numerosos factores, incluyendo las características de la proteína FT usada y la SICN, tales como por ejemplo, su actividad y vida media biológica, la concentración de la proteína del FT y SICN en la formulación, la situación clínica del sujeto o paciente, el trastorno hemorrágico a tratar, etc. (para una mayor información véase el apartado relativo a la “Composición farmacéutica” de la presente descripción).

15 La relación peso/volumen (w/v) de FT lipiado y SICN presentes en dicho producto puede variar dentro de un amplio intervalo; a modo ilustrativo dicha relación w/v de FT lipiado:SICN está comprendida entre 1:1 y 1:10⁶, aunque otras relaciones w/v también son posibles; en una realización particular, dicho producto de la invención comprende entre 0,1 y 100 µl de SICN por cada µg de proteína activa de FT lipiado.

20 El uso del producto previamente definido como un medicamento, específicamente el uso de dicho producto en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de hemorragias en un sujeto, particularmente para el tratamiento tópico de hemorragias en un sujeto, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

25 II.3 FT lipiado + FXa + SICN

Los inventores sorprendentemente también han descubierto que la combinación de FT lipiado, FXa y SICN coagula el plasma y la sangre de sujetos sanos y de pacientes deficientes en factores de coagulación *in vitro* [véase los apartados 1 (1.6) y 2 (2.2) de los resultados de los Ejemplos incluidos en esta descripción].

30 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un producto que comprende (i) FT lipiado, (ii) FXa y (iii) SICN. Basado en los resultados previamente mencionados, dicho producto puede usarse como un medicamento, y puede usarse de forma particular en el tratamiento de hemorragias, por ejemplo, en el tratamiento tópico de hemorragias, en un sujeto. Dichos componentes (i), (ii) y (iii) pueden estar juntos o separados. Alternativamente, dos
35 de los componentes pueden estar juntos, por ejemplo, (i) + (ii), (i) + (iii) o (ii) + (iii), y el tercer componente separado.

En una realización particular, la invención proporciona un producto que comprende (i) FT lipiado, (ii) FXa y (iii) SICN. Dichos componentes pueden combinarse y estar juntos en la misma composición antes de su administración al sujeto.

40 En otra realización particular, la invención proporciona un producto que comprende, de forma separada, (i) FT lipiado, (ii) FXa y (iii) SICN. En otra realización particular la invención proporciona un producto que comprende, de forma separada, (i) FT lipiado, (ii) FXa y (iii) SICN, como una combinación para su administración simultánea o sucesiva a un sujeto. La administración combinada de dichos componentes (i), (ii) y (iii) al sujeto puede llevarse a
45 cabo simultáneamente o secuencialmente, separada en el tiempo, en cualquier orden, es decir, pueden administrarse primero el FT lipiado, después el FXa y entonces la SICN, o primero el FT lipiado, después la SICN y entonces el FXa, o primero el FXa, después el FT lipiado y entonces la SICN; o primero el FXa, después la SICN y luego el FT lipiado, o primero SICN, después FXa y a continuación FT lipiado; o primero la SICN, después el FT lipiado y luego el FXa. Alternativamente, dos cualquiera de dichos componentes pueden mezclarse en la misma
50 composición y administrarse juntos mientras que el tercero puede añadirse antes o después de dicha composición de componentes binaria. En otra realización alternativa dicho FT lipiado, FXa y SICN se administran simultáneamente.

Para su administración a un sujeto, el producto definido previamente será formulado en una forma de administración
55 farmacéutica, preferiblemente una forma de administración farmacéutica apropiada para su administración tópica, para la cual se incorporarán los portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de la forma de administración farmacéutica deseada. Información sobre dichos portadores y excipientes, así como sobre dichas formas de administración apropiadas para la administración de dicho producto de la invención, pueden encontrarse en los tratados de farmacia galénica. Para más información véase el apartado
60 relacionado con la “Composición Farmacéutica” de esta descripción.

La dosis de FT lipiado, FXa y SICN a administrar a un sujeto puede variar dentro de un amplio rango. A modo ilustrativo, la dosis a administrar de FT lipiado puede estar comprendida entre aproximadamente 0,01 µg de

proteína activa/ml y 100 µg de proteína activa/ml. También, a modo ilustrativo, la dosis a administrar de FXa puede estar comprendida entre alrededor de 17 pM y 170 pM (0,001 µg de proteína y 10 µg de proteína/ml). Adicionalmente, a modo ilustrativo, la dosis de SICN (en volumen) a ser administrada puede estar comprendida entre aproximadamente 0,1 y 100 µl por cada µg de proteína activa de FT lipidado. En general, las dosis de FT lipidado, FXa y SICN a administrar dependerán de numerosos factores, entre los que se incluyen las características de la proteína de FT, el FXa y la SICN empleadas, tales como por ejemplo, su actividad y vida media biológica, la concentración de la proteína del FT, FXa y SICN en la formulación, la situación clínica del sujeto o paciente, el trastorno hemorrágico a tratar, etc. (para una mayor información véase el apartado relativo a la "Composición farmacéutica" de la presente descripción).

10

La relación ponderada entre el FT lipidado, el FXa y la SICN presente en dicho producto puede variar dentro de un amplio intervalo tal como se ha mencionado previamente en los apartados II.1 y II.2; no obstante, en una realización particular, dicho producto de la invención comprende FT lipidado:FXa:SICN en una relación 1:0,001:100 (w:w:v).

15 El uso del producto previamente definido como medicamento, en concreto, el uso de dicho producto en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de hemorragias en un sujeto, especialmente, para el tratamiento tópico de hemorragias en un sujeto, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

III. Complejos y aplicaciones

20

III.1 Complejo FT::FXa

Como se ha mencionado previamente (véase el apartado II.1 de esta descripción), los inventores han encontrado que la combinación de FT lipidado y FXa, incluso a concentraciones tan bajas de FXa que por sí mismas eran incapaces de inducir la coagulación, coagula el plasma. Aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría, se cree que la administración, conjunta o separada (en cualquier orden), de dichos FT lipidado y FXa da lugar a la formación de un complejo capaz de ejercer el efecto terapéutico (antihemorrágico, en particular, antihemorrágico tópico) observado en el lugar donde debe ejercer dicho efecto terapéutico.

30 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un complejo, identificado como FT::FXa en esta descripción, que comprende FT lipidado y FXa. Aunque por simplicidad se representa dicho complejo como FT::FXa, en la realidad, dicho complejo podría estar formado por diversas unidades de cada uno de dichos componentes; todas estas posibilidades caen dentro del ámbito de la invención. Dicho complejo, la vista de los resultados mencionados previamente, puede ser utilizado como medicamento, en particular, puede ser utilizado en el tratamiento de hemorragias, por ejemplo, en el tratamiento tópico de hemorragias, en un sujeto. En una realización particular, el FT lipidado utilizado en la elaboración de este complejo es FT humano lipidado.

Para su administración a un sujeto, el producto definido previamente se formulará en una forma farmacéutica de administración, preferentemente, una forma farmacéutica de administración adecuada para su administración tópica, para lo cual se incorporarán los excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la elaboración de la forma farmacéutica de administración deseada. Información sobre dichos portadores y excipientes, así como sobre dichas formas de administración adecuadas para la administración de dicho producto de la invención puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Para una mayor información véase el apartado relativo a la "Composición farmacéutica" de la presente descripción.

45

Las dosis de FT lipidado y FXa presentes en dicho complejo a ser administrado al sujeto pueden variar dentro de un amplio intervalo. En general, dichas dosis corresponden a las dosis mencionadas previamente en el apartado II.1 relacionado con un producto que comprende FT lipidado y FXa.

50 La relación ponderal entre el FT lipidado y el FXa presente en dicho complejo FT::FXa puede variar dentro de un amplio intervalo; si bien, en general, corresponde a la mencionada previamente en el apartado II.1 relacionado con un producto que comprende FT lipidado y FXa.

El uso del complejo previamente definido como medicamento, en concreto, el uso de dicho complejo en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de hemorragias en un sujeto, especialmente, para el tratamiento tópico de hemorragias en un sujeto, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

III.2 Complejo FT::SICN

60 Como se ha mencionado previamente (véase el apartado II.2 de esta descripción), los inventores han encontrado que la combinación de FT lipidado y SICN coagula el plasma y la sangre en sujetos sanos y en pacientes deficitarios en factores de coagulación tanto *in vitro* e *in vivo*. Aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría, se cree que la administración, conjunta o separada (en cualquier orden), de dichos FT lipidado y SICN da lugar a la formación de

un complejo capaz de ejercer el efecto terapéutico (antihemorrágico, en particular, antihemorrágico tópico) observado en el lugar donde debe ejercer dicho efecto terapéutico.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un complejo, identificado como FT::SICN en esta descripción, que comprende FT lipidado y una SICN. Aunque por simplicidad se representa dicho complejo como FT::SICN, en la realidad, dicho complejo podría estar formado por diversas unidades de cada uno de dichos componentes; todas esas posibilidades caen dentro del ámbito de la invención. Dicho complejo, a la vista de los resultados mencionados previamente, puede ser utilizado como medicamento, en particular, puede ser utilizado en el tratamiento de hemorragias, por ejemplo, en el tratamiento tópico de hemorragias, en un sujeto. En una realización particular, el FT lipidado utilizado en la elaboración de este complejo es FT humano lipidado.

Para su administración a un sujeto el producto definido previamente se formulará en una forma farmacéutica de administración, preferentemente, una forma farmacéutica de administración adecuada para su administración por vía tópica, para lo cual se incorporarán los excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la elaboración de la forma farmacéutica de administración deseada. Información sobre dichos portadores y excipientes, así como sobre dichas formas de administración adecuadas para la administración de dicho producto de la invención puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Para una mayor información véase el apartado relativo a la "Composición farmacéutica" de la presente descripción.

Las dosis de FT lipidado y SICN presentes en dicho complejo a ser administrado al sujeto pueden variar dentro de un amplio intervalo. En general, dichas dosis corresponden a las dosis mencionadas previamente en el apartado II.2 relacionado con un producto que comprende la combinación de FT lipidado y SICN.

La relación w/v entre el FT lipidado y la SICN presente en dicho complejo FT::SICN puede variar dentro de un amplio intervalo; si bien, en general, corresponde a la mencionada previamente en el apartado II.2 relacionado con un producto que comprende FT lipidado y SICN.

El uso del complejo previamente definido como medicamento, en concreto, el uso de dicho complejo en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de hemorragias en un sujeto, especialmente, para el tratamiento tópico de hemorragias en un sujeto, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

III.3 Complejo FT lipidado::FXa::SICN

Como se ha mencionado previamente (véase el apartado II.3 de esta descripción), los inventores han encontrado que la combinación de FT lipidado, FXa y SICN coagula el plasma. Aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría, se cree que la administración, conjunta o separada (en cualquier orden), de dichos FT lipidado, FXa y SICN da lugar a la formación de un complejo capaz de ejercer el efecto terapéutico (antihemorrágico, en particular, antihemorrágico tópico) observado en el lugar donde debe ejercer dicho efecto terapéutico. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un complejo, identificado como FT::FXa::SICN en esta descripción, que comprende FT lipidado, FXa y una SICN. Aunque por simplicidad se representa dicho complejo como FT::FXa::SICN, en la realidad, dicho complejo podría estar formado por diversas unidades de cada uno de dichos componentes, así como por cualquier posibilidad de interacciones entre dichos componentes, por ejemplo, FT::SICN:FXa, FXa::SICN::FT, FXa::FT::SICN, SICN::FT::FXa o SICN::FXa::FT; todas esas posibilidades caen dentro del ámbito de la invención. Dicho complejo, a la vista de los resultados mencionados previamente, puede ser utilizado como medicamento, en particular, puede ser utilizado en el tratamiento de hemorragias, por ejemplo, en el tratamiento tópico de hemorragias, en un sujeto. En una realización particular, el FT lipidado utilizado en la elaboración de este complejo es FT humano lipidado.

