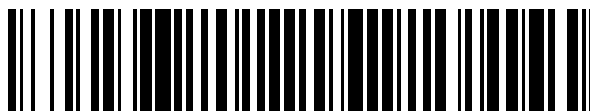


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 228**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2011** **E 11714990 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015** **EP 2560991**

54 Título: **Vesículas enriquecidas con fosfolípidos que albergan factor tisular que tienen actividades hemostáticas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

19.04.2010 EP 10382085

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

07.12.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MURAT MORENO, JESÚS y
RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ - ALBA, JUAN RAMÓN

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 553 228 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

- 5 Vesículas enriquecidas con fosfolípidos que albergan factor tisular que tienen actividades hemostáticas y usos de las mismas

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 La presente invención está relacionada con, en general, el tratamiento de hemorragias y la curación de heridas en un sujeto usando un agente pro-coagulante basado en factor tisular. Más específicamente, la invención está relacionada con una microvesícula que alberga factor tisular (microvesícula que alberga TF) que comprende una membrana derivada de células eucariotas en forma de una microvesícula y una proteína factor tisular y un fosfolípido cargado negativamente (NCP) así como con aplicaciones de la misma como agente pro-
15 coagulante útil para tratar hemorragias en un sujeto así como para promover la angiogénesis y la migración celular. La invención está relacionada adicionalmente con procedimientos para la producción de dichas microvesículas que albergan TF.

ESTADO DE LA INVENCION

- 20 La hemostasis es el mecanismo mediante el cual los seres vivos responden a una hemorragia e implica la participación de dos procedimientos que se vuelven funcionales inmediatamente después de una lesión y permanecen activos durante un largo periodo de tiempo. El primero de ellos se conoce como hemostasis primaria y se caracteriza por la existencia de vasoconstricción en el sitio de la lesión vascular y la formación de agregados
25 plaquetarios. El segundo se conoce como hemostasis secundaria, que es la fase en la que se forma el coágulo de fibrina debido a la acción de las diferentes enzimas proteolíticas de la cascada de coagulación.

- Varios cofactores y enzimas proteolíticas participan en la segunda fase del procedimiento de coagulación sanguínea, todos conocidos como factores de coagulación, y consta de varias fases que finalizan en la
30 formación de fibrina a partir de la hidrólisis de fibrinógeno debido a la acción de la trombina. La trombina se forma previamente por hidrólisis proteolítica de una apoenzima, la protrombina. Esta proteólisis se realiza por el factor de coagulación activado X (FXa), que se une a la superficie de las plaquetas activadas y solamente en presencia de su cofactor, el factor de coagulación activado V (FVa), e iones calcio, es capaz de hidrolizar la protrombina. La activación del factor de coagulación X (FX) puede suceder en dos vías diferentes, la vía intrínseca y la vía
35 extrínseca.

- La vía intrínseca consta de una serie de reacciones en las que se hidroliza cada proenzima, produciendo su forma de proteasa activa. En cada etapa, la enzima proteolítica recién formada catalizará la activación de la siguiente proenzima para producir sucesivamente la forma activa.
40

- En la vía extrínseca de coagulación sanguínea, el factor tisular (TF), expuesto en células adventicias en el sitio de la lesión, se une al factor de coagulación en circulación VII/factor de coagulación activado VII (FVII/FVIIa) para formar el complejo TF::FVIIa y, en presencia de calcio, actúa como sustrato de modo que tenga lugar la activación de FX. La vía extrínseca actualmente se considera la vía más relevante en la coagulación
45 sanguínea, y está aceptado que en el caso de una hemorragia producida por una lesión vascular, la coagulación se desencadena debido a la activación de la vía extrínseca que implica la interacción de TF con su ligando, FVII/FVIIa.

- Se ha aceptado ampliamente que TF es el elemento principal responsable de la rapidez con que se inicia la coagulación, y es necesario para la activación de FX, que a su vez comienza la hidrólisis de la protrombina.
50

- Se ha informado de la purificación de TF de diversos tejidos tales como: cerebro humano, cerebro bovino; placenta humana; cerebro ovino; y pulmón. Está ampliamente aceptado que aunque hay diferencias en la estructura de la proteína TF entre especies, no existen diferencias funcionales medidas por ensayos de coagulación in vitro.

- Está ampliamente aceptado que para mostrar actividad biológica, el TF debe asociarse con
55 fosfolípidos in vitro. Se ha demostrado que la eliminación del componente fosfolipídico de TF, por ejemplo, por el uso de una fosfolipasa, provoca una pérdida de su actividad biológica in vitro.

- Se han obtenido previamente microvesículas que albergan TF mediante la incorporación de TF purificado, el cual puede ser TF recombinante, en vesículas fosfolipídicas sintéticas (ver WO9848283,
60 WO2002034109, US2006088524, US2006046309, Bach R et al., (1986) Biochemistry, American Chemical Society 25:4007-4020, Bach R et al., (1990) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87:6995-6999, y Brucato et al., (2002), Protein Expression and Purification 26:386-393).

El documento WO2008080989 describe microvesículas derivadas de levaduras que albergan factor tisular que comprenden una membrana de levaduras y una proteína factor tisular y el uso de las mismas como agentes pro-coagulantes en el tratamiento de hemorragias en un sujeto.

5 El documento WO2006004675 describe la expresión de factor tisular en células vegetales, extractos crudos obtenidos de plantas que expresan TF y vesículas artificiales que comprenden TF recombinante obtenido de células vegetales.

El documento EP1935902 describe la expresión de factor tisular en células de insecto así como TF relipidado que contiene TF recombinante expresado en células de insecto.

Sin embargo, existe la necesidad en la técnica de preparaciones pro-coagulantes adicionales basadas en TF.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

15 En un primer aspecto, la invención está relacionada con un método para la preparación de una microvesícula que alberga TF que tiene actividad pro-coagulante que comprende

- (i) expresar TF o una variante del mismo que tiene actividad pro-coagulante en una célula eucariota,
- (ii) recuperar microvesículas que albergan TF de las células de la etapa (i) y
- (iii) poner en contacto las vesículas obtenidas en la etapa (ii) con un fosfolípido cargado negativamente en ausencia de detergentes en condiciones adecuadas para la incorporación de dicho fosfolípido en dichas vesículas,

25 Donde dichas microvesículas están formadas por membranas lipídicas, o fragmentos de las mismas, de dicha célula eucariótica.

En otro aspecto, la invención está relacionada con una microvesícula que alberga TF obtenida usando el método de la invención.

En otro aspecto más, la invención está relacionada con una composición farmacéutica que comprende una microvesícula que alberga TF de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 En otro aspecto, la invención está relacionada con una composición farmacéutica que comprende

- (i) una microvesícula obtenida por el método de la invención,
- (ii) al menos un promotor de la coagulación y
- (iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable

En otro aspecto, la invención está relacionada con una microvesícula que alberga TF de la invención o con una composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento.

45 En otro aspecto, la invención está relacionada con una microvesícula que alberga TF de la invención o con una composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de una hemorragia, para promover la curación de heridas o para el tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis.

En otro aspecto, la invención está relacionada con el uso de una microvesícula que alberga TF de la invención para la determinación del tiempo de protrombina en una muestra.

En otro aspecto, la invención está relacionada con un kit para la determinación de un factor terapéutico anticoagulante que comprende una microvesícula de la invención.

55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 Expresión del rTF por los extractos TT-173. Análisis de transferencia de Western de extractos de TT-173 purificado (MFR 0,1) de cuatro filtraciones de flujo transversal independientes. La transferencia se hizo reaccionar con human anticuerpo de ratón purificado (BD Biosciences Pharmingen). Los marcadores de peso molecular en kDa se muestran en el lado de la izquierda de la figura.

Figura 2. Actividad pro-coagulante de TT-173 después de incubación con PS. A.- Para ensayar el efecto de PS en la bioactividad de TT-173, se añadió PS (0,1 mM) a TT-173 (1 ml) y la solución mezclada se

mantuvo a TA durante el experimento. En los diferentes momentos puntuales representados en la figura, se añadió una alícuota de la mezcla (10 µl) a cubetas calentadas que contenían 130 µl de plasma normal pobre en plaquetas. Se añadieron inmediatamente 20 µl de cloruro cálcico (100 mM), y se determinó el tiempo de coagulación (en segundos) con la ayuda de un coagulómetro (Stago). El experimento se detuvo después de 300 segundos (plasma combinado de 5 donantes). B.- Los resultados obtenidos como se describe en A también se representaron como unidades/ml. Se define 1 unidad como la cantidad de TT-173 necesaria para coagular plasma combinado normal en 30 segundos en un ensayo coagulométrico convencional (130 µl de plasma, 20 µl de cloruro cálcico (100 mM) y 10 µl de producto).

10 **Figura 3. Actividad pro-coagulante de TT-173 o rTF lipidado después de incubación con diferentes concentraciones de PS.** Para ensayar el efecto de PS sobre la bioactividad de TT-173 o rTF relipidado, se añadió PS (a las concentraciones indicadas en la figura) a TT-173 (1 ml) o rTF relipidado. Ambas soluciones mezcladas se mantuvieron a TA durante 2 h. Después de este tiempo, se añadió una alícuota de cada mezcla (10 µl) a cubetas calentadas que contenían 130 µl de plasma normal pobre en plaquetas. Inmediatamente después, se
15 añadieron 20 µl de cloruro cálcico (100 mM), y se determinó el tiempo de coagulación (en segundos) con la ayuda de un coagulómetro (Stago). El experimento se detuvo después de 300 segundos (plasma combinado de 5 donantes). Los resultados obtenidos se representan como unidades/ml.

