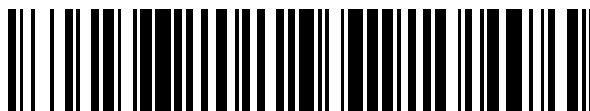


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 978**

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: **16.09.2010** **E 10759797 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014** **EP 2346527**

54 Título: **Especialidades farmacéuticas para el tratamiento de trastornos de coagulación de la sangre que contienen concentrado de factor Xla sin trombina**

30 Prioridad:

16.09.2009 EP 09450173

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

06.04.2015

73 Titular/es:

BIO & BIO LICENSING SA (100.0%)
2 bis, rue Astrid
1143 Luxembourg, LU

72 Inventor/es:

EIBL, JOHANN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 532 978 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

Especialidades farmacéuticas para el tratamiento de trastornos de coagulación de la sangre que contienen concentrado de factor Xla sin trombina

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a un concentrado de factor Xla sin trombina ni pirógenos, viralmente seguro y al uso de un concentrado de factor Xla viralmente seguro para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos de coagulación.

Las lesiones del organismo pueden producir hemorragia grave, con pérdida de sangre masiva e incluso letal. El organismo se protege contra la pérdida de sangre grave por un mecanismo hemostático, que produce que la sangre que sale se coagule, por lo cual la hemorragia se controla y la herida se cierra. Se ha realizado investigación en el proceso hemostático durante el último siglo, y aunque se ha ganado un entendimiento básico, aún está en marcha.

Según el presente entendimiento, la rotura de los vasos expone sustancias que desencadenan la coagulación de la sangre, de modo que se puede formar un trombo hemostático. El trombo contiene una red de fibrina y plaquetas, el recuento de plaquetas supera el recuento sanguíneo de 20 a 200 veces. El trombo se adhiere a, y cierra, el sitio lesionado. La importancia del papel de las plaquetas en la hemostasia se puede ilustrar por el hecho de que pacientes con afibrinogenemia no tienden a sangrar profusamente, mientras que pacientes con trombocitopenia grave puede padecer hemorragias no controlables.

El proceso de coagulación de la sangre implica componentes sanguíneos individuales tal como células sanguíneas, micropartículas y plasma sanguíneo. La coagulación de la sangre se produce cuando el fibrinógeno como una proteína soluble en el plasma sanguíneo se convierte en fibrina insoluble por la acción enzimática de la trombina, una enzima que separa el fibrinógeno en monómeros de fibrina soluble y fibrinopéptidos A y B. Los monómeros de fibrina agregan a complejos de monómeros de fibrina y por último a fibrina insoluble. En pacientes con coagulación de la sangre normal, solo aproximadamente un cuarto del fibrinógeno que estaba presente en la cantidad de sangre de la que se forma un coágulo, se convierte en fibrina. La conversión adicional de fibrinógeno en el coágulo depende de la cantidad de trombina generada en el mismo (Kumar R, et al.).

La trombina resulta de la protrombina por activación al final de la cascada de enzimas, donde los factores de coagulación que son proenzimas se activan en factores de coagulación activados que son enzimas en un orden predeterminado. Los factores de coagulación que no son proenzimas son pro-cofactores, que se convierten enzimáticamente en cofactores. Cada cofactor aumenta la conversión enzimática de una proenzima específica en una enzima (Mann KG, et al.).

La cascada de enzimas que produce trombina se puede dividir en cuatro rutas diferentes, la ruta extrínseca, la intrínseca, y la común, y además, la denominada fase de contacto. El presente entendimiento es que en un vaso sanguíneo lesionado, el factor tisular, una lipoproteína unida a células, inicia la ruta extrínseca formando un complejo con el factor VIIa, y este complejo activa el factor X a factor Xa. El factor Xa forma otro complejo enzimático, denominado protrombinasa, que genera trombina a partir de protrombina. Esta ruta, donde el factor Xa genera trombina, se llama la ruta común. La generación del factor Xa por la ruta extrínseca se interrumpe pronto por el inhibidor de la ruta del factor tisular. Como consecuencia, solo se pueden generar pequeñas cantidades de trombina a través de las rutas extrínseca y común. Las pequeñas cantidades de trombina, sin embargo, desencadenan la activación de la ruta intrínseca. Mediante la activación de la ruta intrínseca se activan grandes cantidades de factor X, de modo que se genera trombina en exceso a través de la ruta común. A qué nivel las plaquetas y la fase de contacto contribuyen a la activación de la ruta intrínseca es todavía materia de discusión (Walsh P).

En pacientes que padecen trastornos de coagulación graves toda su vida, incluso sucesos traumáticos menores pueden producir hemorragias incontrolables. Tales pacientes bien han heredado las deficiencias de factores de coagulación específicos o han adquirido las deficiencias en el curso de sus vidas. Los trastornos hemorrágicos de este tipo se denominan hemofilia. La mayoría de los pacientes que padecen hemofilia grave tienen una deficiencia del factor de coagulación VIII (Brown S).

El factor de coagulación VIII es un pro-cofactor, que se transforma enzimáticamente en un cofactor a través de la ruta intrínseca. Este cofactor acelera la activación del factor X por tenasa, un complejo del factor VIII-IX activado, drásticamente, de modo que se puede formar un exceso de trombina a través de la ruta común. La trombina convierte el fibrinógeno y el factor XIII en fibrina y factor XIIIa, respectivamente. El factor XIIIa, una transglutaminasa, produce que la fibrina formada se entrecruce, lo que produce una adhesión aumentada de la sangre coagulada a los bordes de la herida. En el curso adicional, TAFI, una proenzima, se activa a TAFIa. TAFIa separa el péptido receptor para plasmina de fibrina, haciendo la fibrina entrecruzada más resistente contra la lisis. Estos procesos enzimáticos producen una estabilidad aumentada del coágulo, un aumento en su elasticidad, y un aumento en su resistencia a lisis.