Para su administración a un sujeto el complejo definido previamente se formulará en una forma farmacéutica de administración, preferentemente, una forma farmacéutica de administración adecuada para su administración por vía tópica, para lo cual se incorporarán los excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la elaboración de la forma farmacéutica de administración deseada. Información sobre dichos portadores y excipientes, así como sobre dichas formas de administración adecuadas para la administración de dicho producto de la invención puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Para una mayor información véase el apartado relativo a la "Composición farmacéutica" de la presente descripción.

El FT lipidado, FXa y SICN presentes en dicho complejo a administrar al sujeto puede variar dentro de un amplio intervalo. En general, dichas dosis corresponden a las dosis mencionadas previamente en el apartado II.3 relacionado con un producto que comprende la combinación de FT lipidado, FXa y SICN.

La relación entre el FT lipidado, el FXa y la SICN presente en dicho complejo FT::FXa::SICN puede variar dentro de un amplio intervalo; si bien, en general, corresponde a la mencionada previamente en II.3 relacionado con un producto que comprende FT lipidado, FXa y SICN.

El uso del complejo previamente definido como medicamento, en concreto, el uso de dicho complejo en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de hemorragias en un sujeto, especialmente, para el tratamiento tópico de hemorragias en un sujeto, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

5

IV. Composición farmacéutica

Como se ha mencionado previamente, puede ser utilizado el FT lipidado con la condición que:

- 10 (i) el FT lipidado no es un FT de mamífero recombinante o un fragmento funcional del mismo obtenido de plantas transgénicas, y
 (ii) el FT lipidado no es un FT lipidado que tiene un 70% de PC y un 30% de PS y que comprende un FT producido en E. coli que tiene la secuencia

15

```
SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTD
TECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLG
QPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSG
KKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
IFYIIGAVVFWVIIILVILAISLH.
```

20 como agente antihemorrágico, en particular, como agente antihemorrágico para aplicación tópica. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, en adelante, composición farmacéutica de la invención, que comprende un FT lipidado junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el FT lipidado es FT humano lipidado.

25 Para su administración a un sujeto, del producto previamente definido será formulado en una forma farmacéutica de administración, preferiblemente una forma farmacéutica de administración adecuada para su administración tópica, para lo cual se incorporarán los excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la elaboración de la forma farmacéutica de administración deseada. Información sobre dichos portadores y excipientes, así como sobre dichas formas de administración adecuadas para la administración del producto de la invención puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de
 30 administración de fármacos, en general, y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Aunque se podrían utilizar diversas formas farmacéuticas de administración del FT lipidado, en la práctica resulta ventajoso administrar dicho compuesto por vía tópica, por lo que dicho FT lipidado se formulará en una forma
 35 farmacéutica adecuada para su administración por vía tópica. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas formas farmacéuticas incluyen aerosoles, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, pomadas, cremas, apósitos, parches, ungüentos, colutorios, etc. Para ello, la formulación farmacéutica que comprende el FT lipidado incluirá los portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la elaboración de la forma farmacéutica de administración de FT lipidado por vía tópica.

40

Por tanto, en una realización particular, la composición farmacéutica de la invención es una composición farmacéutica para la administración tópica de un FT lipidado, con la condición que:

- 45 (i) el FT lipidado no es un FT de mamífero recombinante o un fragmento funcional del mismo obtenido de plantas transgénicas, y
 (ii) el FT lipidado no es un FT lipidado que tiene un 70% de PC y un 30% de PS y que comprende un FT producido en E. coli que tiene la secuencia

50

```
SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTD
TECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLG
QPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSG
KKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
IFYIIGAVVFWVIIILVILAISLH.
```

que comprende FT lipidado y un portador farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración tópica de dicho FT lipidado.

55

El FT lipidado estará presente en la composición farmacéutica de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva. Dicha cantidad puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 µg de proteína activa/ml y 100 µg de proteína activa/ml.

60 En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende:

- a) un producto que comprende (i) FT lipidado y (ii) FXa, junto con un portador farmacéuticamente aceptable; o

- b) por separado, (i) FT lipiado junto con un portador farmacéuticamente aceptable, y (ii) FXa junto con un portador farmacéuticamente aceptable; o
- c) un producto que comprende (i) FT lipiado y (ii) una SICN, junto con un portador farmacéuticamente aceptable; o
- 5 d) por separado, (i) FT lipiado junto con un portador farmacéuticamente aceptable, y (ii) una SICN junto con un portador farmacéuticamente aceptable; o
- e) un producto que comprende (i) FT lipiado, (ii) FXa y (iii) una SICN, junto con un portador farmacéuticamente aceptable; o
- 10 f) por separado, (i) FT lipiado junto con un portador farmacéuticamente aceptable, (ii) FXa junto con un portador farmacéuticamente aceptable, y (iii) una SICN junto con un portador farmacéuticamente aceptable; o
- g) un complejo FT::FXa junto con un portador farmacéuticamente aceptable; o
- h) un complejo FT::SICN junto con un portador farmacéuticamente aceptable; o
- 15 i) un complejo FT::FXa::SICN junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica definida previamente contiene, como puede apreciarse, FT lipiado solo o combinado con FXa y/o SICN o formando complejos con FXa y/o SICN, como principio activo. En una realización particular, el FT lipiado presente en la composición farmacéutica de la invención definida previamente es FT humano lipiado.

20 Asimismo, en una realización particular, la composición farmacéutica de la invención definida previamente se formulará en una forma farmacéutica para la administración tópica del principio activo (FT lipiado solo o combinado con FXa y/o SICN o formando complejos con FXa y/o SICN). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas formas farmacéuticas incluyen aerosoles, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, pomadas, cremas, apósitos,

25 parches, ungüentos, colutorios, etc. Para ello, la formulación farmacéutica que comprende el principio activo previamente mencionado incluirá los portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la elaboración de la forma farmacéutica de administración de dicho principio activo por administración tópica.

El principio activo estará presente en la composición farmacéutica de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva. La dosis de principio activo a administrar a un sujeto dependerá, entre otros factores, de la severidad de la

30 patología que padezca dicho sujeto, de la forma farmacéutica de administración elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben ser consideradas tan solo como guías para el experto en la materia, y éste debe ajustar las dosis en función de las variables citadas anteriormente. No obstante, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar una o más veces al día con fines preventivos o terapéuticos.

35 La composición farmacéutica de la invención puede ser utilizada junto con otros fármacos adicionales útiles en la prevención y/o tratamiento de una diátesis hemorrágica (e.g., factores de la coagulación, plasmas humanos, etc.) para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada

40 para su administración simultánea o sucesiva (secuencial en el tiempo) respecto a la administración de la composición farmacéutica de la invención

V. Composición farmacéutica soportada

45 La composición farmacéutica de la invención puede estar depositada sobre un soporte. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un producto que comprende la composición farmacéutica de la invención y un soporte. El término "soporte", tal como aquí se utiliza, se refiere a un sustrato de un material apropiado que permite el depósito de la composición farmacéutica de la invención, su vehiculización y su liberación en el lugar deseado, por ejemplo, en el sitio donde la composición farmacéutica de la invención ejerce su efecto terapéutico. Dicho soporte puede ser

50 un soporte sólido o un soporte no sólido, por ejemplo, un soporte líquido o un soporte gaseoso. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de soportes sólidos incluyen apósitos, tiritas, compresas, emplastes, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de soportes líquidos, incluyen geles, sprays, colutorios, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de soportes gaseosos, incluyen aire, propelentes, etc. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención depositada sobre dicho soporte comprende:

- 55 (a) (i) un soporte, (ii) un producto que comprende FT lipiado y FXa, junto con un portador farmacéuticamente aceptable, (iii) un producto que comprende FT lipiado y una SICN, junto con un portador farmacéuticamente aceptable y (iv) un producto que comprende FT lipiado, FXa y una SICN, junto con un portador farmacéuticamente aceptable; o
- 60 (b) un complejo FT::FXa, junto con un portador farmacéuticamente aceptable, o
- (c) un complejo FT::SICN, junto con un portador farmacéuticamente aceptable, o
- (d) un complejo FT::FXa::SICN, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización particular, el FT lipídado presente en la composición farmacéutica de la invención es FT humano lipídado.

Este producto que comprende la composición farmacéutica de la invención depositada sobre un soporte puede obtenerse por métodos convencionales, por ejemplo, mezclando la composición farmacéutica de la invención y el soporte. La interacción entre la composición farmacéutica de la invención y el soporte puede ser una interacción física o química dependiendo de la naturaleza de los componentes de la composición farmacéutica de la invención y del soporte utilizado.

10 EJEMPLO

Con el fin de evaluar la capacidad del FT lipídado como estimulador del FXa, se realizaron una serie de ensayos *in vitro* e *in vivo*, en concreto:

15 1. Ensayos *in vitro* que demuestran que el factor FT lipídado (solo o en combinación) actúa como un estimulador directo del FXa causando la formación del coágulo de fibrina y la coagulación sanguínea en la ausencia del FVII (causado por ausencia, deficiencia o inmunobloqueo)

- 20 1.1. El FT lipídado aumenta la capacidad proteolítica de FXa y consecuentemente la producción de trombina en ausencia de FVII (ensayos cromogénicos en disolución y en suspensión de plaquetas lavadas).
- 1.2. El FT lipídado es capaz de coagular el plasma y la sangre de pacientes deficitarios en FVII (ensayos de coagulación en plasma y en sangre total no-anticoagulada)
- 1.3. El FT lipídado es capaz de coagular el plasma de sujetos sanos en presencia de un anticuerpo monoclonal frente a FVII (ensayos de coagulación)
- 25 1.4. La combinación de FT lipídado y SICN aumenta de forma sinérgica la coagulación de la sangre en plasmas deficitarios en FVII (ensayos de coagulación).
- 1.5. La combinación de FT lipídado y FXa aumenta la coagulación sanguínea de forma sinérgica en presencia de un anticuerpo monoclonal frente a FVII (ensayos de coagulación en plasmas deficitarios en FX).
- 30 1.6. La combinación de FT lipídado, FXa y SICN aumenta la coagulación de forma sinérgica en la presencia de un anticuerpo anti-FVII (ensayo de coagulación en plasmas deficitarios en el FX).

2. Ensayos *in vitro* que demuestran que la combinación de FT lipídado con FXa a bajas concentraciones (incapaz de inducir ningún efecto procoagulante), produce la coagulación de plasmas defectivos en FX

- 35 2.1 El FT lipídado actúa como estimulador del FXa cuando esta serínproteasa está presente a bajas concentraciones.
- 2.2 La combinación de FT lipídado con FXa y SICN actúa de forma sinérgica en la estimulación del FXa.

40 3. Ensayos *in vitro* que demuestran que el FT lipídado (solo o en combinación) produce la coagulación en pacientes con deficiencias en otros factores de coagulación distintos del FVII

- 3.1 El FT lipídado coagula el plasma y la sangre de pacientes con deficiencias en los factores de coagulación FV, FVIII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, y FXIII (ensayos de coagulación en plasmas deficitarios en factores de coagulación y en sangre total no coagulada de FVIII y FIX).
- 45 3.2 El FT lipídado coagula la sangre completa y el plasma previamente heparinizados.
- 3.3 El FT coagula el plasma de animales tratados con warfarina.
- 3.4 La combinación de FT lipídado con SICN aumenta de forma sinérgica la coagulación sanguínea en plasma de pacientes con deficiencias en los factores de coagulación FV, FVIII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII y FXIII (ensayos de coagulación en plasmas deficitarios en factores de coagulación) y en sangre total de pacientes hemofílicos.
- 50

4. Ensayos *in vitro* que demuestran que el FT lipídado (solo o en combinación) causa la coagulación sanguínea en pacientes sanos.

- 55 4.1 El FT lipídado coagula el plasma y la sangre de pacientes sanos.
- 4.2 La combinación de FT lipídado con SICN aumenta de forma sinérgica la coagulación sanguínea en plasma y sangre de sujetos sanos. Ausencia de efectos sinérgicos cuando el FT lipídado está asociado a fosfolípidos.