Figura 4. Actividad procoagulante de rTF cuando se incluye en vesículas fosfolipídicas adecuadas. Se relipidó rTF purificado comercial en vesículas que contenían fosfatidil colina/fosfatidil serina (PC/PS) siguiendo el método estandarizado descrito por Minims et al. (Biochemistry 20, 833, 1981). En resumen, se incubaron 100 ng de rTF (American Diagnostica Inc. Stanford, CT, EEUU) con: PC/PS (Sigma Aldrich Inc, Saint Louis, MO, EEUU) a las proporciones PC:PS indicadas (100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30) (concentración final 2,6 mM), y detergente (N-octil-β-D-galactopiranosido, concentración final 40 mM). La mezcla se homogeneizó, y se
25 dializó extensivamente (durante 48 h con varios cambios de tampón). Mediante este procedimiento, el detergente se elimina lentamente y se producen espontáneamente micelas lipídicas que contienen rTF. Después de este procedimiento de relipidación, se ensayaron las micelas que contenían rTF para su actividad procoagulante (barras azules). En paralelo, se incubaron las diferentes micelas que contenían rTF durante 2 h con PS a una concentración final de 0,1 mM. Después de este tiempo, también se ensayaron las micelas que contenían extra PS para la
30 actividad procoagulante. Se realizaron ensayos coagulométricos del siguiente modo: Se añadieron alícuotas (10 µl) del rTF relipidado con la cantidad de vesículas PC/PS, a cubetas calentadas que contenían 130 µl de plasma normal pobre en plaquetas. Inmediatamente después, se añadieron 20 µl de cloruro cálcico (100 mM), y se determinó el tiempo de coagulación (en segundos) con la ayuda de un coagulómetro (Diagnostica Stago, Inc. NJ, EEUU).

35 **Figura 5. Efecto de la adición de PS sobre diferentes vesículas que contienen rTF.** Se prepararon dos alícuotas (2 ml cada una) de: i) rTF relipidado a una proporción de concentración de PC:PS de 80:20, ii) rTF relipidado a una proporción de concentración de PC:PS de 70:30 o iii) vesículas TT-173 aisladas de levadura recombinante que expresa TF a 4°C. Se añadió PS a una concentración de 0,1 mM a una de las alícuotas de cada una de las vesículas que contienen rTF, y se incubó a TA durante 2 h. Durante este tiempo, la otra alícuota se
40 mantuvo a 4°C. Después de eso, ambas alícuotas de cada una de las vesículas que contienen rTF se ensayaron para la actividad procoagulante como se describe en la leyenda de figura 1.

Figura 6. Actividad pro-coagulante de rTF relipidado después de incubación con PS y diferentes concentraciones de TT-100. Se añadieron alícuotas (10 µl) de rTF relipidado (0,3 µg/ml) incubadas
45 durante 2 h con PS (0,1 mM) y diferentes concentraciones de TT-100 (0, 0,03, 0,1, 0,3, y 0,36 mg/ml) a cubetas calentadas que contenían 130 µl de plasma normal pobre en plaquetas. Inmediatamente después, se añadieron 20 µl de cloruro cálcico (100 mM), y se determinó el tiempo de coagulación (en segundos) con la ayuda de un coagulómetro.

50 **Figura 7. Actividad amidolítica de FVIIa.** Para cuantificar la actividad enzimática del complejo catalítico TF:FVIIa, se realizó un ensayo cromogénico convencional usando el sustrato S-2238. La actividad TF:FVIIa se mide por la diferencia en la absorbancia (densidad óptica) entre el sustrato S-2238 y el producto resultante de procesar p-nitroanilina (pNA). La velocidad de formación de pNA es proporcional a la actividad enzimática y se determina convenientemente con un fotómetro. En este experimento, se ensayaron diferentes concentraciones de
55 TT-173, que contenían o no PS, por su capacidad de interaccionar con FVIIa y en presencia de S-2238 de producir pNA detectable.

Figura 8. Actividad de coagulación de TT-173 en sangre completa y efecto de PS. Se ensayó la capacidad de TT 173 que contiene o no PS (0,1 mM) de coagular muestras de plasma y sangre completa sanas.

60 **A)** Se añadieron alícuotas (10 µl) de TT 173 y TT 173 incubadas durante 2 h con PS (concentración final 0,1 mM) a cubetas calentadas que contenían 130 µl de plasma normal pobre en plaquetas. Inmediatamente después, se añadieron 20 µl de cloruro cálcico (100 mM), y se determinó el tiempo de coagulación (en segundos) con la ayuda

de un coagulómetro. (Combinación de plasma de 5 donantes). **B)** Se añadieron alícuotas (200 µl) de TT-173 o TT-173+PS (0,1 mM) que contenía la cantidad de rTF representada en la figura, a alícuotas (800 µl) de sangre recién extraída de donantes sanos. El tiempo de coagulación se midió con la ayuda de un cronómetro desde el inicio de la extracción de sangre hasta que apareció un coágulo estable y bien consolidado. N=3.

5

Figura 9. Mecanismo postulado de acción de TT-173

Figura 10. Actividad de coagulación de TT-173 en plasma deficiente en los factores de coagulación VIII, IX o XI (A) Se añadieron alícuotas (10 µl) de TT 173 o TT 173+ PS (0,1 mM) a cubetas calentadas

10 que contenían 130 µl de plasma normal pobre en plaquetas, inmediatamente después de ello se añadieron 20 µl de cloruro cálcico (100 mM), y se determinó el tiempo de coagulación (en segundos) con la ayuda de un coagulómetro. (Combinación de plasma de 5 donantes). **(B)** Se añadieron alícuotas similares (10 µl) a las descritas en A a cubetas calentadas que contenían 130 µl de plasmas carentes de factor-VIII, factor IX o factor XI. Inmediatamente después, se añadieron 20 µl de cloruro cálcico (100 mM), y se determinó el tiempo de coagulación (en segundos) con la ayuda
15 de un coagulómetro. (N=3).

Figura 11. Actividad de coagulación de TT-173 en plasma deficiente en los factores de coagulación V o VII. Se añadieron alícuotas (10 µl) de TT 173 o TT 173+ PS (0,1 mM) a cubetas calentadas que contenían 130 µl de plasmas carentes de factor V o factor VII. Inmediatamente después, se añadieron 20 µl de cloruro cálcico (100 mM), y se determinó el tiempo de coagulación (en segundos) con la ayuda de un coagulómetro. (N=3).

Figura 12. Actividad de coagulación de TT-173 en plasma tratado con warfarina. Se añadieron alícuotas (10 µl) de TT 173 o TT 173+ PS (0,1 mM) a cubetas calentadas que contenían 130 µl de plasmas carentes
25 de factor V o factor VII. Inmediatamente después, se añadieron 20 µl de cloruro cálcico (100 mM), y se determinó el tiempo de coagulación (en segundos) con la ayuda de un coagulómetro. (N=3).

Figura 13. Efecto de la reconstitución de TT-173 en la actividad procoagulante. Cuando se descomponían vesículas TT-173 con y sin PS añadido por tratamiento con un detergente dializable, y después se
30 reconstituían in vitro por diálisis, se perdía aproximadamente el 50% de la actividad inicial (panel A). Sin embargo, cuando se hizo un experimento similar usando vesículas de rTF relipidado, no se observaron diferencias apreciables antes y después de la diálisis (panel B).

Figura 14. Efecto de la adición de PS sobre diferentes vesículas que contienen rTF. Se prepararon dos alícuotas (2 ml cada una) de: i) rTF relipidado a una proporción de concentración de PC:PS de
35 80:20, ii) rTF relipidado a una proporción de concentración de PC:PS de 70:30, iii) vesículas TT-173 aisladas de levadura recombinante que expresa TF o iv) vesículas TT-173 aisladas de células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante de expresión a 4°C. Se añadió PS a una concentración de 0,1 mM a una de las alícuotas de cada una de las vesículas que contienen rTF, y se incubó a TA durante 2 h. Durante este tiempo, la otra alícuota
40 se mantuvo a 4°C. Después de eso, se ensayaron ambas alícuotas de cada una de las vesículas que contienen rTF para la actividad procoagulante como se describe en la leyenda de figura 1.