Los pacientes con deficiencia en factor VIII forman trombos hemostáticos con dificultad solo. Si forman un trombo, el trombo es frágil y se disolverá en breve por procesos fibrinolíticos, siendo la razón que la ruta extrínseca está alterada en el coágulo y solo se genera una cantidad de trombina insuficiente en el coágulo (Sixma J, et al.).

- 5 Una vez que se hizo posible producir concentrados de factor de coagulación VIII como parte del fraccionamiento del plasma humano, los hemofílicos con deficiencia en factor VIII se pudieron tratar tan exitosamente que su vida media de 15 años se pudo prolongar hasta la de una persona normal.

10 Se entendió gradualmente que un porcentaje considerable de pacientes que habían sido tratados con éxito con concentrados de factor VIII se volvieron resistentes a los mismos productos con lo que habían sido tratados. Las investigaciones del fenómeno llevaron a la conclusión de que esos pacientes desarrollaron anticuerpos contra el factor VIII homólogo que habían recibido, que inhibían en gran parte la función del factor VIII en el proceso de coagulación. Tales hemofílicos, de aquí en adelante denominados pacientes inhibidores del factor VIII, padecían el mismo destino que pacientes deficientes en factor VIII antes de la disponibilidad de concentrados de factor VIII (van den Berg H, et al.). El mismo proceso patológico se produce en pacientes deficientes en factor IX según se vuelven resistentes a la terapia de sustitución con concentrados de factor IX.

20 En la década de 1970, los pacientes inhibidores del factor VIII se trataron sin éxito con diferentes especialidades farmacéuticas hemostáticas. Se supo que solo ciertos lotes de productos que contenían complejo de protrombina eran eficaces. Las especialidades farmacéuticas que contienen complejo de protrombina contienen varios factores de coagulación dependientes de vitamina K, predominantemente factores II, IX, X y VII, y, dependiendo del proceso de producción, esos factores pueden estar en parte presentes en forma activada (Kelly P, et al. y Kurczynski E, et al.). El Baxter Group tuvo éxito después en la producción de tales preparaciones de complejos de protrombina parcialmente activados y en comercializarlos mediante el nombre comercial de "Autoplex" (Fekete L, et al.).

25 Aproximadamente al mismo tiempo, Immuno AG tuvo éxito en desarrollar un producto para el tratamiento del mismo grupo de pacientes, que puentea la alteración en la cascada de coagulación y normaliza la coagulación (Eibl J, et al. y Turecek P, et al.). Este producto se introdujo mediante el nombre de "FEIBA". Después de que Baxter Group adquiriera Immuno AG en 1998, Baxter suspendió la producción de Autoplex y siguió produciendo y distribuyendo FEIBA en todo el mundo.

30 A principios de la década de 1980, Novo Nordisk A/S introdujo un producto de factor VIIa recombinante (Hedner U, et al.) mediante el nombre de "NovoSeven" (Hedner U) para el tratamiento de pacientes con inhibidores de factor VIII y factor IX y otros trastornos hemorrágicos (Roberts H, et al.). Por tanto, dos empresas se convirtieron en líderes en especialidades farmacéuticas parenterales para el tratamiento de hemofílicos con inhibidores. Según permite la estimación, aproximadamente el 90% del mercado hoy está cubierto por FEIBA y NovoSeven, representando unas ventas anuales de 1,5 mil millones de dólares, NovoSeven representa aproximadamente el 60% y FEIBA aproximadamente el 40%.

40 La publicación más reciente sobre la eficacia de FEIBA y NovoSeven evaluados en un ensayo multicentro comparativo no describe ninguna diferencia significativa en el porcentaje de pacientes que dejaron de sangrar a las seis horas del tratamiento. Tampoco ha habido una diferencia en el índice de sucesos adversos, particularmente trombosis (Astermark J, et al.).

45 Jan Astermark y col han mostrado que el tratamiento con esos productos produjo hemostasia rápida en solo la mitad de los pacientes. En aproximadamente el 25 por ciento de los pacientes, la hemostasia se produjo solo después de dosis repetidas de Feiba o NovoSeven, y solo después de un periodo de tiempo prolongado. Otro 25 por ciento tenía bien hemostasia insuficiente o la hemorragia no se pudo controlar en absoluto. La frecuencia de sucesos adversos, particularmente trombosis, era la misma en cualquier grupo.

50 Desde la introducción y uso exitoso de estas preparaciones farmacéuticas, ha habido especulación sobre su modo de acción. En paralelo, e independientemente del mismo, el entendimiento del proceso de coagulación mismo ha cambiado y mejorado durante los últimos 30 años. Sin embargo, no se ha alcanzado opinión uniforme o definitiva sobre su modo de acción (Roberts H, et al.).