60 5. Ensayos *in vitro* que demuestran que el efecto coagulante del FT lipídado (solo o en combinación) en plasma de pacientes con alteraciones plaquetarias congénitas y adquiridas (trombocitopénicos)

- 5.1 El FT lipídado coagula el plasma de pacientes con alteraciones plaquetarias congénitas.

5.2 La combinación de FT lipidado con una SICN aumenta la coagulación en sangre total de pacientes con alteraciones plaquetarias congénitas.

5.3 EL FT lipidado coagula en muestras trombocitopénicas.

5 6. **Ensayos *in vitro* que demuestran que el FT es un agente útil en el tratamiento antihemorrágico tópico en ratas control (aplicándolo directamente solo o en combinación con una SICN en el vaso sanguíneo previamente seccionado)**

10 6.1 El FT lipidado (solo o en combinación con una SICN) es útil como agente tópico hemostático en un modelo animal de hemorragia severa mediante la sección proximal de colas de rata.

6.2 El FT lipidado es útil como agente hemostático tópico en un modelo animal de hemorragia severa tratado previamente con heparina o warfarina.

6.3 El FT lipidado es útil como agente hemostático tópico en un modelo animal de hemorragia letal mediante la sección proximal de colas de rata.

15

I. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

20 Como fuente de Factor Tisular (FT) lipidado se utilizó Factor Tisular recombinante humano (FTr) Thromborel® S y Neoplastin® Plus. Concretamente, se emplearon las siguientes preparaciones comerciales: el factor tisular recombinante humano (no lipidado) (American Diagnostica, USA), relipidado siguiendo el método descrito por Morrissey, la tromboplastina de placenta humana liofilizada que contenía calcio (Thromborel® S, Dade Behring Inc); cerebro de rata liofilizado conteniendo calcio (Neoplastin® Plus, Diagnostica Stago-Roche).

25

La actividad procoagulante de la proteína FT se determinó mediante una curva estándar usando como material de referencia el FT humano lipidado recombinante (American Diagnostica, USA) y se expresó en el texto como µg de proteína activa/mL y en las tablas como µg/ml. Por simplicidad, en este ejemplo, el término FTr o FT, salvo que se indique lo contrario, se refiere a FT lipidado. Como fuente de FXa, FII (protrombina) y FVa se utilizaron los compuestos comerciales de Haematologic Technologies. Como superficies inorgánicas cargadas negativamente (SICN) se utilizó el reactivo comercial Dade® Actin® FS (Dade Behring). Los plasmas deficitarios en factores de coagulación comerciales (FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII y FXIII) se obtuvieron de Dade Behring Marburg GmbH.

30

Métodos

35

Método para la relipidación del FT en vesículas de lípidos usando diálisis con octilglucósido (Método de Morrissey)

El FT no lipidado se incorpora dentro de vesículas de lípidos usando el detergente no iónico N-octil-beta-D-glucopiranosido (octilglucósido). Tanto el FT como los lípidos se disuelven en octilglucósido formando micelas. Como el octilglucósido presenta una alta concentración de micela crítica (CMC = 20 a 50 mM) se puede eliminar fácilmente de la solución por diálisis. Al eliminarse el octilglucósido los lípidos se organizan en vesículas unilamelares. El FT se embebe en estas vesículas en virtud de su dominio transmembrana. Normalmente, del 50 al 80% de las moléculas de FT se disponen mirando hacia afuera de las vesículas.

40

45 *Tampones y soluciones stock*

Octilglucósido (n-octil-beta-D-glucopiranosido) de Calbiochem. Lípidos:

	Lípido	Concentración	Peso Molecular
PC	L-alfa-fosfatidilcolina	10 ó 25 mg/ml	761
PS	L-alfa-fosfatidilserina, sal de sodio de cerebro bovino	10 mg/ml	810
PE	L-alfa-fosfatidiletanolamina, hígado bovino	10 mg/ml	768

50

Tampones:

HBS
NaCl 100 mM
Hepes/NaOH 20 mM, pH 7,5
Azida de sodio 0,02 % (m/v)
HBSA (guardar a 4 °C)
Albúmina de suero bovino en HBS 0,1 % (m/v)
OG/HBS (preparar en el momento)
n-octil-beta-D-glucopiranosido en HBS 100 mM (29,2 mg OG/ ml de HBS)

Preparación de la solución de lípidos en octilglucósido (OG)

1. Para cada muestra, se preparan 2,6 micromoles de lípidos totales en un tubo de vidrio, usando el radio molar de lípidos deseado.
2. Secar la mezcla de lípidos bajo una corriente de argón o nitrógeno.
3. Cuando el tubo parezca seco, secar al vacío por otros 60 minutos.
4. Añadir 400 µl de solución fresca de OG/HBS (a temperatura ambiente) al tubo con los lípidos secos.

Para vesículas PC:PS (radio 80:20 molar)		
62 µl PC (a 25 mg/ml)	= 1,58 mg	= 2,08 µmoles
42 µl PS (a 10 mg/ml)	= 0,42 mg	= 0,52 µmoles

Para vesículas PC:PE:PC (radio 40:40:20) molar		
32 µl PC (a 25 mg/ml)	= 0,79 mg	= 1,04 µmoles
80 µl PE (a 10 mg/ml)	= 0,80 mg	= 1,04 µmoles
42 µl PS (a 10 mg/ml)	= 0,42 mg	= 0,52 µmoles

Relipidación

- 15 Añadir la cantidad deseada de FT al tubo que contiene los 400 µl de OG/lípidos y suficiente HBSA hasta completar el volumen final de 1 ml. Realizar este paso a temperatura ambiente.

Obtención de suspensiones de plaquetas lavadas

- 20 Las suspensiones de plaquetas lavadas se prepararon según el método descrito por Radomski M. et al. (Radomski M, Moncada S.; 1983 Thromb Res. This is an improved method for washing of human platelets with prostacyclin. 15;30(4):383-9) a partir de extracciones sanguíneas (citrato sódico 3,15%) de voluntarios sanos. El procesamiento de los especímenes siempre se llevó a cabo inmediatamente después de la extracción sanguínea y a temperatura ambiente. Previamente y durante la realización de los ensayos se evaluó el estado de activación y funcionalidad de las plaquetas mediante ensayos de agregación. Se estimaron la auto-activación y funcionalidad mediante activación con un agonista conocido (colágeno).

Ensayos in vitro

30 Ensayos cromogénicos

Se diseñaron diferentes ensayos cromogénicos en solución y en suspensiones de plaquetas activadas para demostrar el efecto del FTr sobre la actividad proteolítica del Factor Xa.

- 35 La actividad amidolítica del FXa se determinó mediante un ensayo cromogénico utilizando S-2765 (Chromogenix) como sustrato cromogénico para FXa, mientras que la actividad formadora de trombina se analizó utilizando S-2238 (Chromogenix) como sustrato cromogénico para trombina.

- 40 Los ensayos cromogénicos se realizaron en suspensión (en tampón) y utilizando suspensiones de plaquetas lavadas. En una placa de ELISA se dispensaron los volúmenes apropiados de cada uno de los factores a estudiar y, en el caso de la utilización de la suspensión de plaquetas lavadas, un volumen apropiado para tener en el medio una concentración de 250.000 plaquetas/µl. Finalmente, la adición del sustrato cromogénico específico permitió cuantificar la actividad proteolítica en cuestión mediante lectura espectrofotométrica a 405 nm. En los ensayos para determinar la actividad amidolítica solo se dispensaron el FXa y las diferentes concentraciones de FTr, mientras que en los ensayos para determinar la actividad formadora de trombina era necesario añadir, además, Factor II (protrombina) y FVa (este solo en el caso de los ensayos en suspensión, pues en los de las plaquetas lavadas, éstas ya contienen FVa endógeno).

Ensayos de coagulación en plasma

La actividad procoagulante espontánea (no estimulada) en plasma se midió mediante un ensayo de coagulación de un paso determinado en un coagulómetro (Fibrinometer BFT-II clot-timer Dade-Behring, Alemania). Brevemente, se añadieron 50 µl de plasma pobre en plaquetas a las cubetas ya atemperadas y se adicionaron 50 µl de agua destilada. Esta mezcla se dejó incubar durante 60 segundos a 37°C e inmediatamente se añadieron 50 µl de cloruro de calcio 25 mM y se determinó el tiempo de coagulación en segundos en el coagulómetro comprobado por la formación del coágulo. Cada una de las muestras se ensayó por duplicado. Los plasmas pobres en plaquetas se obtuvieron mediante centrifugación y el número de plaquetas se determinó mediante Coulter.

Ensayos de coagulación en sangre total

La actividad procoagulante en sangre total no anticoagulada se determinó mediante un método coagulativo. A 1 ml de sangre total no anticoagulada se le añadieron los diferentes agentes a estudiar y se midió el tiempo de coagulación con un cronómetro desde el inicio de la extracción hasta la aparición del coágulo sanguíneo estable y consolidado. El efecto de los diferentes agentes se evaluó mediante el efecto de acortamiento o alargamiento que tiene sobre el tiempo de coagulación sanguíneo.

Ensayos *in vivo*Modelo de hemorragia grave por sección proximal de cola de rata

23 ratas macho Sprage-Dawley de 350-450 gramos de peso fueron repartidas aleatoriamente en 3 grupos de tratamiento: un grupo de control, formado por 14 animales que recibieron tratamiento tópico con suero salino fisiológico, mientras que los otros dos grupos, también compuestos por 5 animales, recibieron tratamiento tópico con rFT 1,2 µg/ml, y n= 4 tratamiento tópico con rFT 1,2 µg/ml + SICN (vol:vol 1:2) respectivamente. Todos los compuestos entraron en contacto tópico con la sección proximal de la cola del animal para actuar hemostáticamente administrado mediante pipeta eppendorf de plástico. La formación del coágulo estable y consolidado se evidenció mediante confirmación del cese del sangrado.

Modelo de hemorragia severa mediante sección proximal de cola de rata en animales tratados con fármacos anticoagulantes

27 ratas macho Sprage-Dawley de 350-450 gramos se repartieron aleatoriamente en 5 grupos de tratamiento: un grupo control, formado por 14 animales que recibieron tratamiento tópico con suero salino fisiológico. Dos grupos recibieron 200 U/Kg de heparina i.v. 15 minutos antes de comenzar el procedimiento de sección de la cola (para tratarse con FT n=3 y para tratarse con suero salino n=5), y otros dos grupos recibieron oralmente 0,1 mg/Kg/día de warfarina durante 3 días antes de comenzar el procedimiento de sección de la cola (para tratarse con FT n=3 y para tratarse con suero salino, n=2). El tratamiento tópico con rFT 1,2 µg/ml se realizó sólo a uno de cada grupo de tratamiento. Así, fue un grupo tratado control por cada tratamiento de anticoagulación. El FT lipídado entró en contacto tópico con la sección proximal de la cola del animal para actuar hemostáticamente administrado mediante una pipeta eppendorf de plástico. La formación del coágulo estable y consolidado se evidenció mediante confirmación del cese del sangrado.

Modelo de hemorragia mortal por punción en arteria carótida de rata

4 ratas macho Sprage-Dawley de 350-450 gramos de peso fueron repartidas aleatoriamente en 2 grupos de tratamiento que incluían cada uno de ellos a 2 animales. Los animales del grupo control recibieron como tratamiento suero salino fisiológico, mientras que el otro grupo recibió FT lipídado administrado tópicamente (a una dosis final de 2 µg de proteína activa). El modelo de hemorragia mortal por punción en arteria carótida de rata se realizó siguiendo los procedimientos estándar. El FT lipídado y el suero fisiológico fueron administrados directamente sobre el punto de la punción en vendaje conteniendo 3 ml de cada uno. Esto se combinó con la presión y contacto del correspondiente tratamiento durante dos minutos.