Figura 15. La adición de PS proporciona estabilidad a las vesículas TT-173. Se usaron cuatro alícuotas, de 10 ml cada una, a partir de tres lotes independientes de TT-173 en este estudio. Se incubaron dos
45 alícuotas de cada lote con PS (0,1 mM) a TA durante dos horas, y el resto de las alícuotas se mantuvo a 4°C. Después de este tiempo, se usaron 10 µl de cada una de las doce muestras de TT-173 para determinar la actividad de coagulación (tiempo 0), siguiendo el procedimiento descrito en la leyenda de figura 1. Inmediatamente después, la mitad de las alícuotas (3 de TT-173 –PS, y 3 de TT-173+PS correspondiendo cada una de ellas a uno de los tres lotes) se mantuvo a 4°C durante el resto del experimento de estabilidad, y el resto (3 de TT-173 –PS, y 3 de TT-
50 173+PS) se mantuvo a 20°C. En los momentos indicados en la figura, se usaron 10 µl de cada alícuota para determinar la actividad de coagulación en las alícuotas mantenidas a 4°C **(A)** o a 20°C **(B)**. Los resultados se representan con la desviación típica. También se muestra la media de la estabilidad mínima entre los diferentes lotes a 4°C **(C)** y a 20°C **(D)**.

Figura 16. La adición de FVII, FVIIa, FX y FXa amplifica el efecto procoagulante de TT-173. Se añadieron diferentes concentraciones de FVII (20 nM y 60 nM), FVIIa (20 nM y 60 nM), FX (1000 nM y 3000 nM) y FXa (1000 nM) a TT-173 +PS (0,1 mM). Se comprobaron alícuotas de las mezclas TT-173+PS (0,1mM)/FVII, TT-173+PS (0,1 mM)/FVIIa, TT-173+PS (0,1 mM)/FX y TT-173+PS (0,1 mM)/FXa para la actividad de coagulación en un ensayo coagulométrico convencional a una concentración final de TF en plasma de 45 ng/ml. Como se muestra,
60 la adición de FVII, FVIIa y FX reduce el tiempo de coagulación en aproximadamente 2 s y la adición de FXa reduce el tiempo de coagulación en aproximadamente 7 s.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inventores han encontrado que la adición de fosfatidilserina (PS) extra en ausencia de detergentes a microvesículas que albergan TF derivadas de células de levadura y que ya contienen PS, provoca sorprendentemente propiedades pro-coagulantes mejoradas de dichas vesículas así como estabilidad aumentada de dichas vesículas. Las propiedades procoagulantes aumentadas pueden observarse, por ejemplo, en los experimentos mostrados en los ejemplos 2 y 3 de la presente invención, en los cuales se muestra claramente que la adición de fosfatidilserina a microvesículas derivadas de levadura que comprenden TF provoca vesículas que muestran propiedades pro-coagulantes aumentadas (tiempo de coagulación reducido) con respecto a vesículas que no se han puesto en contacto con el fosfolípido (véase, por ejemplo, la figura 2 y la tabla 2). Sin el deseo de limitarse por ninguna teoría, se cree que PS interacciona con las microvesículas que albergan TF provocando una capacidad aumentada de las vesículas de reclutar factores plasmáticos implicados en la formación de ambos complejos, protrombinasa y Xasa, que a su vez conduce a una producción aumentada de trombina. La estabilidad aumentada de las vesículas se muestra, por ejemplo, en el ejemplo 4 de la presente invención, en el cual se muestra que vesículas pretratadas con PS muestran estabilidad aumentada tanto a 20°C como a 4°C.

Método de la invención

En un primer aspecto, la invención está relacionada con un método para la preparación de una microvesícula que alberga TF que tiene actividad pro-coagulante que comprende:

- (i) expresar TF o una variante del mismo que tiene actividad pro-coagulante en una célula eucariota,
- (ii) recuperar microvesículas que albergan TF de las células de la etapa (i) y
- (iii) poner en contacto las microvesículas obtenidas en la etapa (ii) con un fosfolípido cargado negativamente (NCP) en ausencia de detergentes en condiciones adecuadas para la incorporación de dicho fosfolípido en dichas microvesículas,

donde dichas microvesículas están formadas por membranas lipídicas, o fragmentos de las mismas, de dicha célula eucariota.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "microvesícula que alberga TF" se refiere a cualquier microvesícula lipídica que contiene TF integrado en dicha microvesícula lipídica y que deriva de una célula eucariota. Microvesícula lipídica se refiere a un compartimiento pequeño y cerrado, que está sustancialmente compuesto por mono o bicapas lipídicas. El tamaño de la microvesícula que alberga TF de la invención puede variar dentro de un intervalo relativamente amplio, habitualmente, dicho tamaño es igual a o inferior a 10 µm, típicamente igual a o inferior a 0,5 µm. En una realización particular, el tamaño de las microvesículas derivadas de levadura que albergan TF de la invención varía de 10 a 0,01 µm.

Las microvesículas están formadas por membranas lipídicas, o fragmentos de las mismas, de células eucariotas. Una membrana se refiere, en general, a una capa organizada de unas pocas moléculas (lípidos y proteínas) gruesa que forma el límite de una célula (es decir, la membrana celular o plasmática) o los límites de orgánulos intracelulares. Típicamente, una membrana está compuesta de dos capas lipídicas orientadas (es decir, una bicapa lipídica) en la que las proteínas pueden estar incluidas. Una capa lipídica, que es la estructura básica de las membranas de una célula, está formada habitualmente por moléculas anfipáticas (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos, etc.) en un entorno acuoso, estando orientada cada molécula con el grupo hidrófilo en el exterior de la capa y el grupo hidrófobo al interior de la capa.

En una primera etapa, el método de la invención, comprende la expresión de TF o una variante del mismo que tiene actividad pro-coagulante en una célula eucariota.

Como "célula eucariota" se conoce en la presente invención cualquier célula que contenga estructuras complejas encerradas dentro de membranas como un núcleo. Ejemplos de células eucariotas que pueden usarse en el método de la invención son células fúngicas, células de levadura, células vegetales y células animales (como una célula de mamífero, una célula de pez, una célula de reptil, una célula de insecto, etc.).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "células de levadura" incluye cualquier levadura ascoesporógena (Endomicetales), levadura basidioesporógena, y levadura que pertenezca a los Fungi Imperfecti (Blastomicetes). Como la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los propósitos de esta invención, levadura se definirá como se describe por Skinner, F. et al. (Biology and Activities of Yeast, Soc. App. Bacteriol. Symp. Nº Serie 9). Las cepas de levadura adecuadas incluyen, sin limitación, cualquier especie de *Torula*, levadura del pan, levadura de cerveza, una especie de *Saccharomyces* tal como *S. cerevisiae*, una especie de *Schizosaccharomyces*, una especie de *Pichia* tal como *Pichia pastoris*, una especie de *Candida*, una especie de

Hansenula tal como Hansenula polimorpha, y una especie de Klyuveromyces tal como Klyuveromyces lactis así como las diferentes cepas de las especies de levadura mencionadas anteriormente, tal como la cepa T73 de S. cerevisiae. También podría usarse una mezcla de cualquiera de estas especies y cepas.

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión "células vegetales" incluye células de plantas, incluyendo, aunque sin limitación, algas, monocotiledóneas, dicotiledóneas y, específicamente, cereales (por ejemplo, maíz, arroz, avena, etc.), legumbres (por ejemplo, soja, etc.), crucíferas (por ejemplo, Arabidopsis thaliana, colza, etc.) o solanáceas (por ejemplo, patata, tomate, tabaco, etc.). Las células vegetales incluyen cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, 10 polen, semillas y microesporas. Como entendería un experto en la materia, la célula vegetal puede ser parte de una planta o una planta completa, refiriéndose por tanto como "sistema hospedador vegetal". El "sistema hospedador vegetal" o las células vegetales aisladas pueden estar en diversas fases de madurez. El sistema hospedador vegetal también se refiere a cualquier clon de dicha planta, semilla, descendencia propia o híbrida, propágulo sea generado sexual o asexualmente, y descendencia de cualquiera de estos, tal como esquejes o semillas.

15 Como se usa en la presente memoria, la expresión "células animales" incluye cualquier célula de un animal. Las células animales incluyen células de mamífero, células de pez, células de reptil, células de insecto, etc. Las células animales pueden obtenerse de cualquier tejido del animal (células de cultivo primario) o pueden ser células inmortalizadas. Las células inmortalizadas pueden obtenerse de tejidos tumorales o inmortalizarse usando 20 técnicas conocidas para los expertos en la materia tales como infección con virus (por ejemplo, documento EP1212420) o la fusión de células normales con una línea celular inmortalizada.

Las células de insecto incluyen, sin limitación, células Sf9, células SF21, células SF+, células Hi-Five, o células de larvas de insecto.

25 Los mamíferos de los que pueden obtenerse células incluyen ratas, ratones, monos, seres humanos, etc. Las células de mamífero adecuadas para la presente invención incluyen líneas de células epiteliales, líneas celulares de osteosarcoma, líneas celulares de neuroblastoma, carcinomas epiteliales, células gliales, líneas celulares hepáticas, células CHO (ovario de hámster chino), células COS, células BHK, células HeLa, células 911, 30 células AT1080, células A549, células 293 o células PER.C6, células humanas ECC NTERA-2, células D3 de la línea mESC, células NIH3T3, células REH y células MCF-7.