55 **Compendio de la invención**

60 El objetivo de la invención es proporcionar una especialidad farmacéutica para uso parenteral que sea eficaz en alcanzar control rápido y sostenido de hemorragia en pacientes con trastornos de coagulación, y en particular, pacientes con inhibidores para los factores VIII o IX, y uno que será más seguro que los productos actualmente en el mercado en términos de sucesos adversos, incluso si se da a dosis altas. Además, el coste de producirlo no debe ser mayor que los que los productos actualmente en el mercado. La mejora del proceso de coagulación en estos pacientes debe consistir no solo en un acortamiento de los tiempos de coagulación y hemorragia sino ser principalmente logrado en el coágulo mismo, donde se debe generar una cantidad de trombina que se compare con esa en una persona sana.

Para que un producto se administre por vía parenteral, es importante que no contenga actividad trombina y/o que no genere trombina antes de la administración. Los concentrados de factor XI puro no contienen trombina y no generan trombina durante el almacenamiento ni durante la liofilización, reconstitución o antes de la administración. Cuando se añaden otros factores de coagulación, no activados y activados para la formulación, se necesita usar mucho cuidado para mantener esta ausencia de trombina. Lo último es de extrema importancia para la seguridad del producto, la aplicación parenteral de trombina tiene el potencial de crear trombosis o CID. Cuando se produce trombina para aplicación tópica, se puede usar factor XI o factor XIa en el proceso de producción y se puede, si así se desea, eliminar en el curso posterior de producción sin que la actividad tópica de la trombina afecte a la hemostasia en ninguna manera negativa.

En la mayoría de los pacientes que padecen hemofilia, sea debido a la falta de factor VIII o factor IX, la ruta de coagulación intrínseca está fuertemente disminuida. Esto es particularmente cierto de pacientes que tienen anticuerpos contra uno u otro de estos factores. En personas con coagulación de la sangre normal, más del 90% de la trombina se genera por la ruta intrínseca, tres cuartos de la trombina se forman en el coágulo mismo. En pacientes con hemofilia, la cantidad de trombina generada en el coágulo es insuficiente, de modo que no pueden formar coágulos de sangre que persistan durante un periodo extendido de tiempo como sería necesario para sostener la hemostasia.

Según la invención, se puede generar una ruta intrínseca alternativa por factores activados de la fase de contacto en presencia de fibrina y/o complejos de monómeros de fibrina. Cuando se añade el factor XI, completa o parcialmente activado, a la sangre, plasma rico en plaquetas o pobre en plaquetas de los pacientes con hemofilia, la generación de trombina en el coágulo se normaliza. Esto mejora la calidad del coágulo formado considerablemente, lo que se refleja en un aumento en el módulo de elasticidad y la resistencia frente a la lisis.

La inactivación de virus por solvente/detergente se logra mejor antes de la purificación cromatográfica del factor o factores, de modo que el solvente/detergente se puede separar. Se puede lograr eliminación adicional de virus mediante nanofiltración, ultrafiltración, y/o calentamiento en estado liofilizado. Los factores o cofactores seguros respecto a virus activados, parcialmente activados o no activados y sus derivados se almacenan después a temperatura de nevera o congelados antes de la formulación de la especialidad farmacéutica.

Para estabilizar los factores XII y XI y sus derivados, se añade cininógeno de alto peso molecular, un cofactor de la fase de contacto, preferiblemente cininógeno pobre en bradicinina. De la misma manera, se puede usar el cininógeno de alto peso molecular de cadena larga separado por reducción.

Para acelerar el proceso de coagulación y hemostasia, se pueden añadir factores activados y no activados del complejo de protrombina durante la formulación.

Tales factores de coagulación activados o no activados así como concentrados de factor XIa formulados deben estar libres de trombina o deben no generar trombina antes de la aplicación.

El tratamiento con factores, en particular con factores activados de la fase de contacto, puede estar acompañado por un riesgo de trombosis. Para reducir este potencial riesgo, se añaden serpinas de baja avidéz u otros inhibidores de proteasas homólogos a los concentrados de factor de coagulación de la fase de contacto para prevenir la activación durante el almacenamiento y/o aplicación.

La adición de serpinas de baja avidéz u otros inhibidores de proteasas apropiados puede prevenir la autoactivación de factores de coagulación no activados, hasta el nivel presente en la especialidad farmacéutica, durante el almacenamiento y/o aplicación.

Por tanto, la invención se dirige al uso de un concentrado de factor XIa sin trombina o un concentrado de factor de coagulación sin trombina que contiene factor XIa para la producción de una preparación farmacéutica aplicable por vía parenteral que no forma trombina durante o después de la liofilización, almacenamiento y reconstitución.

Una forma de realización preferida se refiere al uso de la preparación farmacéutica según la presente invención que contiene serpinas y/o cininógeno de alto peso molecular o sus productos separados.

Según una forma de realización preferida, la preparación farmacéutica se nanofiltrar para mejorar la seguridad vírica, bien antes o después de la formulación, preferiblemente por nanofiltros con un diámetro de poro de ≤ 20 nm o se filtra mediante un ultrafiltro de 1000 kDalton.

La preparación farmacéutica como se usa según la invención preferiblemente se hace víricamente segura mediante tratamiento con solvente/detergente y posterior eliminación del solvente y detergente.

La preparación farmacéutica como se usa según la invención se puede cargar en condiciones estériles y sin pirógenos y se puede liofilizar e inactivar víricamente calentando las preparaciones farmacéuticas cargadas, liofilizadas a no menos de 90°C y no más de 140°C durante 30 a 180 minutos.

La invención también divulga un concentrado de factor Xla sin trombina o un concentrado de factor de coagulación sin trombina que contiene factor Xla, caracterizado en que se obtiene por fraccionamiento de plasma o suero o por ingeniería genética.