II. RESULTADOS**1. Ensayos *in vitro* que demuestran que el FT lipídado (solo o en combinación) actúa como estimulador directo de FXa causando la formación del coágulo de fibrina y la coagulación sanguínea en ausencia de FVII (causado por ausencia, deficiencia o inmunobloqueo)**

1.1 FT lipídado aumenta la actividad proteolítica de FXa y, en consecuencia, la producción de trombina en ausencia de FVII

Con el fin de evaluar la capacidad del FT lipiado, en ausencia de FVII, como agente estimulador del Factor Xa, se realizaron varios ensayos *in vitro*: (i) ensayos cromogénicos de actividad amidolítica del FXa, en solución; y (ii) ensayos cromogénicos de actividad formadora de trombina en una suspensión de plaquetas lavadas.

5 Ensayos cromogénicos de actividad amidolítica del FXa

Los ensayos directos de la actividad amidolítica del FXa en solución utilizando el sustrato S-2765 específico para el FXa, demostraron que el FT lipiado es capaz de aumentar muy significativamente la actividad proteolítica del FXa. En presencia de altas concentraciones de rFT (1 µg/ml) se observó un incremento en la actividad producida por bajas y altas concentraciones de FXa ($p < 0,001$). Similares efectos estimuladores significativos ($p < 0,001$) fueron observados en presencia de concentraciones menores de FT lipiado (0.1 µg/ml). En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en 5 experimentos independientes.

Tabla 1

15 **El FT lipiado, en ausencia de FVII, aumenta la actividad proteolítica del FXa**

	Sin FTr	FTr 0.1 µg/ml	FTr 1 µg/ml
FXa 30 nM	550 ± 51	2,108 ± 61	3,316 ± 89
FXa 5 nM	0	341 ± 32	505 ± 63

Media ± SEM (n= 5)

20 Ensayos cromogénicos de actividad de formación de trombina en suspensiones de plaquetas lavadas

El efecto procoagulante detectado fue mucho mayor cuando se usaron las suspensiones plaquetarias como fuente de superficie procoagulante y la formación de trombina fue determinada por el sustrato específico S-2238 (tabla 2). En ausencia de FXa exógeno, el FT lipiado produjo un efecto estimulante significativo en la formación de trombina ($p < 0,001$). Se observaron efectos similares en presencia de FXa exógeno a bajas y altas concentraciones ($p < 0,001$).

Tabla 2

30 **El FT lipiado induce la formación de trombina en plaquetas lavadas en presencia de FII pero en ausencia de FVa (ya presente en las plaquetas) y FVII**

	sin FTr	FTr 0.1 µg/ml	FTr 1 µg/ml
FXa 1,250 pM	421 ± 19	13,854 ± 145	14,910 ± 168
FXa 250 pM	213 ± 21	9,324 ± 155	9,610 ± 114
FXa 125 pM	201 ± 29	7,802 ± 113	8,508 ± 178
FXa ausente	0	906 ± 89	3,504 ± 69

Media ± SEM (n= 5)

35 **1.2 El FT lipiado es capaz de coagular plasma y sangre de pacientes deficitarios en FVII (ensayos de coagulación en plasma y en sangre total no-anticoagulada)**

40 Se realizaron una serie de ensayos de coagulación *in vitro* que mostraron el efecto coagulante del FT lipiado en plasma y en sangre total no-anticoagulada de pacientes deficitarios en FVII y, por tanto, el FT lipiado es un agente útil en el tratamiento antihemorrágico.

45 Ensayos de coagulación en plasma comercial sin FVII y en sangre total no-anticoagulada de pacientes deficitarios en FVII

Se investigó el efecto del FT lipiado en coagulación mediante ensayos de coagulación usando plasma comercial sin FVII y sangre total no-anticoagulada de dos pacientes con deficiencia en el FVII (tabla 3). El FT lipiado en forma dependiente de concentración, fue capaz de acelerar la coagulación de forma significativa en plasmas deficientes en FVII. De la misma manera, sangre total no anticoagulada de pacientes deficientes en el FVII se coaguló en presencia de bajas, medias y altas concentraciones de FT lipiado, indicando que es capaz de producir una coagulación normal mediante FT lipiado incluso en ausencia del FVII. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos de 5 experimentos independientes de plasmas deficitarios en FVII.

Tabla 3
Demostración del efecto procoagulante del FT lipiado en plasmas deficitarios en el FVII

	Tiempo de coagulación (s)			
	Basal	con FTr		
		1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,01 µg/ml
Plasma normal	215,1 ± 24,6	11,1 ± 0,2	15,3 ± 0,2	25,7 ± 0,4
Plasma deficiente en FVII	> 300	67,7 ± 7,2	113,7 ± 28,3	202,7 ± 41,6

5 *Media ± SEM (n= 5)*

El efecto del FT lipiado en sangre de voluntarios sanos fue significativo tras la concentración de 0,01 µg/ml, mientras que se necesitaron mayores concentraciones en pacientes deficientes del FVII (tabla 4). Aunque se detectaron efectos procoagulantes significativos ($p < 0,001$) tras 0,1 µg/ml, el FT lipiado fue capaz de normalizar el tiempo de coagulación a la concentración de 0,01 µg/ml, no existiendo diferencias entre los tiempos de coagulación detectados en sujetos normales en condiciones basales y en sujetos deficientes en FVII con dicha concentración de FT lipiado. Finalmente, aunque el FT lipiado a 1 µg/ml no fue capaz de inducir el mismo fuerte efecto procoagulante en plasma sin FVII, se observó un efecto muy significativo, lo que indica que el FT lipiado puede normalizar la hemostasis en estos pacientes.

Tabla 4
Efecto procoagulante del FT lipiado en sangre total no anticoagulada de individuos sanos y deficientes de FVII

	Basal	FTr				
		0,01 ng/ml	0,1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml
Muestra control no. 1	5,8	4,7	4,4	3,3	2,1	1,3
Muestra control no. 2	7,2	6,7	5,5	3,7	2,1	1,0
Paciente no. 6 deficiente en FVII	11,4	n.d.	10,5	9,5	5,2	2,3
Paciente no. 7 deficiente en FVII	12,5	n.d.	11,3	10,5	6,3	3,1

n.d.; no determinado

1.3 El FT lipiado es capaz de coagular el plasma de sujetos sanos en presencia de un anticuerpo monoclonal frente al FVII (ensayos de coagulación)

Se realizaron ensayos de coagulación *in vitro* mostrando en efecto coagulante del FT en plasma de sujetos sanos en presencia de un anticuerpo monoclonal frente al FVII (este anticuerpo es capaz de bloquear la coagulación en plasmas normales).

30 Ensayos de coagulación en plasma normal carente de FVII mediante el bloqueo con anti-FVII

Se investigó el efecto del FT lipiado en la coagulación de plasma mediante ensayos de coagulación usando plasma de voluntarios sanos en presencia de un anticuerpo monoclonal frente a FVII (tabla 5). El FT lipiado fue capaz de provocar coagulación incluso en presencia de un anticuerpo monoclonal frente a FVII, (que es capaz de inhibir completamente la coagulación sanguínea). Bajo estas condiciones experimentales (como plasmas deficientes en FVII), el FT lipiado es capaz de producir la coagulación del plasma.

Tabla 5
Demostración del efecto procoagulante del FT en plasma normal en presencia de un anticuerpo monoclonal frente a FVII

	Sin FTr	Con FTr 1 µg/ml
Plasma normal	126,8	28,1
Plasma normal con anti FVII (400 µg/ml)	216,8	42,5

1.4 *Combinación de FT lipidado y SICN aumenta de forma sinérgica la coagulación sanguínea en plasmas deficientes en FVII (ensayos de coagulación)*

Se realizaron una serie de ensayos de coagulación *in vitro* mostrando el efecto coagulante del FT lipidado asociado con una superficie inorgánica cargada negativamente (SICN) en plasma deficiente de FVII. Dicho efecto procoagulante excedió el obtenido cuando el FT lipidado se usó solo como un agente procoagulante. Estos resultados muestran que el efecto mediado por el FT lipidado es independiente del FVII y que es capaz de inducir la coagulación del plasma incluso en ausencia de su ligando específico. La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos en 5 experimentos independientes.

10 **Tabla 6**

Efecto procoagulante del FTr asociado con superficies inorgánicas cargadas negativamente en plasmas heparinizados y deficientes en factor de coagulación

	Tiempo de coagulación (s)		
	Basal	Con FTr	
	-	1 µg/ml	1 µg/ml + SICN
Plasma normal	211,1± 18,5	18,6 ± 0,1	13 ± 1,2 *
Plasma deficiente en FVII	> 300	67 ± 11	32 ± 3,4 *

*Media ± SEM (n= 5); *p<0,001 sin SICN frente a con SICN; t-Student*

15

1.5 *La combinación de FT lipidado y FXa aumentan de forma sinérgica la coagulación sanguínea en presencia de un anticuerpo monoclonal frente al FVII (ensayos de coagulación en plasmas deficientes en FX)*

Se investigaron los efectos procoagulantes de la asociación del FT lipidado y el FXa a bajas concentraciones (170 pM y 1700 pM) en ausencia de FVII en plasmas deficientes en FXa inmunobloqueado con un anti-FVII (Tabla 7).

20 **Tabla 7**

Efecto procoagulante del FT lipidado asociado con FXa en plasma deficiente en FXa en ausencia de FVII (inmunobloqueado con anti FVII)

25

Plasma deficiente en FXa	Tiempo de coagulación (s)		
	Sin FXa	Con FXa (1700 pM)	Con FXa (170 pM)
Basal (calcio 5 mM)	> 400	133 ± 18	290 ± 10,2
Con FTr 1 µg/ml	253,5 ± 11	83,1 ± 3,2 *	124 ± 6,1 *
Con FTr 1 µg/ml + anti FVII (400 µg/ml)	234,5 ± 9	78 ± 2 *	124 ± 6,1 *

*Media ± SEM (n= 5); *p<0,001 sin FXa frente a con FXa; t-Student*

30 1.6 *La combinación de FT lipidado, FXa y SICN aumenta de forma sinérgica la coagulación sanguínea en presencia de un anticuerpo monoclonal frente a FVII (ensayos de coagulación en plasmas deficientes en FX)*

También se investigaron los efectos procoagulantes de la asociación del FT lipidado, el FXa a bajas concentraciones (170 pM y 1700 pM) y una SICN en plasma deficiente en FXa (Tabla 8).

35 **Tabla 8**

Efecto procoagulante del FTr asociado con FXa y SICN en un plasma deficiente en FXa

Plasma deficiente en FXa	Tiempo de coagulación (s)		
		Sin SICN (1 µl)	Con SICN (2 µl)
Basal (calcio 5 mM)	> 400	> 400	290 ± 10,2
FTr 1 µg/ml + FXa (170 pM)	124 ± 6,1 *	109 ± 4,1 *	84 ± 3 *
FTr 1 µg/ml + FXa (1700 pM)	83,1 ± 3,2 *	65,5 ± 5,2 *	45,5 ± 3,2 *
FTr 1 µg/ml + FXa (170 pM) + anti FVII (400 µg/ml)	119 ± 5 *	101 ± 5 *	99 ± 3 *
FTr 1 µg/ml + FXa (1700 pM) + anti FVII (400 µg/ml)	78 ± 2	27,7± 1,2	25 ± 2

*Media ± SEM (n= 5); *p<0,001 sin SICN frente a con SICN; t-Student*

2. Ensayos *in vitro* que demuestran que la combinación del FT lipiado con FXa a bajas concentraciones (incapaces de inducir un efecto procoagulante) produce la coagulación de plasmas defectivos en FX

2.1 FT lipiado actúa como estimulador del FXa cuando esta serínproteasa está presente a bajas concentraciones

Se realizaron ensayos de coagulación *in vitro* en plasma deficiente en FX para mostrar el efecto sinérgico del FT lipiado sobre el FXa (añadido a bajas concentraciones, 170 pM y 1700 pM, a plasma deficiente en FX, por lo que estos plasmas son incapaces de producir FXa de ninguna ruta de coagulación). Los efectos procoagulantes de la asociación del FT lipiado y FXa a bajas concentraciones se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

Efecto procoagulante del FT lipiado asociado con FXa en plasma deficiente de FXa

Plasma deficiente en FX	Tiempo de coagulación (s)		
	Sin FXa	Con FXa (1700 pM)	Con FXa (170 pM)
Basal (5 mM calcio)	> 400	133 ± 18	290 ± 10.2
Con FTr 1 µg/ml	253,5 ± 11	83,1 ± 3.2 *	124 ± 6.1 *

*Media ± SEM (n= 5); *p<0,001 sin FXa frente a con FXa; t-Student*

2.2. La combinación del FT lipiado con FXa y SICN actúa de forma sinérgica en la estimulación del FXa

Se investigaron también los efectos procoagulantes de la asociación del FT lipiado, FXa a bajas concentraciones (170 pM y 1700 pM) y SICN en plasma deficiente en FX (Tabla 10).