La expresión "factor tisular" o "TF", también conocido como "tromboplastina", "factor tisular plaquetario", "CD 142" o "factor de coagulación III", como se usa en la presente memoria, se refiere a una 35 glicoproteína integral de membrana que está ampliamente distribuida en el reino animal, que aparece en el tejido subendotelial, plaquetas, y leucocitos y es necesaria para el inicio de la formación de trombina a partir del zimógeno protrombina. Polipéptidos TF adecuados para su uso en la presente invención incluyen TF nativo o no mutante (wt) de cualquier especie animal, incluyendo seres humanos. Proteínas TF ejemplares que pueden usarse en la presente invención incluyen TF humana (número de acceso a UniProtKB P13726), TF de ratón (número de acceso a 40 UniProtKB P20352), TF de rata (número de acceso a UniProtKB P42533), TF de cerdo (número de acceso a NCBI Prot NP_998950), TF bovino (número de acceso a NCBI Prot AAB20755), TF de perro (número de acceso a NCBI Prot BAD98568), TF de cobaya (número de acceso a NCBI Prot AAF36523) y proteínas TF de diferentes organismos.

45 Como TF nativo contiene varios sitios de glicosilación, pueden obtenerse variantes de TF que contengan diferentes grados de glicosilación expresando TF en hospedadores capaces de realizar reacciones de N-glicosilación. El TF maduro contiene tres potenciales sitios de glicosilación ligada a N que tienen la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr localizada en Asn11 (secuencia Asn11-Leu12-Thr13), Asn124 (secuencia Asn124-Val125-Thr126) y Asn137 (secuencia Asn137-Asn138-Thr139). Así, las moléculas TF para su uso en la presente 50 invención incluyen variantes de TF que tienen un grado variable de glicosilación ligada a N en uno o más sitios de N-glicosilación. En levaduras, la glicosilación típicamente implica un núcleo interno de aproximadamente diez restos de manosa, ligado a la asparagina mediante dos restos de GlcNAc, y una cadena externa ramificada de 50-100 restos de manosa. Por lo tanto, la glicosilación ligada a N podría añadir potencialmente tantos como 300 restos de manosa a TF, un aumento en la masa molecular de aproximadamente 60 kDa. Además, también es posible que pudieran 55 unirse varios restos de manosa a diversos (más de 25) sitios de glicosilación ligados a O. En una realización particular, la microvesícula derivada de levadura que alberga TF de la invención comprende una proteína TF glicosilada. Como se usa en la presente memoria el término "glicosilado" incluye cualquier grado de glicosilación.

La expresión "variante de TF que tiene actividad pro-coagulante" se refiere a compuestos que 60 muestran sustancialmente la misma actividad o actividades biológicas que TF y son el resultado de la inserción, delección, o sustitución de uno o más restos aminoácidos. Ensayos funcionales adecuados que pueden usarse para evaluar si un polipéptido dado es una variante funcionalmente equivalente de TF son aquellos ensayos basados en la determinación de la capacidad de la variante de TF de unirse específicamente a FVIIa, o basados en la

determinación in vitro del tiempo de coagulación en plasma o sangre completa, mediante un ensayo in vivo en un modelo animal de hemorragia severa o mediante un ensayo in vivo en un modelo animal de hemorragia letal. Se han descrito procedimientos para realizar estos ensayos en el estado de la técnica y se resumen en los ejemplos de la presente invención (sección "Métodos") así como en la solicitud WO2008080989.

5

Variantes según la presente invención incluyen secuencias de aminoácidos que son al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 96% similares o idénticas a las moléculas TF nativas mencionadas anteriormente. Como se sabe en la técnica la "similitud" entre dos proteínas se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de una proteína con una secuencia de una segunda proteína. El grado de

10

identidad entre dos proteínas se determina usando algoritmos informáticos y métodos que son ampliamente conocidos para los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410(1990)].

15

20

La proteína TF tiene una estructura de dominios bien definida que comprende (1) un péptido señal o una región con una secuencia líder de 32 aminoácidos que se procesa de forma post-traducciona cuando se procesa la proteína de la forma inmadura en la forma madura; (2) un dominio extracelular hidrófilo N-glicosilado que comprende aproximadamente 219 aminoácidos terminales; (3) un fragmento de aproximadamente 23 aminoácidos, principalmente hidrófobos, que se cree que forman los aminoácidos del dominio transmembrana; y (4) el extremo carboxilo de 21 aminoácidos que se cree que son los aminoácidos que forman parte del fragmento citoplasmático de la proteína. La estructura de dominios de la proteína hTF permite la producción de, por ejemplo, el dominio extracelular de la proteína o fragmentos del mismo.

25

En una realización particular, el fragmento de TF que tiene actividad pro-coagulante comprende una proteína TF madura. La expresión "TF maduro" como se usa en la presente memoria, se refiere a la proteína TF cuya secuencia de aminoácidos carece del péptido señal. En una realización preferida, dicha proteína TF madura comprende la proteína TF madura humana. Además, en una realización específica, dicha proteína TF madura humana tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 1.

30

El fragmento de la proteína TF que tiene actividad pro-coagulante puede estar glicosilada, parcialmente glicosilada o no glicosilada. Así, en una realización particular, la microvesícula lipídica que alberga TF de la invención comprende un fragmento no glicosilado de la proteína TF que tiene actividad pro-coagulante, mientras que en otra realización particular, dicha microvesícula derivada de levadura que alberga TF de la invención comprende un fragmento glicosilado de la proteína TF que tiene actividad pro-coagulante. Como se ha mencionado

35

anteriormente, el término "glicosilado" incluye cualquier grado de glicosilación. En una realización preferida, el TF o la variante funcional del mismo que tiene actividad pro-coagulante contiene al menos un sitio de N-glicosilación no funcional.

45

En una realización preferida, el sitio o sitios de N-glicosilación son los correspondientes a los sitios de N-glicosilación NLT en las posiciones 11-13, NVT en las posiciones 124-126 o NNT en las posiciones 137-139 en el TF humano maduro. En una realización más preferida, el TF lleva una o más sustituciones de los restos Asn en restos que no son aceptores de N-glicosilación. En una realización aún más preferida, la variante de TF comprende una o más mutaciones Asn-a-Ala en los restos Asn en posiciones correspondientes a las posiciones 11, 124 o 137 en el TF humano maduro.

50

La glicosilación variará dependiendo del sistema de expresión usado para la producción de las vesículas lipídicas que albergan TF. Así, la invención proporciona una proteína factor tisular de mamífero recombinante que incluye al menos un glicano específico de plantas, un glicano específico de levaduras o un glicano específico de animales.

Además, como en el caso de la proteína TF, el fragmento de la proteína TF que tiene actividad procoagulante usada en la realización de esta invención, puede ser un miembro de una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión una primera región que comprende dicho fragmento de la proteína TF de la misma que tiene actividad pro-coagulante, unida a una segunda región que comprende otro péptido o proteína. Dicha segunda región puede estar unida a la región amino-terminal de dicho fragmento de la proteína TF o, alternativamente, dicha segunda región puede estar unida a la región carboxilo-terminal de dicho fragmento de la proteína TF. Tanto la primera como la segunda regiones pueden unirse directamente o unirse a través de un polipéptido enlazador entre dicha primera y segunda regiones.

55

60

En una realización particular, dicha proteína de fusión comprende un fragmento de la proteína TF que tiene actividad pro-coagulante y una marca unida al dominio C-terminal o N-terminal de dicho fragmento de la proteína TF. Dicha marca generalmente es un péptido o secuencia de aminoácidos que puede usarse en el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión. Ejemplos ilustrativos, non-limitantes de marcas adecuadas

para la producción de esta proteína de fusión incluyen los mencionados previamente en relación a la proteína de fusión en la que la primera región era una proteína TF. En una realización particular, dicha marca es una marca His unida al dominio C-terminal de dicha proteína TF o fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante. En otra realización, dicha marca es una marca His unida al dominio N-terminal de dicha proteína TF o fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante. En una realización particular, la proteína de fusión comprende una proteína TF madura, preferentemente, proteína TF madura humana. Esta proteína de fusión también tiene actividad pro-coagulante, la actividad pro-coagulante de la misma puede ensayarse como se ha mencionado previamente, por ejemplo, por cualquiera de los ensayos de coagulación mencionados en el ejemplo 2.

Además, la proteína TF puede proporcionarse formando parte de una proteína de fusión, conteniendo dicha proteína de fusión una primera región que comprende la proteína TF conectada a una segunda región que comprende otro péptido o proteína. Dicha segunda región puede unirse a la región amino-terminal de dicha proteína TF o, alternativamente dicha segunda región puede unirse a la región carboxilo-terminal de dicha proteína TF. Tanto la primera como la segunda regiones pueden unirse directamente entre sí o pueden unirse a través de un polipéptido enlazador entre dicha primera y segunda regiones.

En una realización particular, dicha proteína de fusión comprende una proteína TF y una marca, habitualmente una marca peptídica, unida al dominio C-terminal o N-terminal de dicha proteína TF. Dicha marca generalmente es un péptido o secuencia de aminoácidos que puede usarse en el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión. Así, dicha marca es capaz de unirse a uno o más ligandos, tales como, por ejemplo, uno o más ligandos de una matriz de afinidad tal como un soporte o perla de cromatografía con alta afinidad. Un ejemplo de dicha marca es un marca de histidina (marca His o HT), tal como una marca que comprende 6 restos de histidina (His6 o H6), que puede unirse a una columna de níquel (Ni²⁺) o cobalto (Co²⁺) con alta afinidad. La marca His, como se muestra en los ejemplos 1 (figura 4), tiene la característica deseable de que puede unirse a sus ligandos en condiciones que son desnaturizantes a la mayoría de las proteínas y perjudicial para la mayoría de las interacciones proteína-proteína. Así, puede usarse para eliminar la proteína señuelo marcada con H6 después de alterar las interacciones proteína-proteína con que ha participado el señuelo.