El concentrado de factor Xla sin trombina o concentrado de factor de coagulación sin trombina que contiene factor Xla como se usa según la invención o la preparación farmacéutica como se usa según la invención son preferiblemente víricamente seguros y sin pirógenos.

El concentrado de factor Xla sin trombina o el concentrado de factor de coagulación sin trombina que contiene factor Xla según la invención como se ha descrito anteriormente se puede usar como un principio activo para la producción de un medicamento para el tratamiento de trastornos de coagulación.

Breve descripción de las figuras

La determinación tromboelastográfica de los defectos de coagulación y su normalización se conoce en la técnica. En lo siguiente, se usó el tromboelastógrafo ROTEG 05 de la empresa Pentapharm GmbH, Kreillerstraße 21, D-81673 Múnich, Alemania.

Descripción del proceso de medida tromboelastográfica: Las células de medida del tromboelastógrafo de la empresa Pentapharm GmbH, Múnich consiste en una cubeta y un tapón, que se insertan en el dispositivo de medida. La cubeta se llena con los materiales que se van a ensayar antes de la inserción, se calienta a 37°C, y el tapón se inserta en consecuencia. El tiempo de medida es 60-150 minutos, y el proceso de formación del coágulo se sigue usando los siguientes parámetros:

- a. Tiempo de coagulación (TC). El TC es el intervalo de tiempo desde el punto de partida hasta la aparición de una amplitud de 2 mm.
- b. Tiempo de formación del coágulo (TFC). El TFC es el intervalo de tiempo en el que la amplitud aumenta de 2 a 20 mm.
- c. Ángulo α . El ángulo α es el parámetro que resulta del ángulo de la línea media y la tangente de la curva de la amplitud.
- d. Índice de formación del coágulo (CFR). El CFR es el ángulo más amplio de la pendiente de la curva de la amplitud entre su tangente y la línea media.
- e. Máxima formación de coágulo (MFC). La MFC es la mayor distancia de la curva de la amplitud desde la línea media.
- f. Tiempo de MFC (MFC-t). El MFC-t es el intervalo de tiempo desde el punto temporal de coagulación hasta el punto temporal de alcanzar la máxima firmeza del coágulo.
- g. Lisis máxima (LM): La LM se define por la mayor diferencia en altura entre la MFC y la menor amplitud resultante de la lisis.
- h. Tiempo de lisis (TL). El TL es el intervalo de tiempo desde el punto temporal del inicio de la coagulación hasta el punto temporal de la disolución del coágulo.
- i. Inicio de la lisis (LOT). El LOT es el intervalo de tiempo desde el punto temporal del inicio de la coagulación hasta el punto temporal del inicio de la lisis.

Se pipetea 240 μ l de plasma normal rico en plaquetas o plasma inhibidor en la cubeta. Otras adiciones de soluciones o reactivos no deben superar 80 μ l, y el volumen por cubeta no debe superar 320 μ l. Si las adiciones son menores de 80 μ l, la cubeta se llena hasta 320 μ l con solución salina isotónica.

Figura 1: El tromboelastograma 3372 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:30000 respecto a plasma normal rico en plaquetas. El tromboelastograma 3373 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:300000 respecto a plasma normal rico en plaquetas.

Figura 2: El tromboelastograma 3569 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:30000 respecto a plasma inhibidor de factor VIII. El tromboelastograma 3570 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:300000 respecto a plasma inhibidor de factor VIII.

Figura 3: El tromboelastograma 3611 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:30000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadieron 10 U de factor VIIa. El tromboelastograma 3612 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:30000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadieron 1 U de factor VIIa. El tromboelastograma 3613 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:30000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadieron 1/10 U de factor VIIa. El tromboelastograma 3614 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:30000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadieron 1/100 U de factor VIIa.

Figura 4: El tromboelastograma 3607 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:300000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadieron 10 U de factor VIIa. El tromboelastograma 3608

se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:300000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadieron 1 U de factor VIIa. El tromboelastograma 3609 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:300000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadieron 1/10 U de factor VIIa. El tromboelastograma 3610 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:300000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadieron 1/100 U de factor VIIa.

Figura 5: El tromboelastograma 3677 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:30000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadió una dilución 1:10 de concentrado de factor XIa. El tromboelastograma 3678 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:30000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadió una dilución 1:100 de concentrado de factor XIa. El tromboelastograma 3679 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:30000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadió una dilución 1:100 de concentrado de factor XIa.

Figura 6: El tromboelastograma 3673 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:300000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadió una dilución 1:10 de concentrado de factor XIa. El tromboelastograma 3674 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:300000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadió una dilución 1:100 de concentrado de factor XIa. El tromboelastograma 3675 se obtuvo por la adición de una dilución de FT relipidado de 1:300000 respecto a plasma inhibidor rico en plaquetas, al que también se añadió una dilución 1:100 de concentrado de factor XIa.

Ejemplos

1. Concentrados de factor XIa sin trombina ni pirógenos y seguro respecto a virus

10 l de plasma fuente se congelan, descongelan y el crioprecipitado formado después de la descongelación completa se elimina. El sobrenadante se mezcla con 500 g de DEAE-Sephadex-A50 lavado y se agita durante 30 minutos a 4°C. El Sephadex se elimina por filtración y el sobrenadante se puede usar en la producción para fracciones adicionales de plasma. El Sephadex se lava 3 veces a 4°C con 10 l de tampón fosfato 0,01 molar, pH 7,8 que contiene NaCl al 1%. El factor XI se eluye con el mismo tampón fosfato (2 l) que contiene NaCl al 3%. El eluato se agita moderadamente a 30°C durante 12 horas con 20 g de Tween-80 y 6 g de trinitrobutilfosfato (TNBP). El Tween-80 y TNBP se eliminan por -múltiple si es necesaria- adsorción y elución del factor XI en DEAE-Sephadex-A50. Es ventajoso lavar el factor XI adsorbido a Sephadex con una solución de NaCl al 1% tamponada para la eliminación del solvente y los detergentes.