Tabla 10

Efecto procoagulante del FT lipiado asociado con FXa y SICN en plasma deficiente de FXa

Plasma deficiente en FX	Tiempo de coagulación (s)		
		Con SICN (1 µl)	Con SICN (2 µl)
Basal (5 mM calcio)	> 400	> 400	290 ± 10.2
FTr 1 µg/ml + FXa (170 pM)	124 ± 6.1 *	109 ± 4.1 *	84 ± 3 *
FTr 1 µg/ml + FXa (1700 pM)	83,1 ± 3.2 *	65,5 ± 5.2 *	45,5 ± 3.2 *

*Media ± SEM (n= 5); *p<0,001 sin SICN frente a con SICN; t-Student*

3. Ensayos *in vitro* que demuestran que el FT lipiado (solo o en combinación) causa la coagulación sanguínea en pacientes con deficiencias en otros factores de coagulación distintos del FVII

3.1 El FT lipiado coagula el plasma y la sangre de pacientes con deficiencias en los factores de coagulación FV, FVIII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII y FXIII

Se investigó el efecto procoagulante del FT lipiado (solo) en plasmas deficientes en factor de coagulación usando plasmas comerciales carentes mediante técnicas de inmunoafinidad, así como en plasma de 3 pacientes diagnosticados con hemofilia A (deficiente en FVIII) y 2 diagnosticados con hemofilia B (deficiente en FIX). La Tabla 11 muestra los resultados. La concentración de 1 µg/ml de FT lipiado fue capaz de coagular eficazmente todos los plasmas con deficiencias en FV, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII y FXIII. Por otro lado, en ausencia del conocido cofactor de FXa, FVa, el FT lipiado fue también capaz de producir la coagulación de plasma, aunque solo a concentraciones media y elevada. En las deficiencias de factores de coagulación restantes, el FT lipiado fue efectivo a todas las concentraciones utilizadas, obteniéndose resultados excelentes a muy bajas concentraciones. Incluso en ausencia del FX (1%) el FT lipiado fue capaz de coagular pero sólo a altas concentraciones. Todos estos resultados se confirmaron con muestras de pacientes con hemofilia A y hemofilia B.

Tabla 11

Efecto procoagulante del FT lipiado en plasmas deficientes del factor de coagulación

	Tiempo de coagulación (s)			
	Sin FTr	Con FTr		
	-	1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,01 µg/ml
Plasma normal	215.1 ± 24.6	11,1 ± 0,2	15,3 ± 0,2	25,7 ± 0,4
Plasma FV-D	> 600	84,3 ± 15,2	123,3 ± 24,5	350 ± 29,5
Plasma FVIII-D	> 600	15,5 ± 2,3	21,5 ± 2,8	32,1 ± 2,6
Plasma FIX-D	> 600	14,8 ± 3,2	22,3 ± 2,5	34,6 ± 2,4
Plasma FX-D	> 600	446,2 ± 32	> 600	> 600
Plasma FXI-D	> 600	14,3 ± 0,5	19,4 ± 1,5	27,3 ± 0,6
Plasma FXII-D	> 600	16,2 ± 0,3	22,5 ± 1,1	32,5 ± 0,5
Plasma FXIII-D	> 600	14,2 ± 0,3	21,5 ± 1,0	30,5 ± 0,5
Plasma Hemofilia A	> 600	12,2 ± 1,5	13,8 ± 0,6	21,3 ± 0,8
Plasma Hemofilia B	> 600	12,1 ± 0,5	15,3 ± 0,4	26,8 ± 0,6

Media ± SEM (n= 5)

5

Se evaluó mediante un ensayo de coagulación el efecto procoagulante del FT lipiado (solo) en sangre total humana no anticoagulada de personas que sufrían hemofilia A y B. La formación del coágulo se determinó estimando el tiempo en minutos para que se consolidara el coágulo. El efecto del FT lipiado en sangre de voluntarios sanos fue significativo a concentraciones de 0,001 µg/ml, mientras que se necesitaron mayores dosis en pacientes hemofílicos, detectándose efectos procoagulantes significativos ($p < 0,001$) a partir de 0,01 µg/ml. A la concentración de 0,1 µg/ml el FT lipiado fue capaz de normalizar completamente el tiempo de coagulación, no existiendo diferencias entre los tiempos de coagulación detectados en sujetos normales y en hemofílicos. La tabla 12 muestra los resultados obtenidos de 4 muestras de individuos sanos (muestras números 1-4), 3 de pacientes que sufrían hemofilia A y 2 con hemofilia B.

15

Tabla 12

Efecto procoagulante del FT lipiado en sangre total no anticoagulada de sujetos sanos y pacientes hemofílicos

	Basal	FTr		
		0,001 µg/ml	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml
Muestra control no. 1	5,8	3,3	2,1	1,3
Muestra control no. 2	7,2	3,7	2,1	1,0
Muestra control no. 3	7,2	4,2	2,1	0,9
Muestra control no. 4	7,5	3,8	2,0	1,0
Paciente no. 1 Hemofilia A	13,3	8,0	4,6	1,6
Paciente no. 2 Hemofilia A	17,3	9,0	5,6	1,0
Paciente no. 3 Hemofilia A	15,3	12,4	7,0	1,5
Paciente no. 4 Hemofilia B	20,5	11,1	6,1	1,5
Paciente no. 5 Hemofilia B	16,3	11,3	5,5	1,6

20 *Tiempo de coagulación (expresado en minutos): el tiempo que el coágulo necesita en una muestra de sangre no anticoagulada*

3.2 *El FT lipiado coagula la sangre total y el plasma previamente heparinizado*

25 El FT lipiado fue capaz de coagular plasmas (Tabla 13) y sangre total no anticoagulada (Tabla 14) previamente tratadas con altas concentraciones de heparina, demostrando que su efecto sobre el FXa es independiente del efecto inhibitorio mediado por este fármaco anticoagulante, incluso en presencia de inhibidores de heparina.

Tabla 13

Efecto del FT lipiado en plasma heparinizado (tiempo de coagulación en segundos)

	Sin TF lipiado	Con TF lipiado
Control	320,4 ± 160	17,2 ± 1
Heparina 3 U/ml	> 600	58 ± 12

5

Tabla 14

Efecto del FT lipiado en sangre total heparinizada (tiempo de coagulación en minutos)

	Sin TF lipiado	Con TF lipiado
Control	3,96 ± 0,54	0,4 ± 0,28
Heparina 0,25 U/ml	12,45 ± 0,69	15,7 ± 0,22
Heparina 1 U/ml	26,6 ± 5,76	4,5 ± 2,38

3.3. El FT lipiado coagula el plasma de animales tratados con warfarina

10

El FT lipiado fue capaz de coagular plasmas de ratas tratadas con warfarina siguiendo el protocolo especificado en los métodos. Los resultados mostrados en la tabla 15 indican que incluso cuando se inhibe la síntesis de todos los factores de coagulación dependientes de vitamina K, el FT lipiado es capaz de coagular, demostrando que su efecto sobre el FXa es independiente del efecto inhibitorio mediado por estos fármacos anticoagulantes.

15

Tabla 15

Efecto del FT lipiado en plasma de animales tratados con warfarina (tiempo de coagulación en segundos)

	sin TF lipiado	Con TF lipiado (1 µg/ml)
Control	49 ± 10.2	10,9 ± 2.2
Plasmas tratados con warfarina (0,1 mg/kg durante 3 días)	60,1 ± 5.6	12,8 ± 3.2

20 3.4. La combinación de FT lipiado con SICN aumenta sinérgicamente la coagulación sanguínea en plasma de pacientes con deficiencias en los factores de coagulación FV, FVIII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII y FXIII (ensayos de coagulación en plasmas deficientes en factores de coagulación) y en sangre total de pacientes hemofílicos

Se realizaron una serie de ensayos de coagulación *in vitro* mostrando el efecto del FT lipiado asociado con SICN en plasma de pacientes deficientes en factores de coagulación (FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII y FXIII). Dicho efecto procoagulante excedió el obtenido cuando se usó el FT lipiado solo como agente procoagulante. Incluso a bajas concentraciones (1 µg/ml) con la que el FT lipiado no fue capaz de coagular el plasma deficiente en FV (plasma D-FV), la combinación de ambos agentes produjo un efecto procoagulante significativo. Asimismo, se obtuvieron efectos sinérgicos similares cuando se usó plasma deficiente en FVII (plasma D-FVII). Estos resultados muestran que el efecto mediado por el FT lipiado es independiente de FVII y es capaz de inducir la coagulación del plasma incluso en ausencia de FV. De forma similar, la combinación (FT lipiado + SICN) también produjo potentes efectos procoagulantes en muestras de plasma de pacientes hemofílicos (A y B). La Tabla 16 muestra los resultados obtenidos en 5 experimentos independientes.

35

Tabla 16

Efecto procoagulante del FTr asociado con SICN en plasmas deficientes en factor de coagulación

	Tiempo de coagulación (s)		
	Sin FTr	Con FTr	
	-	1 µg/ml	1 µg/ml + SICN
plasma normal	281,1± 12,5	11,1 ± 0,2	9,1 ± 0,4 *
plasma D-FV	> 600	84,3± 15,2	55,2 ± 2,3 *
plasma D-FVIII	> 600	15,5 ± 2,3	10,1 ± 0,5 *
plasma D-FIX	> 600	14,8 ± 3,2	10,3 ± 0,2 *
plasma D-FX	> 600	446,2 ± 32	253,5 ± 19 *
plasma D-FXI	> 600	14,3 ± 0,5	11,5 ± 0,6 *
plasma D-FXII	> 600	16,2 ± 0,3	12,9 ± 1,5 *
plasma D-FXIII	> 600	14,2 ± 0,3	10,8 ± 0,9 *
plasma Hemofilia A	> 600	12,2 ± 1,5	10,4 ± 0,9 *
plasma Hemofilia B	> 600	12,1 ± 0,5	10,1± 0,8 *

Media ± SEM (n= 5); *p<0,001 sin SICN frente a con SICN; t-Student

5 También se investigó el efecto procoagulante de la combinación de FT lipiado y SICN en sangre total no anticoagulada mediante ensayos de coagulación usando sangre de pacientes que sufrían hemofilia A (3 pacientes) y B (2 pacientes). El efecto procoagulante de la asociación (FTr + SICN) fue significativamente mayor (p<0,001) (Tabla 17) en comparación con los ensayos en los que el FT lipiado estaba solo (Tabla 12).

10 Tabla 17

Efecto procoagulante del FTr junto con SICN en sangre total

	Sin SICN	Con SICN
Muestra control	7,1 ± 0,6	6,0 ± 1,4 *
FTr 0.1 µg/ml	1,1 ± 0,9	0,5 ± 0,1 *

	Basal	FTr 0,1 µg/ml + SICN
Paciente no. 1 Hemofilia A	13,3	6,8 *
Paciente no. 2 Hemofilia A	17,3	7,2 *
Paciente no. 3 Hemofilia A	15,3	9,1 *
Paciente no. 4 Hemofilia B	20,5	8,5 *
Paciente no. 5 Hemofilia B	16,3	8,6 *

Tiempo de coagulación (expresado en minutos); el tiempo que el coágulo necesita para consolidarse en una muestra de sangre no anticoagulada

15

4. Ensayos *in vitro* que demuestran que el FT lipiado (solo o combinado) provoca la coagulación de la sangre en sujetos sanos

4.1 El FT lipiado coagula el plasma y la sangre de sujetos sanos

20

Se realizaron una serie de ensayos de coagulación *in vitro* que mostraban el efecto coagulante del FT lipiado en plasma y sangre total no anticoagulada de voluntarios sanos sin historial de alteraciones hemostáticas. La tabla 18 muestra los resultados obtenidos de 5 experimentos independientes en plasmas sanos y la tabla 19 en sangre total no anticoagulada.