Ejemplos no limitantes, ilustrativos adicionales de marcas útiles para aislar o purificar una proteína de fusión incluyen marca Arg, marca FLAG, marca Estrep, un epítipo capaz de que lo reconozca un anticuerpo, tal como marca c-myc (reconocida por un anticuerpo anti-c-myc), marca SBP, marca S, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, marca glutatión S-transferasa, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, marca Avi, etc. (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2003), 60:523-525), una secuencia de aminoácidos tal como Ala-His-Gly-His-Arg-Pro (SEC ID N° 2); Pro-Ile-His-Asp-His-Asp-His-Pro-His-Leu-Val-Ile-His-Ser (SEC ID N° 3); Gly-Met-Thr-Cys-X-X-Cys (SEC ID N° 4); β -galactosidasa y similares.

En una realización particular, dicha marca es una marca His unida al dominio C-terminal de dicha proteína TF. En otra realización, dicha marca es una marca His unida al dominio N-terminal de dicha proteína TF.

En una realización particular, la proteína de fusión comprende un TF humano que carece de la secuencia señal o la variante del mismo que tiene actividad pro-coagulante que tiene una mutación N124A en el sitio de glicosilación y una marca de hexahistidina en el extremo C-terminal y se da por (SEC ID N° 5).

Dicha proteína de fusión puede obtenerse por medios convencionales, por ejemplo, mediante expresión génica de la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de fusión en una célula de levadura adecuada. La marca eventual puede usarse, si se desea, para el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión.

En otra realización particular, la primera etapa del método de la invención implica la expresión en la célula eucariota de un fragmento de TF que tiene actividad pro-coagulante.

Según la invención, una parte de dicha proteína TF o fragmento de la misma que tiene actividad procoagulante se integra en dicha membrana lipídica. Normalmente, dicha porción comprende la región lipófila de dicha proteína o fragmento (es decir, el dominio central de TF), mientras que las regiones hidrófilas de la misma (es decir, la región amino-terminal y la región carboxilo-terminal de dicha proteína TF) encarna el lado exoplasmático o endoplasmático de la membrana. Puede obtenerse información referente a las regiones lipófila e hidrófila de la proteína TF del documento WO2008080989. En una realización particular, el dominio N-terminal de la proteína TF o del fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante encara el lado exoplasmático de dicha membrana, mientras que en otra realización particular, el dominio N-terminal de dicha proteína TF o fragmento que tiene actividad procoagulante encara el lado endoplasmático de dicha membrana.

El método de expresión de TF o una variante del mismo depende de la célula eucariota usada. Generalmente, la célula eucariota se transforma con un vector de expresión que comprende la secuencia de

nucleótidos que codifica la proteína TF o un fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante, unida de forma funcional a un promotor funcional en cualquiera de las células que pueden usarse en la presente invención: células fúngicas, de levaduras, vegetales o animales (peces, reptiles, mamíferos, insectos, etc.).

5 El ADNc que codifica la proteína TF o un fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante puede amplificarse por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una biblioteca de ADNc como molde y los cebadores apropiados. El ejemplo 1 describe la amplificación del ADNc que codifica la proteína hTF madura con 18 nucleótidos extra (que codifican seis histidinas) en el extremo 3'.

10 Un "vector", como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. La expresión "vector de expresión de levadura", como se usa en la presente memoria se refiere a construcciones de expresión de ADN, por ejemplo, segmentos de ácido nucleico, plásmidos, cósmidos, fagos, virus o partículas virales capaces de sintetizar las proteínas objeto codificadas por sus genes recombinantes respectivos (es decir, proteína TF o un fragmento de la misma que tiene actividad pro-
15 coagulante) portados por el vector en una levadura. Alternativamente, también pueden usarse segmentos de ácido nucleico para crear células de levadura transgénicas, usando recombinación no direccional u homóloga, en la que el gen o genes de interés se integran de forma estable en el genoma de levadura. Normalmente, el vector de expresión de levadura comprende la secuencia de nucleótidos que codifica TF o un fragmento del mismo que tiene actividad pro-coagulante unida de forma funcional a un promotor que es funcional en células de levadura (es decir, un
20 promotor funcional en levaduras). Los vectores para su uso con la invención son, por ejemplo, vectores con capacidad de replicación y/o expresión autónoma de los ácidos nucleicos a los que se unen en células de levadura. En la presente memoria, los términos "plásmido" y "vector" se usan de forma intercambiable ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de un vector. Además, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y que llegarán a conocerse en la técnica con posteriormente a la
25 misma. Dicho vector de expresión de levadura puede ser un vector de expresión episómico de levadura o un vector de expresión de integración de levadura, y pueden obtenerse por técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia.

Así, en una realización, dicho vector de expresión de levadura es un vector de expresión episómico de
30 levadura. La expresión "vector de expresión episómico de levadura", como se usa en la presente memoria, se refiere a un vector de expresión que se mantiene como una molécula de ADN extra-cromosómica en el citoplasma de levadura. En una realización particular, dicho vector de expresión episómico de levadura, además de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína TF o un fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante unida de forma funcional a un promotor funcional de levadura, comprende adicionalmente: (i) un gen de selección de
35 levadura; (ii) un origen de replicación de levadura; (iii) un gen de selección bacteriano; y (iv) una señal de terminación de la transcripción de levadura. De forma ventajosa, dicho vector de expresión episómico de levadura comprende adicionalmente un sitio de restricción único para clonar el gen seleccionado (proteína TF o un fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante) bajo el control del promotor funcional de levadura y seguido de la señal de terminación de la transcripción de levadura.

40 Puede usarse prácticamente cualquier promotor funcional de levadura, gen de selección de levadura, origen de replicación de levadura, gen de selección bacteriano, señal de terminación de la transcripción de levadura, y sitio de restricción para clonación, en la fabricación de dicho vector de expresión episómico de levadura; no obstante, en una realización particular, se usa el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (pGPD)
45 como promotor funcional de levadura; en otra realización particular, se usa el gen URA3 (URA3) como gen de selección de levadura; en otra realización particular, se usa el origen de replicación de la levadura 2 micras (2 μ) como origen de replicación de levaduras; en otra realización particular, se usa el gen de resistencia a ampicilina (Amp) como gen de selección bacteriano; y en otra realización particular, se usa la señal de terminación de la transcripción de la fosfoglicerato quinasa (PGKt) como señal de terminación de la transcripción de levadura
50 específica. Así, en una realización específica (ejemplo 1-2), el vector de expresión episómico de levadura comprende (i) el gen URA3; (ii) el gen Amp para seleccionar y propagar el vector en E. coli; (iii) el origen de replicación 2 μ de levadura; (iv) el pGPD; (v) la señal de terminación de la transcripción de levadura específica de PGKt; y (vi) un sitio de restricción BamHI único que permite clonar los genes seleccionados bajo el control del pGPD, y seguido de la secuencia de PGKt. En otra realización, dicho vector de expresión de levadura es un vector de
55 expresión de integración de levadura. La expresión "vector de expresión de integración de levadura", como se usa en la presente memoria, se refiere a un vector que es capaz de integrarse en el genoma de levadura. En una realización particular, dicho vector de expresión de integración de levadura comprende: (i) un gen de selección bacteriano; y (ii) un casete de expresión insertado en un gen de selección de levadura, comprendiendo adicionalmente dicho casete de expresión un promotor funcional de levadura, una señal de terminación de la
60 transcripción de levadura y un sitio de restricción único para clonar el gen seleccionado (proteína TF o un fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante).

Puede usarse prácticamente cualquier gen de selección bacteriano, casete de expresión insertado en un gen de selección de levadura, promotor funcional de levadura, señal de terminación de la transcripción de levadura, y sitio de restricción único para clonar el gen seleccionado, en la fabricación de dicho vector de expresión de integración de levadura; no obstante, en una realización particular, se usa el gen de resistencia a ampicilina (Amp) como gen de selección bacteriano; en otra realización particular, se usa el casete de expresión pGPD-BamHI-PGKt insertado en la región central del gen URA3 como casete de expresión que contiene un promotor funcional de levadura (pGDP), una señal de terminación de la transcripción de levadura (PGKt), y un sitio de restricción único (BamHI) para clonar el gen seleccionado en la región central del gen URA3.

Puede usarse casi cualquier célula de levadura susceptible de transformarse con dicho vector de expresión de levadura que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína TF o un fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante, unida de forma funcional a un promotor funcional de levadura, en la presente invención. La transformación de células de levadura con dicho vector de expresión de levadura puede realizarse por medios convencionales conocidos para los expertos en la materia (Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual).