El último eluato de Sephadex se diluye 1+4 con tampón fosfato 0,01 molar, pH 8,2. El factor XIa en este eluato diluido se adsorbe en una columna de DEAE-Sephadex-A50. Después de lavar la columna con tampón fosfato 0,1 molar pH 7,8 que contiene NaCl al 1%, se realiza un paso de elución con gradiente lineal; por lo cual el gradiente de NaCl se prepara mezclando una solución de tampón fosfato 0,01 molar, pH 7,5-7,8, con el mismo tampón fosfato que contiene NaCl al 3%. Se recogen fracciones de 100 ml cada una y las fracciones que contienen factor XI se usan para el procesamiento adicional.

El factor XI se puede activar por factor XIIa, factor XIa, tripsina, trombina y otros agentes. En el caso de este ejemplo con trombina segura respecto a virus comercialmente disponible y heparina las condiciones óptimas para activar el factor XI en los concentrados se determinarán en experimentos preliminares a temperatura ambiente durante 3 horas. Mientras se realizan los experimentos preliminares, el concentrado de factor XI se puede mantener congelado a -20°C para evitar contaminación bacteriana. Después de que se hayan determinado las cantidades óptimas de trombina y heparina para la activación, el concentrado de factor XI congelado se descongela y activa con las cantidades de trombina y heparina determinadas a 10°C durante 4 horas.

De la solución que contiene factor XIa se elimina la trombina por adsorción y elución repetida del factor XIa en DEAE-Sephadex-A50, de tal modo que el último eluato de DEAE-Sephadex no debe contener más de 0,1 unidades de trombina por ml (es decir, 0,01 unidades de trombina por 100 µl), lo que se considera como "sin trombina" en el sentido de la presente descripción y reivindicaciones. Los pasos de concentración de los concentrados de factor XIa incluyendo la eliminación de detergentes del solvente sí como la concentración de agentes activadores de factor XIa también se pueden realizar mediante una elución en gradiente de factor XIa con otras resinas que adsorben el factor XIa tal como QAE-Sepharosa, SP-Sepharosa o concanavalina-A-Sepharosa.

Para la seguridad vírica el concentrado de factor XIa se procesa adicionalmente por nanofiltración aplicando un filtro de poro de 20 nm. Antes de esta filtración puede ser necesario clarificar la solución mediante un filtro de poro de 75 nm y 35 nm así como por un ultrafiltro permeable a proteínas. Podría tener ventajas ultracentrifugar la solución en una centrifuga de flujo continuo con un mínimo de 50.000 rpm. Después de la formulación adecuada el factor XIa se filtra a través de un filtro estéril de tamaño de poro de 100 o 200 nm y la solución global estéril se carga en recipientes finales y se liofiliza. El contenido en humedad del concentrado de factor XIa liofilizado debe ser del 0,8-2,0% de agua. El factor XIa liofilizado en los recipientes finales se somete a tratamiento con calor después de sellado hermético durante 30 minutos a 100°C como un paso adicional de inactivación de virus. Esta es una forma de realización preferida de la invención.

2. Prueba de la ausencia de trombina en el concentrado de factor XIa

Se mezclan 100 µl de concentrado de factor XIa con 200 µl de solución de fibrinógeno al 0,1%; ambas soluciones se ajustan a un pH de 7,8 y una temperatura de 37°C. El tiempo exacto de mezcla se registra y la mezcla se observa durante 250 segundos para registrar coagulación y/o floculación. En paralelo se mezclan 100 µl de 0,1 unidades de trombina por ml de solución con 200 µl de solución de fibrinógeno al 0,1% a 37°C pH 7,5 y manteniendo la temperatura a 37°C se observa durante 250 segundos. En este periodo de tiempo se espera que se produzca la coagulación completa del fibrinógeno añadido. Se determina que el concentrado de factor XIa como "sin trombina" si después de mezclar con fibrinógeno no se produce coagulación ni floculación y si en paralelo las 0,01 unidades de trombina con fibrinógeno coagulan.

3. Estimación de la actividad del factor XIa

Se ensaya la actividad con el sustrato cromógeno S2366 a 37°C en una solución tamponada de pH 8,3. Se determinan diluciones de un concentrado de factor XI o un concentrado de factor XIa en un volumen de 200 µl. Se añaden 15 µl de solución de S2366 30 mmol y se ajusta con tampón TRIS pH 8,3 a un volumen total de 300 µl y se mezcla. Las pruebas se realizan en placas de microtitulación y cada pocillo se cubre con 2 gotas de aceite mineral. Se sigue la extinción durante 2 horas y la actividad del factor XIa en el concentrado se estima en base a la curva de dosis y respuesta de una preparación de referencia de factor XIa.