25

Tabla 18

Efecto procoagulante del FT lipidado en plasma de sujetos sanos

Plasma normal	Tiempo de coagulación (s)
Basal	281,08 ± 12,5
FTr 0,0001 µg/ml	201 ± 12,2
FTr 0,0001 µg/ml	184 ± 5,8
FTr 0,01 µg/ml	73,5 ± 2,3
FTr 0,1 µg/ml	28,6 ± 0,1
FTr 1 µg/ml	16,4 ± 0,9

Media ± SEM (n= 5); el FT no lipidado a la misma concentración no fue capaz de modificar el tiempo de coagulación

5

Tabla 19

Efecto procoagulante del FT en sangre no anticoagulada de sujetos sanos

	Basal		FTr	
		0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml
Muestra no. 1	5,8	3,3	2,1	1,3
Muestra no. 2	7,2	3,7	2,1	1,0
Muestra no. 3	7,2	4,2	2,1	0,9
Muestra no. 4	7,5	3,8	2,0	1,0

10

4.2 La combinación de FT lipidado con SICN aumenta de forma sinérgica la coagulación sanguínea en plasma y sangre de sujetos sanos. Ausencia de efectos sinérgicos cuando el FT lipidado está asociado a fosfolípidos

Se realizaron una serie de ensayos de coagulación *in vitro* mostrando el efecto coagulante del FTr asociado con SICN en plasma de voluntarios sanos. La Tabla 20 muestra los resultados obtenidos de 5 experimentos independientes. El efecto procoagulante de la asociación (FTr + SICN) fue significativamente superior ($p < 0,001$) en cada una y en todas las concentraciones empleadas en comparación con los ensayos en los que el FTr estaba solo.

Tabla 20

Efecto procoagulante del FT lipidado asociado con SICN en plasma normal

Plasma normal	Tiempo de coagulación (s)	
	Sin SICN	Con SICN
Basal	281,08 ± 12,5	167 ± 10 *
FTr 0,0001 µg/ml	201 ± 12,2	69 ± 0,8*
FTr 0,001 µg/ml	184 ± 5,8	44,9 ± 3,2 *
FTr 0,01 µg/ml	73,5 ± 2,3	30,6 ± 2,5*
FTr 0,1 µg/ml	28,6 ± 0,1	16 ± 4,2*
FTr 1 µg/ml	16,4 ± 0,9	12,8 ± 0,5*

*Media ± SEM (n= 5); * $p < 0,001$ sin SICN vs con SICN: t-Student*

La Tabla 21 muestra la ausencia de efectos sinérgicos cuando el FT lipidado está asociado con fosfolípidos (0,66 mM de FC/FS; fosfatidilcolina/fosfatidilserina a diferente ratio molar).

Tabla 21

Efecto de los fosfolípidos en la actividad procoagulante del FT lipiado

FT lipiado (0,1 µg/ml)	Tiempo de coagulación (s)
Sin FC/FS	37,9
con FC/FS 90/10	44
80/20	39,7
70/30	41,7
60/40	40,1
50/50	43,5
40/60	34,6
30/70	41,5
20/80	44,3
10/90	41,9

5. Ensayos *in vitro* que demuestran el efecto coagulante del FT lipiado (solo y combinado) en sangre de pacientes con alteraciones plaquetarias (trombocitopénicas) congénitas y adquiridas

5.1 El FT lipiado coagula la sangre total de pacientes con alteraciones plaquetarias congénitas

Se investigó el efecto coagulante del FT lipiado en la coagulación sanguínea en pacientes con alteraciones plaquetarias mediante ensayos de coagulación usando sangre de dos pacientes que sufrían la enfermedad de Glanzmann y el Síndrome de Bernard. El FTr fue capaz de acelerar de forma muy significativa, y de una forma dependiente de concentración, la coagulación sanguínea en individuos que padecían la enfermedad de Glanzmann y el Síndrome de Bernard Soulier (Tabla 22); el FTr es, por tanto, un agente útil en el tratamiento de dichos individuos.

Tabla 22

Efecto procoagulante del FT en pacientes con alteraciones plaquetarias

	Basal		FTr	
		0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml
Muestra control no. 1	5,8	3,3	2,1	1,3
Paciente no. 6 enf. de Glanzmann	13,6	7,3	3,4	2,9
Paciente no. 7 S. Bernard-Soulier	11,9	7,1	4,1	3,1

5.2 La combinación de FT lipiado con SICN aumenta la coagulación en sangre total de pacientes con alteraciones plaquetarias congénitas

Se llevaron a cabo una serie de ensayos de coagulación *in vitro* que mostraron el efecto coagulante del FTr asociado con SICN en sangre total de pacientes con alteraciones plaquetarias congénitas. En la tabla 23 se muestran los resultados obtenidos de dos pacientes con la enfermedad de Glanzmann y con el Síndrome de Bernard-Soulier. Comparando con los ensayos en los que se usaba el FTr solo, el efecto procoagulante de la asociación (FTr + SICN) fue significativamente superior en cada paciente ($p < 0,001$).

Tabla 23

Efecto procoagulante del FTr junto con SICN en sangre total

	Sin SICN	Con SICN
	Muestra control	7,1 ± 0,6
FTr 0,1 µg/ml	1,1 ± 0,9	0,5 ± 0,1 *
	Basal	FTr 0,1 µg/ml + SICN
Paciente no. 6 Enf. Glanzmann	13,6	4,7 *
Paciente no. 7 S. Bernard-Soulier	11,9	4,6 *

*Tiempo de coagulación (expresado en minutos): tiempo que el coágulo necesita para consolidarse en una muestra de sangre no anticoagulada. * $p < 0,001$ sin SICN vs con SICN; t-Student*

35

5.3 El FT lipiado coagula muestras trombocitopénicas

Se llevaron a cabo una serie de ensayos de coagulación *in vitro* que mostraban el efecto coagulante del FT lipiado en plasmas con diferente número de plaquetas. La tabla 24 muestra los resultados obtenidos de un número normal de plaquetas a condiciones trombocitopénicas.

Tabla 24

Efecto del FT lipiado en muestras trombocitopénicas

Número de plaquetas	Sin FT lipiado	Con FT lipiado (1 µg/ml)
350,000/µl	226,3	21,9
150,000/µl	232,6	22,8
50,000/µl	253,9	22,4
9,000/µl	321,2	21,3
< 1,000/µl	> 400	21,3

10

6. Ensayos *in vivo* que demuestran que el FT es un agente útil en el tratamiento antihemorrágico tópico en ratas control (mediante aplicación directa en el vaso sanguíneo previamente seccionado)

15 6.1 El FT lipiado es útil como agente hemostático tópico en un modelo animal de hemorragia severa mediante sección proximal de colas de rata.

Se realizaron ensayos *in vivo* que mostraron que el FT lipiado administrado solo o asociado con SICN es un agente útil en el tratamiento antihemorrágico tópico. Se evaluó el uso del FT lipiado como agente hemostático tópico administrado solo o combinado con SICN mediante el uso de un modelo animal de hemorragia severa mediante sección proximal de colas de rata. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 25. Como se puede observar, en dicho modelo animal de hemorragia severa, la hemorragia coaguló espontáneamente en los animales control (control SSF, tratados con solución salina fisiológica) a los $18,1 \pm 5,98$ minutos; sin embargo, la administración tópica del FT lipiado (solo) produjo una reducción significativa ($11,1 \pm 5,54$ minutos, $p < 0,001$). Cuando se administró el FT lipiado en combinación con una SICN el efecto procoagulante fue incluso mayor ($5,0 \pm 1,1$ minutos, $p < 0,001$).

Tabla 25

Modelo de hemorragia severa mediante sección proximal de cola de ratas. Tiempo de coagulación de sangrado

30

	Tiempo de coagulación de sangrado
Grupo control salino (n=14)	$18,16 \pm 5,98$
Grupo tratado con FT lipiado (n=5)	$11,1 \pm 5,5$
FT lipiado +SICN (n=4)	$5,0 \pm 1,1$

Los resultados se expresan como el tiempo en minutos para alcanzar una coagulación consolidada

35 Se evaluó el FT no lipiado bajo las mismas condiciones experimentales (n=3). No se observaron efectos y el tiempo de coagulación de sangrado fue similar al de los animales control. Estos resultados indican que el FT no lipiado no es útil para el tratamiento tópico de episodios de sangrado.

40 6.2 El FT lipiado es útil como agente hemostático tópico en un modelo animal de hemorragia severa previamente tratado con heparina o warfarina

Se realizaron ensayos *in vivo* que mostraron que el FT lipiado administrado solo es un agente útil en el tratamiento antihemorrágico tópico en condiciones anticoagulantes (Tabla 25). Se evaluó el uso del FT lipiado como agente hemostático tópico administrado solo mediante el empleo de un modelo animal de hemorragia severa mediante la sección proximal de colas de rata previamente tratadas con 200 U/Kg de heparina i.v. 15 minutos antes de comenzar el procedimiento de la transección de la cola o con 0,1 mg/kg/día por vía oral de warfarina durante 3 días antes de empezar el procedimiento de transección de la cola. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 26. Como puede observarse, en dicho modelo de hemorragia severa, el grupo de control salino, tratado con solución salina fisiológica, coaguló espontáneamente a los $18,1 \pm 5,98$ minutos. El grupo control tratado con heparina no coaguló la

hemorragia de forma espontánea (> 90 minutos). El grupo tratado con warfarina coaguló espontáneamente a los $41,6 \pm 8,5$ minutos. La tabla 26 muestra que la administración tópica del FT lipidado (solo) produjo una reducción significativa en todos los grupos de tratamiento.

5 **Tabla 26**

Modelo de hemorragia severa mediante sección proximal de colas de rata en animales tratados con anticoagulante. Tiempo de coagulación de sangrado

	Tiempo de coagulación de sangrado (min)
Grupo control salino (n=14)	18,16 \pm 5,98
Grupo control tratado con heparina (n=5)	> 90
Grupo control tratado con warfarina (n=2)	41,6 \pm 8,5
Grupo tratado con heparina (n=3) + FT lipidado	26,3 \pm 2,5
Grupo tratado con warfarina (n=3) + FT lipidado	4,5 \pm 2,5

10 *Los resultados se expresan como el tiempo en minutos para alcanzar una coagulación consolidada*

6.3 El FT lipidado es útil como agente hemostático tópico en un modelo animal de hemorragia letal mediante punción en la arteria carótida.

15 Se realizaron ensayos *in vivo* que mostraron que el FTr administrado solo es un agente útil para el tratamiento antihemorrágico tópico directamente aplicado en el vaso sanguíneo. Se evaluó el uso del FTr administrado solo mediante el uso de un modelo animal de hemorragia letal mediante punción de la arteria carótida. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 27 y fueron muy significativos. Como puede observarse, en el grupo de animales control, (control SSF, tratados con solución salina fisiológica), todos los animales murieron por sangrado, mientras que en el grupo del FT lipidado no murió ningún animal y la sección se pudo sellar y coagular satisfactoriamente en todos los casos. El tratamiento fue efectivo en términos de tiempo necesario para alcanzar una coagulación estable y el sellado de la herida de punción.