En una realización preferida, dicha levadura es una levadura no floculante (es decir, células de levadura que cuando se dispersan en un procedimiento de fermentación no floculan (agregan)). De forma ventajosa, dicha célula de levadura es una célula de levadura GRAS. Ejemplos ilustrativos no limitantes de células de levadura que pueden usarse en el procedimiento de la invención son las llamadas especies de levaduras alcohólicas (levaduras usadas para fabricar licores) que producen alcohol, ácido carbónico gaseoso, levadura del pan, y similares que metabolizan un material líquido de elaboración cervecera. Específicamente, las preferidas se seleccionan entre *S. cerevisiae*. Ejemplos de dichas levaduras alcohólicas incluyen células de levadura de la cerveza, células de levadura del vino, y células de levadura del sake. En una realización preferida de la invención, la célula de levadura es una célula de levadura del vino, tal como *S. cerevisiae* T73 ura3- (ejemplo 1).

La expresión "vector de expresión de plantas", como se usa en la presente memoria, se refiere a construcciones de expresión de ADN, por ejemplo, segmentos de ácido nucleico, plásmidos, cósmidos, fagos, virus o partículas virales capaces de sintetizar las proteínas objeto codificadas por sus respectivos genes recombinantes (es decir, proteína TF o un fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante) portados por vector en una planta. Alternativamente, también pueden usarse segmentos de ácido nucleico para crear células vegetales transgénicas, usando recombinación no direccional u homóloga, en que el gen o genes de interés se integran de forma estable en el genoma de la planta. Normalmente, el vector de expresión de plantas comprende la secuencia de nucleótidos que codifica TF o un fragmento del mismo que tiene actividad pro-coagulante unida de forma funcional a un promotor que es funcional en células vegetales (es decir, un promotor funcional de plantas). Los promotores funcionales de plantas que pueden usarse en la presente invención pueden seleccionarse entre el grupo compuesto por el promotor de la sacarosa sintetasa 1 de maíz, la alcohol deshidrogenasa 1 de maíz, el complejo recolector de luz del maíz, la proteína de choque térmico del maíz, la RuBP carboxilasa de subunidad pequeña del guisante, la manopina sintasa del plásmido Ti, la nopalina sintasa del plásmido Ti, la chalcona isomerasa de petunia, la proteína 1 rica en glicina de la alubia, la patatina de la patata, la lectina, CaMV 35S, y la RuBP carboxilasa de subunidad pequeña de S-E9. La transformación de sistemas hospedadores vegetales puede realizarse usando métodos convencionales. Puede verse una revisión de la transferencia génica a plantas en el libro de texto titulado "Ingeniería genética y transferencia génica", por Marta Izquierdo, Ed. Pirámide (1999), en particular, el capítulo 9, "Transferencia génica a plantas", páginas 283-316.

Los vectores para su uso con la invención son, por ejemplo, vectores con capacidad de replicación y/o expresión autónoma de ácidos nucleicos a los que están unidos en células de levadura. En la presente memoria, los términos "plásmido" y "vector" se usan de forma intercambiable ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de un vector.

Además, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y que llegarán a ser conocidas en la técnica posteriormente a la presente. Dicho vector de expresión de levadura puede ser un vector de expresión episómico de plantas o un vector de expresión de integración de plantas, y puede obtenerse por técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia. Puede usarse prácticamente cualquier promotor funcional de plantas, gen de selección de plantas, origen de replicación de plantas, gen de selección bacteriano, señal de terminación de la transcripción de plantas, y sitio de restricción para clonación, en la fabricación de dicho vector de expresión episómico de plantas.

Se ha desarrollado una gran cantidad de sistemas de producción en plantas particulares. Estos incluyen la expresión de proteínas en cuerpos oleosos (Rooijen et al., (1995) Plant Physiology 109:1353-61; Liu et al., (1997) Molecular Breeding 3:463-70), a través de rizosecreción (Borisjuk et al., (1999) Nature Biotechnology 17:466-69), en semillas (Hood et al., (1997) Molecular Breeding 3:291-306; Hood et al., (1999) En Chemicals via Higher Plant Bioengineering (ed. Shahidi et al.) Plenum Publishing Corp. pág. 127-148; Kusunadi et al., (1997)

Biotechnology and Bioengineering 56:473-84; Kusnadi et al., (1998) Biotechnology and Bioengineering 60:44-52; Kusnadi et al., (1998) Biotechnology Progress 14:149-55; Witcher et al., (1998) Molecular Breeding 4:301-12), en forma de epítomos en la superficie de un virus (Verch et al., (1998) J. Immunological Methods 220:69-75; Brennan et al., (1999) J. Virology 73:930-38; Brennan et al., (1999) Microbiology 145:211-20), y mediante expresión estable de proteínas en tubérculos de patata (Arakawa et al., (1997) Transgenic Research 6:403-13; Arakawa et al., (1998) Nature Biotechnology 16:292-97; Tacket et al., (1998) Nature Medicine 4:607-09). Las proteínas recombinantes también pueden estar dirigidas a las semillas, cloroplastos o secretarse para identificar la localización que da el nivel más elevado de acumulación de proteínas. Cada uno de estos podría adaptarse para expresar el factor tisular o fragmento en un hospedador vegetal adecuado.

10

Se ha informado de métodos generales adicionales para expresar proteínas en plantas. Véase el documento PCT/US02/23624 de Bascomb, N. et al.; y el documento PCT/US02/17927 de Hall, G. et al. Estos podrían adaptarse fácilmente para expresar la proteína factor tisular o fragmento en, por ejemplo, Arabidopsis así como una diversidad de otras plantas.

15

Se ha informado de métodos adicionales para expresar proteínas heterólogas en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Estos incluyen enfoque que provocan la expresión estable y constitutiva de la proteína de interés: 1) transferencia génica mediada por Agrobacterium; 2) captación directa de ADN incluyendo métodos para la captación directa de ADN en protoplastos; 3) captación de ADN inducida por breve choque eléctrico de células vegetales, 4) inyección de ADN en células o tejidos vegetales por bombardeo de partículas, mediante el uso de sistemas de micropipeta o mediante la incubación directa de ADN con polen en germinación; y 5) el uso de virus de plantas como vectores génicos. Puede usarse uno o una combinación de estos métodos para crear plantas que expresen el factor tisular y fragmentos funcionales del mismo.

25

La transferencia génica mediante cepas de Agrobacterium modificadas por ingeniería ha llegado a ser rutinaria para la mayoría de las plantas dicotiledóneas y para algunas plantas monocotiledóneas. Véase, por ejemplo, Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803. Vectores adicionales para su uso con la invención incluyen los "súper-binarios" descritos en la patente US 5591616 y el documento EPA 0604662A1, por ejemplo. Véase también Hood et al. (1984) Biotechnol. 2:702-709; Hood et al. (1986) J. Bacteriol. 168:1283-1290; Komari et al. (1986) J. Bacteriol. 166:88-94; Jin et al. (1987) J. Bacteriol. 169:4417-4425; Komari T. (1989) Plant Science 60:223-229; N° de acceso a la ATCC 37394).

30

La expresión "vector de expresión en animales", como se usa en la presente memoria se refiere a construcciones de expresión de ADN, por ejemplo, segmentos de ácido nucleico, plásmidos, cósmidos, fagos, virus o partículas virales capaces de sintetizar las proteínas objeto codificadas por sus genes recombinantes respectivos (es decir, la proteína TF o un fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante) portados por el vector en una célula animal. Alternativamente, también pueden usarse segmentos de ácido nucleico para crear células animales transgénicas, usando recombinación no direccional u homóloga, en la que el gen o genes de interés se integran de forma estable en el genoma animal. Normalmente, el vector de expresión en animales comprende la secuencia de nucleótidos que codifica TF o un fragmento del mismo que tiene actividad pro-coagulante unida de forma funcional a un promotor que es funcional en células animales (es decir, un promotor funcional de animales).

35

40

En una realización particular, las células animales son células de insecto. Ejemplos de sistemas de transfección en insectos incluyen virus específicos de insectos tales como Baculovirus recombinantes usados en la presente invención (véanse los ejemplos) y otros tales como los descritos en la patente US6130074A.

45

En aquellas realizaciones en las que la célula en la que tiene que expresarse el TF o la variante del mismo es de levadura, las levaduras se manipulan usando técnicas convencionales para la manipulación de levaduras y genética de levaduras. Véase, por ejemplo, Bacila et al., eds. (1978, Biochemistry and Genetics of Yeast, Academic Press, Nueva York); y Rose y Harrison. (1987, The Yeasts (2ª ed.) Academic Press, Londres). Los métodos para introducir ADN exógeno en hospedadores de levadura son bien conocidos en la técnica. Hay una amplia diversidad de métodos para la transformación de levaduras. La transformación de esferoplastos se muestra por Hinnen et al. (1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1919-1933); Beggs, (1978, Nature 275(5676): 104-109); y Stinchcomb et al., (publicación EPO N° 45.573; incorporada en la presente memoria por referencia), la electroporación se muestra por Becker y Gaurante, (1991, Methods Enzymol. 194:182-187), es uso de acetato de litio se muestra por Gietz et al. (2002, Methods Enzymol. 350:87-96) y Mount et al. (1996, Methods Mol. Biol. 53:139-145). Para una revisión de los sistemas de transformación de levaduras no Saccharomyces, véase Wang et al. (Crit. Rev. Biotechnol. 2001; 21(3): 177-218). Para procedimientos generales sobre ingeniería genética en levaduras, véase Barr et al., (1989, Yeast genetic engineering, Butterworths, Boston).