4. Plasma normal o inhibidor de factor VIII rico en plaquetas

Se centrifugó el plasma rico en plaquetas de donantes sanos a 4000 revoluciones por minuto durante 5 minutos, el plasma sobrenadante se eliminó y las plaquetas se lavaron con un tampón fosfato glucosa de pH 6,5 tres veces. El último sedimento se resuspendió en plasma normal pobre en plaquetas o plasma inhibidor del factor VIII pobre en plaquetas, y las suspensión de plaquetas se ajustó a un recuento de plaquetas entre dos y tres millones de plaquetas por µl. Este concentrado de plaquetas se diluyó antes del uso 1:10 con plasma normal pobre en plaquetas o plasma inhibidor del factor VIII pobre en plaquetas. El plasma inhibidor del factor VIII pobre en plaquetas debe tener un contenido de al menos 100 unidades Bethesda por ml.

En la muestra para el tromboelastograma 3372 (figura 1), 240 µl de plasma normal rico en plaquetas se mezclaron con 10 µl de una dilución de FT de 1:30000. Después de la adición de 50 µl de solución salina isotónica, la coagulación se inició por la adición de 20 µl de una solución de CaCl₂ 0,2 M.

Se usó el mismo procedimiento con la muestra 3373 (figura 1), excepto que la solución de FT usada se diluyó 1:300000.

Como se puede ver del tromboelastograma (figura 1), el TC fue 673 segundos, y después de la adición de una cantidad de FT a 1/10, fue 659 segundos, lo que produce una diferencia no significativa. La MFC fue 63 ml con ambas muestras. Igualmente, la diferencia en el ángulo α no era significativa.

Cuando se usó plasma inhibidor del factor VIII rico en plaquetas, hubo diferencias significativas con diferentes concentraciones de FT. El TC en las muestras 3569 y 3570 (figura 2) fue 1523 segundos en ambas cuando se usó una dilución de FT de 1:30000 y estaba muy retrasado comparado con plasma normal rico en plaquetas, y todavía estaba considerablemente prolongado en la muestra 3570, que dio 2588 segundos.

También la MFC en las muestras 3569 y 3570, que fue 38 mm y 27 mm, respectivamente, estaba muy reducida comparada con las muestras 3372 y 3373. Estos resultados sugieren que la dilución de FT de 1:300000 da la mayor diferencia entre el comportamiento de coagulación del plasma normal y el del plasma inhibidor rico en plaquetas.

El tampón glucosa-fosfato usado tenía la siguiente composición:

- citrato de sodio dihidrato al 2,2%
- ácido cítrico al 0,8%
- glucosa monohidrato al 2,42%

Se usó RemcombiPlas Tin-Hemosil lote NO574097G de Instr. Lab. El plasma normal era plasma de donante recién obtenido. El plasma inhibidor del factor VIII era el lote 824 y fue suministrado por Biomex.

5. Normalización de los parámetros de coagulación tromboelastográficos de plasma inhibidor del factor VIII rico en plaquetas por la adición de concentrado de factor VIIa usando diluciones de FT de 1:30000 y 1:300000

Como se puede ver de la figura 3, los parámetros de coagulación de plasma inhibidor del factor VIII rico en plaquetas solo se normalizaron por la adición de 10 U de factor VIIa (tromboelastograma 3611). La adición de 1 U (3612), 1/10 (3613) y 1/100 (3614) de una U (prolongó el tiempo de coagulación a 1153 segundos, 2161 segundos y

2542 segundos, respectivamente. 10 U de factor VIIa normalizaron la MFC por completo a 64 mm, mientras que adiciones con menos VIIa dieron un acortamiento gradual de la MFC.

5 Cuando se usó una mayor dilución de FT de 1:300000 (figura 4), prácticamente todos los parámetros de coagulación se pudieron normalizar con la adición de 10 U (3607) de factor VIIa. Sin embargo, la diferencia en el TC era más pronunciada que con una dilución menor de FT, la adición de 1 U (3608), de 1/10 (3609) y 1/100 (3610) de una U prolongando el TC a 1265 segundos, 2581 segundos y 4749 segundos, respectivamente.

10 El concentrado de factor VII usado era el lote SU61347 por Novo Nordisk.

6. Normalización de los parámetros de coagulación tromboelastográficos de plasma inhibidor del factor VIII rico en plaquetas por la adición de concentrado de factor XIa usando diluciones de FT de 1:30000 y 1:300000

15 Se usaron las mismas muestras y reactivos que en ejemplo 2, excepto que se usó un concentrado de factor XIa nanofiltrado, inactivado por S/D para virus en lugar de un concentrado de factor VIIa, que se calentó en estado liofilizado a 100°C durante 30 minutos y que dio una solución de factor XIa de 1100 U por ml después de reconstitución con WFI.

20 Como se puede ver del tromboelastograma 3677 (figura 5), el TC de 379 segundos era significativamente más corto con 1/10 de una U de factor XIa que el de un plasma normal (figura 1: 3372). Con 59 mm, la MFC también estaba en el intervalo normal. Lo mismo era cierto para una adición de solo 1/100 de una U de factor XIa, que dio un TC en el intervalo normal. Véase la muestra 3678 (figura 5). Como se puede ver de la muestra 3679, solo 1/100 de una U de factor XIa prolonga el TC a 1625 segundos.

25 Cuando se usó la mayor dilución de FT de 1:300000 junto con el factor XIa, la normalización de los parámetros de coagulación era incluso más pronunciada que con concentrados de factor VIIa.

Referencias citadas

30 Astermark J, et al. A randomized comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor: the FEIBA NovoSeven Comparative (FENOC) Study. *Blood*, 2007;109:546-551.