Tabla 27

25 **Modelo de hemorragia letal por punción en arteria carótida de ratas**

	Control SF		FTr
animal no. 1	muerto	animal no. 3	125
animal no. 2	muerto	animal no. 4	135
<i>Media \pm DE</i>			<i>130 \pm 7.1</i>

Los resultados se expresan como el tiempo en segundos para alcanzar una coagulación consolidada y el sellado de la herida de punción. El FTr administrado como se indica en el texto a una dosis de 2 μ g de proteína activa

30 En conclusión:

Los resultados del Ejemplo número 1 demuestran claramente que:

- 35 1) en ausencia de su ligando, FVII, el FT lipidado es capaz de interactuar directamente con el FXa aumentando significativamente su actividad proteolítica (tanto la amidolítica como la formadora de trombina), estos resultados muestran por primera vez un nuevo papel del FT lipidado, actuando como nuevo cofactor para el FXa (independiente del bien conocido FVa).
- 40 2) El FT lipidado es capaz de coagular plasmas deficientes en FVII. Por tanto, el FT lipidado es una buena alternativa para el tratamiento de estos pacientes (actualmente el único tratamiento es el caro FVIIa recombinante).
- 3) El FT lipidado actúa sinérgicamente con SICN y FXa (a bajas concentraciones incapaz de producir coagulación).

Los resultados del Ejemplo número 2 demuestran claramente que:

- 45 1) El FT lipidado produce que concentraciones fisiológicas de FXa, incapaces de producir ningún efecto procoagulante significativo, desencadenen la hidrólisis de la protrombina y consecuentemente tiene lugar la formación de trombina.
- 50 2) El FT lipidado tiene un nuevo papel actuando como cofactor para todas las actividades proteolíticas de todas las formas de FXa (soluble y unido al complejo protrombinasa).

- 3) Incluso en plasmas deficientes en FX (que contienen trazas de FX) pueden coagularse por el FT lipidado. Por tanto, el FT lipidado es una buena alternativa para el tratamiento de estos pacientes,
- 4) El FT lipidado actúa de forma sinérgica con una SICN en la estimulación de la actividad del FXa.

5 Los resultados del Ejemplo número 3 demuestran claramente que:

- 1) El FT lipidado es capaz de producir la coagulación sanguínea en pacientes hemofílicos (FVIII, FIX y FXI). Por tanto, el FT lipidado es una buena alternativa para el tratamiento de estos pacientes.
- 10 2) El FT lipidado es capaz de producir la coagulación sanguínea incluso en ausencia de FV. Estos resultados muestran claramente que el FT lipidado produce un efecto estimulador fuerte en FXa, porque en ausencia de su cofactor (plasmas deficientes en FV), el FT lipidado actúa como cofactor causando el mismo efecto estimulador.
- 15 3) El FT lipidado es capaz de producir la coagulación sanguínea incluso en plasmas deficientes en FX (que contiene trazas de FX). Por tanto, el FT lipidado es una alternativa para el tratamiento de estos pacientes.
- 4) El FT lipidado es capaz de producir la coagulación sanguínea en plasmas tratados con heparina y warfarina, indicando, que el FT lipidado interfiere en el efecto de la antitrombina III y probablemente a través de su efecto estimulador a concentraciones de FXa basales puede incluso coagular en condiciones de tratamiento con warfarina.
- 20 5) Finalmente, el FT lipidado actúa sinérgicamente con SICN en el efecto procoagulante observado en todas las deficiencias en factores de coagulación.

Los resultados del Ejemplo número 4 demuestran claramente que:

- 25 1) El FT lipidado es capaz de producir la coagulación sanguínea en sujetos sanos. Por tanto, el FT lipidado es una buena alternativa para el tratamiento de episodios de sangrado en sujetos sanos.
- 2) El FT lipidado actúa sinérgicamente con SICN pero no solo con fosfolípidos en el efecto procoagulante observado en sujetos sanos.

30 Los resultados del Ejemplo número 5 demuestran claramente que:

- 1) El FT lipidado es capaz de producir la coagulación sanguínea en sujetos con alteraciones plaquetarias, como congénitas y adquiridas (p. ej. trombocitopenia). Por tanto, el FT lipidado es una buena alternativa para el tratamiento de episodios de sangrado en pacientes con alteraciones en el número y/o funcionalidad de las plaquetas.

Los resultados del Ejemplo número 6 demuestran claramente que:

- 40 1) El FT lipidado administrado tópicamente es capaz de parar el sangrado en un modelo animal de hemorragia severa (transección proximal total en cola).
- 2) El FT lipidado administrado tópicamente es capaz de parar el sangrado in un modelo animal de hemorragia severa (transección proximal total en cola) complicada con una terapia de anticoagulación (heparina o warfarina).
- 45 3) El FT lipidado administrado tópicamente es capaz de parar el sangrado en un modelo animal de hemorragia letal (punción carótida en la arteria carótida).

REIVINDICACIONES

1. Factor Tisular (FT) lipidado, o un fragmento funcional lipidado del mismo, para usar en el tratamiento tópico de hemorragias en un sujeto, con la condición que:
- 5 (i) el FT lipidado no es un FT de mamífero recombinante o un fragmento funcional del mismo obtenido de plantas transgénicas, y
(ii) el FT lipidado no es un FT lipidado que tiene un 70% de PC y un 30% de PS y que comprende un FT producido en E. coli que tiene la secuencia
- 10 SGTNTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTD
TECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLG
QPTIQSFEQVGTKNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSG
KKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
IFYIIGAVVFVVIILVILAI SLH.
- 15 2. Factor Tisular (FT) lipidado, o un fragmento funcional lipidado del mismo según la reivindicación 1, en donde el sujeto es un sujeto sano.
3. Factor Tisular (FT) lipidado, o un fragmento funcional lipidado del mismo para usar en el tratamiento tópico de una hemorragia en un sujeto, en donde dicho sujeto es un sujeto con una diátesis hemorrágica, donde dicha diátesis hemorrágica comprende una coagulopatía y/o una alteración plaquetaria.
- 20 4. Factor Tisular (FT) lipidado, o un fragmento funcional lipidado del mismo según la reivindicación 3, en donde dicha coagulopatía es una coagulopatía congénita o una coagulopatía adquirida.
- 25 5. Factor Tisular (FT) lipidado, o un fragmento funcional lipidado del mismo según la reivindicación 4, en donde dicha coagulopatía congénita es una coagulopatía basada en una deficiencia en un factor de coagulación seleccionado entre Factor de coagulación V, Factor de coagulación VII, Factor de coagulación VIII, Factor de coagulación IX, Factor de coagulación X, Factor de coagulación XI, Factor de coagulación XII, Factor de coagulación XIII y combinaciones de los mismos.
- 30 6. Factor Tisular (FT) lipidado, o un fragmento funcional lipidado del mismo según la reivindicación 4, donde dicho sujeto tiene una coagulopatía adquirida producida por un tratamiento anticoagulante con anticoagulantes.
7. Factor Tisular (FT) lipidado, o un fragmento funcional lipidado del mismo según la reivindicación 6, donde los anticoagulantes son heparina, heparinas de bajo peso molecular, warfarina, derivados de cumarina o dicumarinas.
- 35 8. Factor Tisular (FT) lipidado, o un fragmento funcional lipidado del mismo según la reivindicación 3, en donde dicho sujeto presenta una alteración plaquetaria congénita o adquirida.
- 40 9. Factor Tisular (FT) lipidado, o un fragmento funcional lipidado del mismo según la reivindicación 8, en donde dicha alteración plaquetaria congénita se selecciona entre la enfermedad de Glanzmann, el síndrome de Bernard Soulier, el síndrome de Bolin-Jamieson, el síndrome de Wiskott-Aldrich, el síndrome de Paris-Trousseau-Jacobsen, la trombocitopenia del cromosoma X, el síndrome plaquetario de Gray, el síndrome de Sebastián y la anemia de Fanconi.
- 45 10. Factor Tisular (FT) lipidado, o un fragmento funcional lipidado del mismo según la reivindicación 8, en donde dicha alteración plaquetaria adquirida se selecciona entre un trastorno mieloproliferativo, tal como trombocitemia, policitemia, o leucemia mielocítica crónica; metaplasia mieloide; disproteinemias en escorbuto, en la enfermedad cardíaca congénita y en cirrosis.
- 50 11. Factor Tisular (FT) lipidado, o un fragmento funcional lipidado del mismo según la reivindicación 1, en donde dicho FT lipidado es FT lipidado humano.
12. Producto que comprende (i) FT lipidado y (ii) factor X de coagulación activado (FXa) de manera separada o como combinación para usar en su administración simultánea o sucesiva a un sujeto.
- 55 13. Producto que comprende (i) FT lipidado y (ii) superficie inorgánica cargada negativamente (SICN) ya sea de manera separada o como combinación para usar en su administración simultánea o sucesiva a un sujeto, en donde SICN es una mezcla de un lípido y un acelerador de coagulación sanguínea, en donde el acelerador de coagulación sanguínea se selecciona del grupo de ácido elálgico, zeolita, sílice y materiales de óxido inorgánico, en donde el lípido se selecciona del grupo de un esfingolípido y un lípido con base glicerol, en donde el esfingolípido se selecciona del grupo de ceramida-1-fosfato, fosfatidiletanolamina glicosilada, sulfatidos hidroxilados y no

hidroxilados y gangliósidos y, en donde el lípido con base glicerol se selecciona del grupo de fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilinositol fosfato, ácido fosfatídico, fosfatidilgliceroles y cardioplipina.

14. Producto que comprende (i) FT lipidado, (ii) FXa y (iii) SICN ya sea de manera separada o una combinación para
5 usar en su administración simultánea o sucesiva a un sujeto, en donde la SICN es una mezcla de un lípido y un
acelerador de la coagulación sanguínea, en donde el acelerador de coagulación sanguínea se selecciona del grupo
de ácido elálgico, zeolita, sílice y materiales de óxido inorgánico, en donde el lípido se selecciona del grupo de un
esfingolípido y un lípido con base glicerol, en donde el esfingolípido se selecciona del grupo de ceramida-1-fosfato,
fosfatidiletanolamina glicosilado, sulfatidos hidroxilados y no hidroxilados y gangliósidos y, en donde el lípido con
10 base glicerol se selecciona del grupo de fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilinositol fosfato, ácido fosfatídico,
fosfatidilgliceroles y cardioplipina.

15. Producto para usar según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde dicho FT lipidado es un FT
lipidado humano.

16. Producto para usar según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, como medicamento.

17. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 para usar en el tratamiento de hemorragias en un
sujeto.

18. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 para usar en el tratamiento tópico de hemorragias en
un sujeto.

19. Complejo (FT::FXa) que comprende FT lipidado y FXa.

20. Complejo FT:SICN que comprende FT lipidado y SICN, en donde SICN es una mezcla de un lípido y un
acelerador de la coagulación sanguínea, en donde el acelerador de coagulación sanguínea se selecciona del grupo
de ácido elálgico, zeolita, sílice y materiales de óxido inorgánico, en donde el lípido se selecciona del grupo de un
esfingolípido y un lípido con base glicerol, en donde el esfingolípido se selecciona del grupo de ceramida-1-fosfato,
fosfatidiletanolamina glicosilado, sulfatidos hidroxilados y no hidroxilados y gangliósidos y, en donde el lípido con
30 base glicerol se selecciona del grupo de fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilinositol fosfato, ácido fosfatídico,
fosfatidilgliceroles y cardioplipina.

21. Complejo FT::FXa::SICN que comprende FT lipidado, FXa y SICN, en donde SICN es una mezcla de un lípido y
un acelerador de la coagulación sanguínea, en donde el acelerador de coagulación sanguínea se selecciona del grupo
de ácido elálgico, zeolita, sílice y materiales de óxido inorgánico, en donde el lípido se selecciona del grupo de
un esfingolípido y un lípido con base glicerol, en donde el esfingolípido se selecciona del grupo de ceramida-1-
fosfato, fosfatidiletanolamina glicosilado, sulfatidos hidroxilados y no hidroxilados y gangliósidos y, en donde el lípido
con base glicerol se selecciona del grupo de fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilinositol fosfato, ácido
40 fosfatídico, fosfatidilgliceroles y cardioplipina.

22. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 para usar como medicamento.

23. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 para usar en el tratamiento de hemorragias en un
sujeto.

24. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 para usar en el tratamiento tópico de hemorragias en
un sujeto.

25. Composición farmacéutica que comprende:

(a) un producto según la reivindicación 12, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable; o
(b) separadamente (i) FT lipidado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y (ii) FXa junto con un
vehículo farmacéuticamente aceptable; o

(c) un producto de acuerdo con la reivindicación 13, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable; o
(d) de manera separada, (i) FT lipidado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y (ii) SICN junto con
un vehículo farmacéuticamente aceptable,

en donde SICN es una mezcla de un lípido y un acelerador de la coagulación sanguínea, en donde el
acelerador de coagulación sanguínea se selecciona del grupo de ácido elálgico, zeolita, sílice y materiales
de óxido inorgánico, en donde el lípido se selecciona del grupo de un esfingolípido y un lípido con base
glicerol, en donde el esfingolípido se selecciona del grupo de ceramida-1-fosfato, fosfatidiletanolamina
glicosilado, sulfatidos hidroxilados y no hidroxilados y gangliósidos y, en donde el lípido con base glicerol

se selecciona del grupo de fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilinositol fosfato, ácido fosfatídico, fosfatidilgliceroles y cardiopina; o

- 5 (e) producto según la reivindicación 14, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable; o
 (f) de manera separada, (i) FT lipidado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, (ii) FXa junto con un
 vehículo farmacéuticamente aceptable, y (iii) SICN junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable,
 en donde SICN es una mezcla de un lípido y un acelerador de la coagulación sanguínea, en donde el
 10 acelerador de coagulación sanguínea se selecciona del grupo de ácido elágico, zeolita, sílice y materiales
 de óxido inorgánico, en donde el lípido se selecciona del grupo de un esfingolípido y un lípido con base
 glicerol, en donde el esfingolípido se selecciona del grupo de ceramida-1-fosfato, fosfatidiletanolamina
 glicosilado, sulfatidos hidroxilados y no hidroxilados y gangliósidos y, en donde el lípido con base glicerol
 se selecciona del grupo de fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilinositol fosfato, ácido fosfatídico,
 fosfatidilgliceroles y cardiopina; o
 (g) un complejo FT::FXa según la reivindicación 19 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, o
 (h) un complejo FT::SICN según la reivindicación 20 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, o
 15 (i) un complejo FT::FXa::SICN según la reivindicación 21 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

26. Composición farmacéutica según la reivindicación 15 en una forma de administración farmacéutica para su administración tópica.

20 27. Producto que comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 26 y un soporte.

28. Producto que comprende una composición farmacéutica que comprende:

- 25 (i) un soporte y
 (ii) un producto o complejo seleccionado del grupo que consiste en:
- 30 (i) un producto según la reivindicación 12 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable,
 (ii) un producto según la reivindicación 13 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable,
 (iii) un producto según la reivindicación 14 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, o
 (iv) un complejo FT::FXa según la reivindicación 19 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, o
 (v) un complejo FT::SICN según la reivindicación 20 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, o
 (vi) un complejo FT::FXa::SICN según la reivindicación 21 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1
Concentraciones basales de FXa y formación del coágulo de fibrina

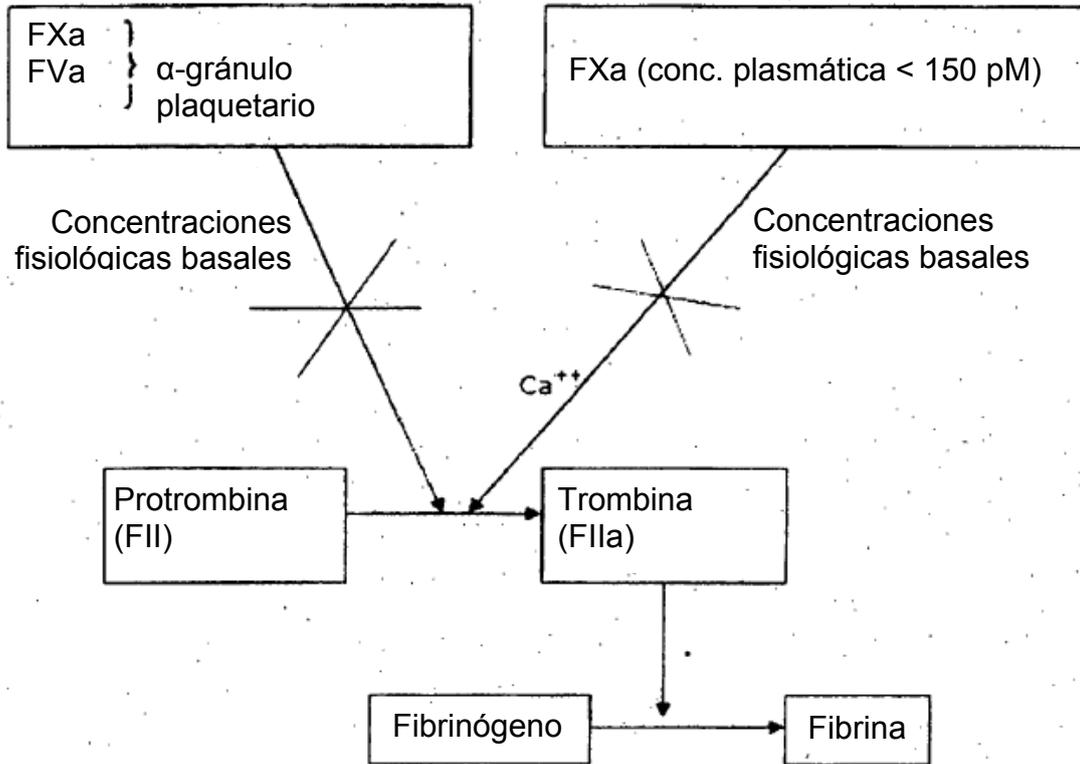


Figura 2
Rutas extrínseca e intrínseca clásicas

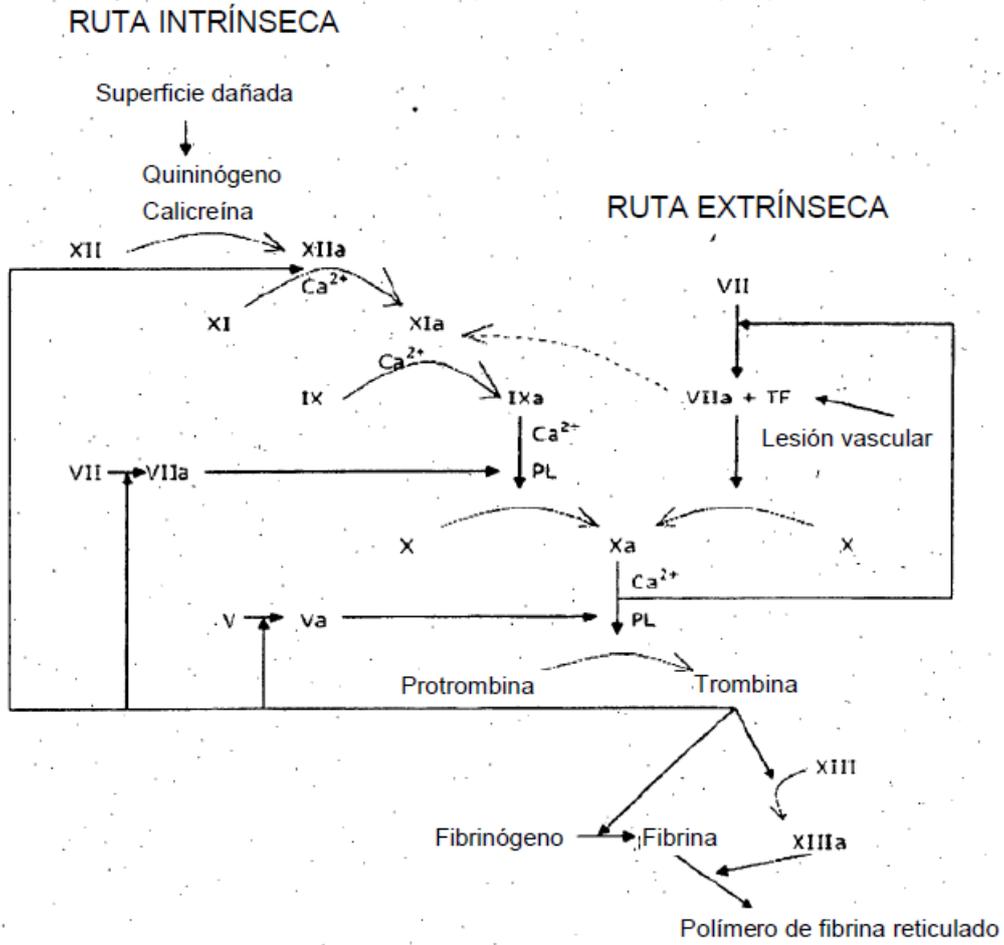
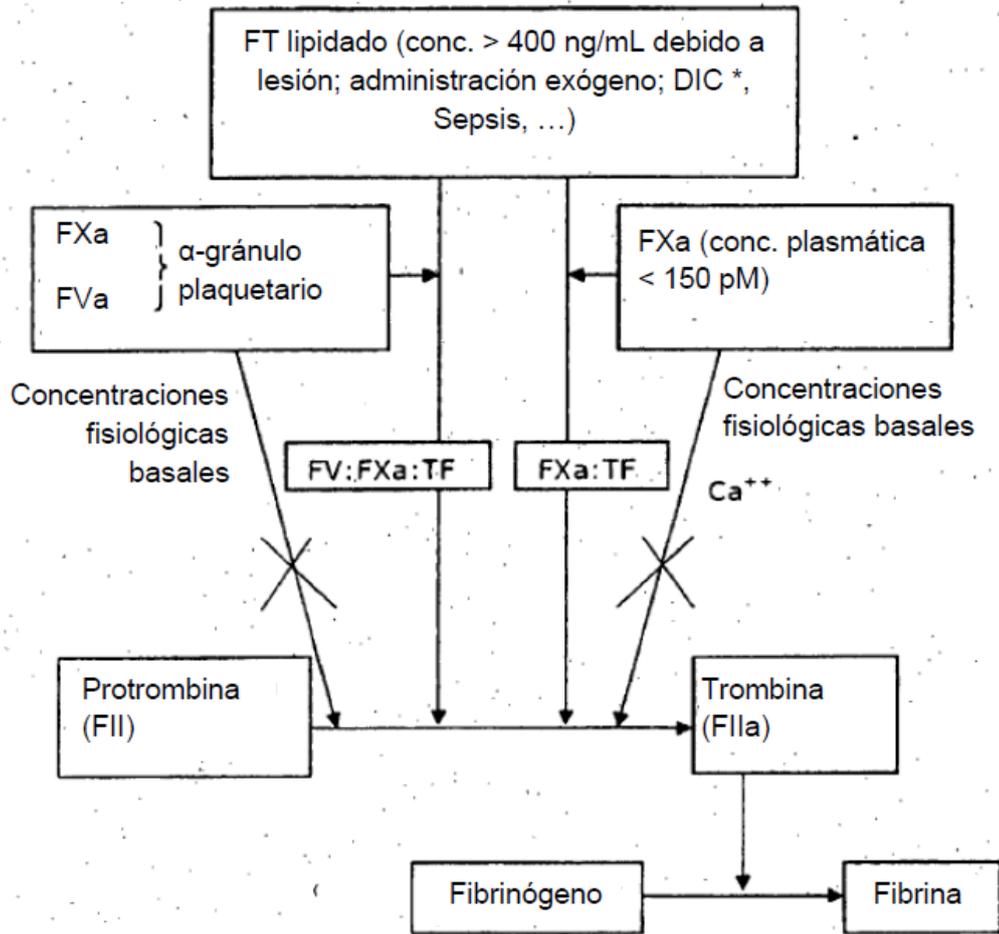


Figura 3

Nuevo efecto regulador del FT lipiado como estimulador de FXa



* DIC: Coagulación Intravascular Diseminada