60

Una vez se ha transformado la célula eucariota con un vector que expresa TF elección, la siguiente etapa consiste en cultivar un cultivo de células eucariotas recombinantes que expresan la proteína TF o un fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante en condiciones que permitan la expresión de dicha

proteína TF, o fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante. En una realización particular, dicha célula eucariota se cultiva en un medio adecuado en el que dicha célula eucariota puede expresar el producto heterólogo deseado (proteína TF o fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante). Los medios de cultivo apropiados para cultivar células de levadura, vegetales, de insecto, de peces, de mamífero u otras eucariotas son bien conocidos para los expertos en la materia y se seleccionarán según el tipo de célula eucariota a cultivar. Puede usarse cualquier material para preparar un producto de fermentación o cultivo siempre que sea adecuado para la fermentación o cultivo causado por las células eucariotas empleadas, y pueden usarse materiales conocidos a voluntad. Pueden añadirse nutrientes apropiados y similares a los mismos cuando sea necesario.

Las condiciones de fermentación o cultivo celular no son diferentes de las condiciones conocidas en esencia y pueden fijarlas los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo que deben regularse son la composición del gas (oxígeno, etc.), temperatura, pH, etc. Los documentos US5618676, US5854018, US5856123 y US5919651 describían métodos y reactivos adecuados para la expresión de proteínas recombinantes usando promotores de levaduras. En una realización particular, la fermentación de células de levadura se sigue controlando la evolución de los parámetros principales en todo el procedimiento de fermentación y se detiene cuando la presión de oxígeno (PO₂) alcanza un estado estacionario.

En una segunda etapa, el método de la invención comprende recuperar microvesículas que albergan TF de las células que se han obtenido en la etapa (i).

El término "recuperar", como se usa en la presente memoria, se refiere al acto de separar las microvesículas que albergan TF de células intactas o lisadas así como de otros componentes celulares tales como ADN, proteínas, etc. y obtener de este modo una preparación parcial o totalmente purificada de microvesículas que albergan TF. En una realización preferida, la pureza de la fracción recuperada es de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 99% y el 100%.

La recuperación requiere la lisis de las células en ausencia de detergentes o, cuando se usan detergentes, usando concentraciones de dichos detergentes por debajo de la concentración micelar crítica (CMC). En el caso de que las células se obtengan de un organismo completo como una planta transgénica o un animal transgénico, la recuperación puede incluir una etapa de reducción del tejido a una suspensión celular usando métodos mecánicos o enzimáticos.

La suspensión celular o las células del cultivo celular, en el caso de que las microvesículas que albergan TF se recuperen de cultivos celulares, puede sedimentarse por métodos convencionales, tal como por centrifugación, y re-suspenderse en un tampón de lisis adecuado antes de someter dicho producto a homogeneización.

Las células vegetales y fúngicas tienen paredes de celulosa y quitina. Así, antes de la homogeneización, las células pueden requerir una etapa extra para retirar la pared celular. Esta etapa puede realizarse usando métodos mecánicos (por ejemplo, mediante el uso de un mortero y mano de mortero, prensa de french, mezcladora y similares) o enzimáticos (por ejemplo, usando celulasa, quitinasa, etc.) en presencia de una solución farmacéuticamente aceptable o tampón de lisis (agua, solución salina tamponada con fosfato (PBS), etc.).

Además, antes de la homogeneización, pueden eliminarse los desechos por filtración o centrifugación suave, típicamente aproximadamente 1.000xg durante menos de aproximadamente 30 minutos, preferentemente entre aproximadamente 5 a aproximadamente 20 minutos.

Los métodos para recuperar las microvesículas que albergan TF de las células obtenidas en la primera etapa del método de la invención pueden variar dependiendo de las células eucariotas usadas e incluyen sin limitación, centrifugación, cromatografía de filtración en gel, filtración en flujo tangencial o una combinación de los mismos.

En una realización preferida, las células se lisan por medios mecánicos y los núcleos, las células sin romper y los desechos se eliminan por centrifugación a baja velocidad, proporcionando un sobrenadante post-nuclear (PNS) Así, en una realización preferida, la preparación de microvesículas lipídicas se un sobrenadante post-nuclear.

En el caso particular en que se usan células de levadura como células hospedadoras para la preparación de microvesículas que albergan TF, pueden homogeneizarse células de levadura por métodos convencionales tales como alta presión en un homogeneizador para convertirlas en un homogeneizado de fermentación. El homogeneizado de fermentación después se somete a separación por métodos convencionales, tal como por centrifugación, para convertirlo en un sedimento y un extracto de levaduras aclarado (CYE) que contiene dichas microvesículas derivadas de levadura que albergan TF que tienen actividad pro-coagulante (es decir, la microvesícula derivada de levadura que alberga TF de la invención) que pueden recogerse por separado.

La presencia de proteína TF o un fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante puede determinarse por métodos convencionales, tal como, por análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal (mAb) específico anti-proteína TF. Además, la actividad pro-coagulante del CYE puede determinarse por cualquier ensayo convencional, tal como por cualquier ensayo de coagulación mencionado en el ejemplo 4, por ejemplo, típicamente por un ensayo de coagulación in vitro en plasma o en sangre completa no anticoagulada, etc.

Puede aplicarse examen adicional de muestras CYE por microscopía inmunolectónica con un mAb anti-TF marcado para identificar la presencia de TF en microvesículas derivadas de levadura o de otras eucariotas. Dichas microvesículas, que comprenden proteína TF o un fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante, también tienen actividad pro-coagulante y corresponden a las microvesículas derivadas de eucariotas que albergan TF de la invención.

Opcionalmente, si se desea, dichas microvesículas derivadas de células eucariotas que albergan TF (tal como una microvesícula derivada de levadura) que tienen actividad pro-coagulante pueden concentrarse, aislarse o purificarse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. A modo de ilustración, la purificación por cromatografía de afinidad de proteínas que contienen una marca peptídica (por ejemplo, una marca His, etc.), en el extremo C- o N-terminal, es un método bien estandarizado usado para obtener preparaciones altamente purificadas de una gran cantidad de proteínas. Como cualquier método cromatográfico, dicho método puede aumentarse en escala fácilmente. Podrían realizarse procedimientos de purificación alternativos tales como cromatografía de inmunoafinidad, aunque requerirían la disponibilidad de soluciones madre bien estandarizadas de anticuerpos mono o policlonales específicos anti-TF, especialmente para una producción aumentada en escala.

Así, el método de aislamiento y purificación dependerá, entre otras cosas, de la naturaleza de la proteína TF o fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante, es decir, si es una proteína de fusión que tiene una marca para unirse a uno o más ligandos de una matriz de afinidad tal como un soporte o perla de cromatografía con alta afinidad (por ejemplo, una marca His, etc.), o un epítipo capaz de reconocerse por un anticuerpo, tal como la marca c-myc (reconocida por un anticuerpo anti-c-myc), etc.

En una realización preferida, las microvesículas derivadas de levadura que albergan TF marcadas con histidina de la invención se obtienen de un extracto de levadura aclarado (CYE) según el procedimiento descrito previamente. Típicamente, el CYE se filtra (por ejemplo, a través de un filtro de 0,2 µm de tamaño de poro por filtración en flujo tangencial) antes de cargarse en una columna de afinidad apropiada (por ejemplo, columna de afinidad HiTrap); entonces, después de aplicar la muestra, se recupera el flujo continuo (material no unido), y la columna se somete a varios lavados y, después del último lavado, se eluyen las microvesículas derivadas de levadura que albergan (proteína TF-marca His) añadiendo a la columna un tampón apropiado (por ejemplo, un tampón que contiene imidazol) y se recogen las fracciones de elución y se dializan para convertirlas en microvesículas lipídicas derivadas de levadura que albergan (proteína TF-marca his) aisladas o purificadas.

También, en otra realización, las microvesículas que albergan TF de la invención pueden purificarse por un equipo ÄKTA prime. El ÄKTA prime es un sistema de cromatografía líquida automatizado de General Electric Healthcare que puede usarse para el desarrollo de protocolos de purificación convencionales usando columnas de cromatografía por exclusión de tamaño que podrían aumentarse en escala fácilmente para grandes producciones. En otra realización, puede usarse filtración en flujo tangencial o filtración en flujo tangencial de alto rendimiento (HPTFF).

En una realización particular, las microvesículas que albergan TF se recuperan usando una combinación de una o más etapas de filtraciones en flujo tangencial y/o una o más etapas de cromatografía por exclusión de tamaño.

En una realización particular, las microvesículas de levadura que albergan TF se recuperan usando una etapa de filtración en flujo tangencial seguido de una cromatografía por exclusión de tamaño y seguido de otra filtración en flujo tangencial. En una realización preferida, el tamaño de poro de la primera filtración en flujo tangencial es mayor que el tamaño de poro de la segunda (y posterior) filtraciones en flujo tangencial. En una realización más preferida, el tamaño de poro de la primera filtración en flujo tangencial es de 0,5 a 0,1 µm y el tamaño de poro de la segunda filtración en flujo tangencial es de 0,2 µm.