Brown S, Haemostasis from bench to bedside. *Haemophilia*. 2002; 8:1-9

35 Eibl J et al., AT350726, 1976.

Fekete L, et al. 'Auto' factor IX concentrate: a new therapeutic approach to treatment of hemophilia A patients with inhibitors. *International Congress of Hematology, Sao Paulo, 1972;295 [Abstract]*.

40 Hedner U, EP0225160B1, 1986.

Hedner U, et al. Use of human factor VIIa in the treatment of two hemophilia A patients with high-titer inhibitors. *J Clin Invest*. 1983;71:1836-41.

45 Kelly P, et al. Antihemophilic factor inhibitors. Management with prothrombin complex concentrates. *JAMA*, 1976;236:2061-4.

Kumar R, et al. The Influence of Fibrinogen and Fibrin on Thrombin Generation —Evidence for Feedback Activation of the Clotting System by Clot Bound Thrombin. *Thrombosis and Haemostasis* 1994;72:713-21.

50 Kurczynski E, et al. Activated prothrombin concentrate for patients with factor VIII inhibitors. *N Engl J Med*, 1974;291:164-7.

Mann KG, et al. Blood Coagulation Dynamics in Haemostasis. *Hämostaseologie* 2009;29:7-16.

55 Roberts H, et al. The use of recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding disorders. *Blood*.2004;104:3858-3864.

60 Sixma J, et al. The haemostatic plug in haemophilia A: a morphological study of haemostatic plug formation in bleeding time skin wounds of patients with severe haemophilia A. *British Journal of Haematology*, 1984; 58:741-753.

Turecek P, et al. FEIBA: mode of action. *Haemophilia*. 2004;10:(Supl.2):3-9

65 van den Berg, H, et al. Clinical Prediction Models for Inhibitor Development in Severe Hemophilia A. *J. Thrombosis and Haemostasis*, 2009;7 (Supl.1):98-102.

Walsh P. Roles of Platelets and Factor XI in the Initiation of Blood Coagulation by Thrombin. *Thromb Haemost* 2001;86:75-82.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un concentrado de factor Xla sin trombina o un concentrado de factor de coagulación sin trombina que contienen factor Xla para la producción de un medicamento aplicable por vía parenteral que no forma trombina durante o después de la liofilización, almacenamiento o reconstitución.
2. Uso según la reivindicación 1, en donde el medicamento contiene serpinas y/o cininógeno de alto peso molecular o sus productos de separación.
- 10 3. Uso según las reivindicaciones 1 y 2, en donde el medicamento se nanofiltrar para mejorar la seguridad vírica, bien antes o después de la formulación, preferiblemente por nanofiltros con una diámetro de poro de ≤ 20 nm o se filtra mediante un ultrafiltro de 1000 kDalton.
- 15 4. Uso según las reivindicaciones 1-3, en donde el medicamento se hace víricamente seguro por tratamiento con solvente/detergente y posterior eliminación del solvente y detergente.
- 20 5. Uso según las reivindicaciones 1-4, en donde el medicamento se carga en condiciones estériles y sin pirógenos y se liofiliza e inactiva víricamente calentando las preparaciones farmacéuticas liofilizadas, cargadas a no menos de 90°C y no más de 140°C durante de 30 a 180 minutos.
- 25 6. Uso según las reivindicaciones 1-5, en donde el concentrado de factor Xla sin trombina o concentrado de factor de coagulación sin trombina que contiene factor Xla es obtenible por fraccionamiento de plasma o suero.
- 30 7. Uso según las reivindicaciones 1-6, en donde el concentrado de factor Xla sin trombina o concentrado de factor de coagulación sin trombina que contiene factor Xla o la preparación farmacéutica son víricamente seguros y sin pirógenos.
8. Uso de un concentrado de factor Xla sin trombina a un concentrado de factor de coagulación sin trombina que contienen factor Xla como un principio activo para la producción de un medicamento aplicable por vía parenteral para el tratamiento de trastornos de coagulación.

FIG. 1: Tromboelastograma de plasma normal rico en plaquetas con diluciones de FT de 1:30000 y 1:300000

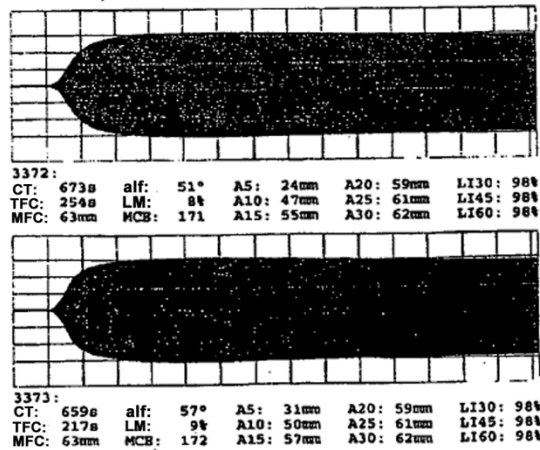


FIG. 2: Tromboelastograma de plasma inhibidor de factor VIII rico en plaquetas con diluciones de FT de 1:30000 y 1:300000

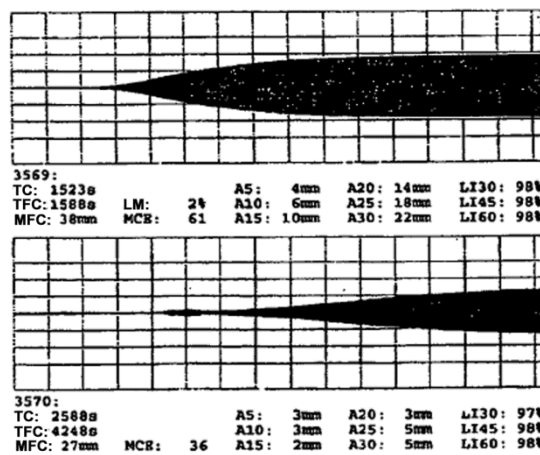


FIG. 3: Tromboelastograma de plasma inhibidor de factor VIII rico en plaquetas con dilución de FT de 1:30000 y adiciones de factor VIIa

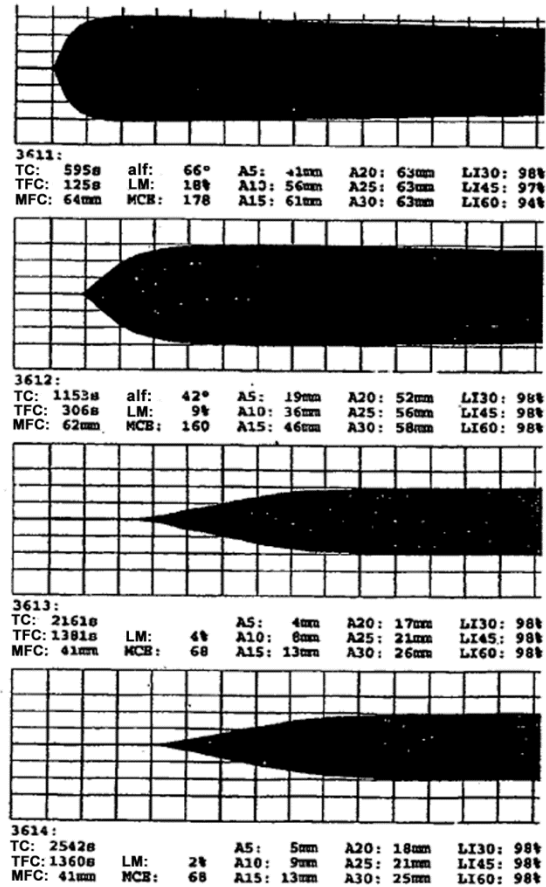


FIG. 4: Tromboelastograma de plasma inhibidor de factor VIII rico en plaquetas dilución de FT de 1:300000 y adiciones de factor VIIa

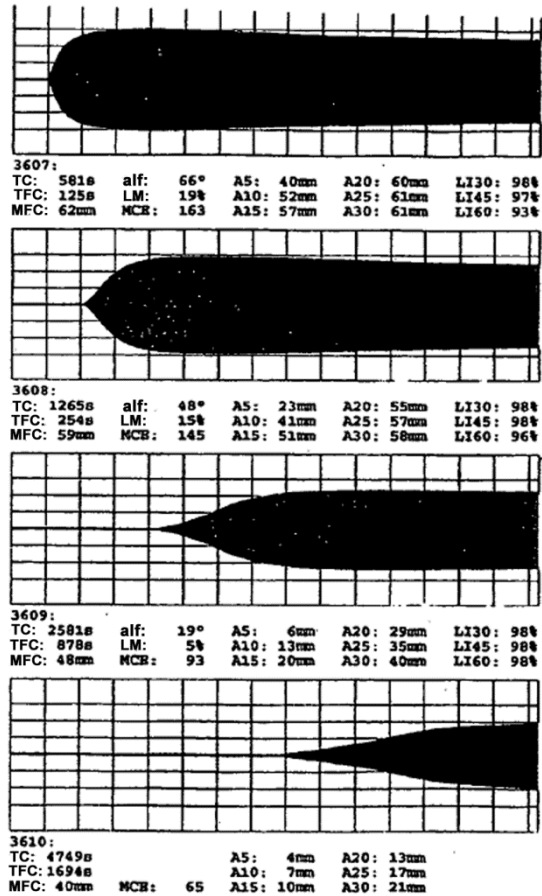


FIG. 5: Tromboelastograma de plasma inhibidor de factor VIII rico en plaquetas con dilución de FT de 1:30000 y adiciones de factor XIa

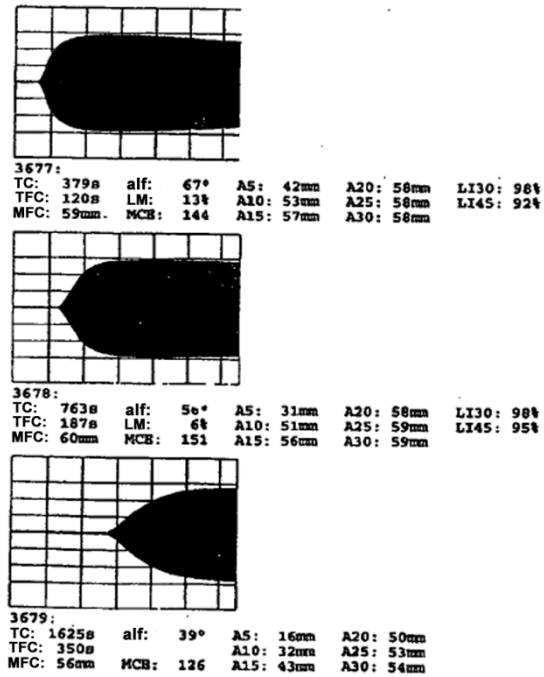


FIG. 6: Tromboelastograma de plasma inhibidor de factor VIII rico en plaquetas con dilución de FT de 1:300000 y adiciones de factor XIa