En una tercera etapa, el método de la invención comprende poner en contacto las microvesículas obtenidas en la etapa (ii) con un fosfolípido cargado negativamente en ausencia de detergentes en condiciones adecuadas para la incorporación de dicho fosfolípido en dichas microvesículas.

El término "fosfolípido", como se usa en la presente memoria, se refiere a un lípido que contiene uno o más grupos fosfato. Los fosfolípidos son de naturaleza anfipática; es decir, cada molécula consta de una parte

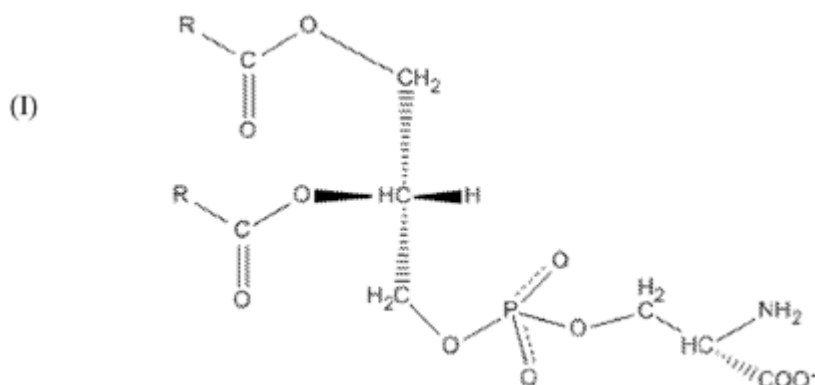
hidrófila (que le gusta el agua) y una parte hidrófoba (que odia el agua). En la presente memoria, el término "fosfolípido" incluye sales y derivados éster farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

Los fosfolípidos pueden clasificarse según el tipo de alcohol en fosfoglicéridos (o glicerofosfolípidos) cuando portan una estructura glicerol y esfingolípidos en los que los lípidos contienen esfingosina. Ambas clases están presentes en la membrana biológica. Los fosfoglicéridos son la clase más abundante de fosfolípidos encontrados en la naturaleza e incluyen, sin limitación, fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, y cardiolipina. La diversidad estructural dentro de cada tipo de fosfoglicérido es debe a la variabilidad de la longitud de cadena y el grado de saturación de los grupos éster de ácido graso.

La esfingomielina es el principal fosfolípido que contiene esfingosina. Su estructura general consta de un ácido graso unido a esfingosina por un enlace amida.

El término "fosfolípido cargado negativamente" o "NCP" se refiere a fosfolípidos que portan una carga negativa neta a niveles de pH fisiológico, es decir, en el intervalo de aproximadamente pH 7,3 a 7,5. Ejemplos de fosfolípidos cargado negativamente que pueden usarse en la presente invención incluyen fosfatidilserina (PS), ácido dipalmitoil y diestearoil fosfatídico (DPPA, DSPA), dipalmitoil y diestearoil fosfatidilserina (DPPS, DSPS), dipalmitoil, diestearoil fosfatidilglicerol (DPPG, DSPG), fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, cardiolipina, esfingolípidos (ceramidas-1-fosfato; fosfatidil etanolamina glicosilada; sulfátidos (hidroxilados o no); gangliósidos), fosfatidilinositolfosfatos y ácido fosfatídico.

En una realización preferida, el fosfolípido cargado negativamente es fosfatidilserina (PS), que es un fosfolípido formado por esterificación entre el grupo fosfato en la molécula de ácido fosfatídico y el grupo hidroxilo en la serina y que tiene la estructura representada en la fórmula



en la que la R es un ácido graso. La expresión "ácido graso", como se usa en la presente memoria, se refiere a ácidos alifáticos de cadena larga (ácidos alcanóicos) de longitudes de cadena variables, de aproximadamente C12 a C22, que contienen ninguna, una o más de una insaturación. Preferentemente, el ácido graso se selecciona entre el grupo de ácido esteárico (18:0 o ácido octadecanoico), ácido oleico (18:1 cis-9 o ácido (9Z)-octadec-9-enoico), ácido palmítico (16:0 o ácido hexadecanoico), ácido linoleico (18:2 (ω-6) o ácido cis,cis-9,12-octadecadienoico), ácido araquidónico (20:4 (ω-6) o ácido todo-cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico), ácido docosohexanoico (22:6 (n-3 o ácido (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico).

Los fosfolípidos cargados negativamente para su uso en la presente invención pueden estar purificados o aislados o ser sustancialmente puros. Un compuesto es "sustancialmente puro" cuando está separado de los componentes que lo acompañan en la naturaleza. Típicamente, un compuesto es sustancialmente puro cuando es al menos el 60%, más generalmente el 75% o más del 90%, en peso, del material total en una muestra. Un fosfolípido sustancialmente puro puede obtenerse, por ejemplo, por extracción de una fuente natural o por síntesis química. Así, por ejemplo, un fosfolípido que se sintetiza químicamente generalmente estará sustancialmente libre de sus componentes asociados en la naturaleza. La pureza puede medirse usando cualquier método apropiado tal como cromatografía en columna, electroforesis en gel, HPLC, etc. Sin embargo, no es esencial para un fosfolípido cargado negativamente que se purifique antes de su uso en la presente invención, con la condición de que el fosfolípido no esté asociado con componentes que interfieran sustancialmente con su utilidad. Los expertos en la materia apreciarán que puede usarse una fuente natural o fuente parcialmente purificada de un fosfolípido cargado negativamente en la invención, y que el componente de fosfolípido cargado negativamente puede constituir un pequeño porcentaje (por ejemplo el 10-20%, pero preferentemente al menos el 30%, 40%, 50% o más) del material total obtenido de dicha fuente.

El procedimiento para poner en contacto las microvesículas obtenidas en la segunda etapa (ii) del método de la invención con un fosfolípido cargado negativamente se hace en condiciones adecuadas para la incorporación del fosfolípido cargado negativamente dentro de la microvesícula lipídica. Las variables que pueden optimizarse durante la etapa de incubación incluyen la temperatura, pH, tampones adecuados, humedad, concentración de componentes, soluciones, etapas de lavado, etc. Estas variables pueden ajustar según sea necesario para obtener una proporción microvesícula/fosfolípido óptima.

Como se ha descrito anteriormente, la preparación de vesículas obtenida en la etapa (i) del método de la invención se compone de lípidos de membrana así como de proteínas que incluyen el factor tisular o variante del mismo expresadas en la célula hospedadora así como proteínas asociadas a membrana que aparecen de forma endógena en el hospedador. Sin embargo, para propósitos de cuantificación del rendimiento de las microvesículas, típicamente es más conveniente expresar la concentración de las microvesículas como microgramos de proteína por unidad de volumen. La concentración de proteínas en la muestra de microvesículas puede determinarse usando tecnologías convencionales de cuantificación de proteínas, tales como el ensayo de Bradford, el ensayo BCA, el ensayo de Biuret y similares.

Una vez se ha determinado la concentración de proteínas en las microvesículas, puede realizarse la etapa de contacto usando cualquier proporción adecuada de fosfolípido a microvesícula. Los expertos en la materia apreciarán que la proporción de fosfolípido a vesículas en la etapa de contacto puede variarse según las necesidades para conseguir una preparación de vesículas que muestre las mejores propiedades. Preferentemente, la concentración final adecuada de fosfolípido cargado negativamente puede calcularse usando un "ensayo de curva de saturación" mezclando el fosfolípido cargado negativamente particular usado y concentraciones crecientes de las microvesículas obtenidas en la etapa (ii) y determinar los tiempos de coagulación de las vesículas resultantes hasta que se determine una concentración óptima de ambos componentes. Aunque esta proporción de concentración habitualmente corresponde a la proporción de concentración que produce el fosfolípido cargado negativamente sustancialmente no libre (es decir, no incorporado a las microvesículas), la invención también contempla proporciones de ambos componentes que conducen a un exceso de fosfolípido no incorporado que puede eliminarse por métodos convencionales. Los expertos en la materia también entenderían que el fosfolípido cargado negativamente se incluiría en la bicapa lipídica de la microvesícula obtenida en la etapa (ii) a diferentes tasas dependiendo de la naturaleza del fosfolípido cargado negativamente y la naturaleza de la microvesícula obtenida en la etapa (ii) (es decir, microvesícula derivada de levadura, microvesícula derivada de insecto, etc.).

En una realización preferida, la etapa de contacto se realiza usando una concentración de proteína de aproximadamente 0,1 a 1000 µg/ml, 1 a 100 µg/ml, 10-90 µg/ml, 20-80 µg/ml, 30-70 µg/ml, 40-60 µg/ml, 45-55 µg/ml o µg/ml. La concentración de fosfolípido en la etapa de contacto es preferentemente de 0,001 mM - 1 mM, 0,005 mM - 0,5 mM, 0,1 mM - 0,4 mM, 0,2 mM - 0,3 mM.

En una realización preferida, la etapa de contacto se realiza usando una proporción proteína/fosfolípido de aproximadamente X µg de proteína a aproximadamente 0,005-1 µmol de fosfolípido, en el cual X es aproximadamente 5, 10, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100. En una realización aún más preferida, la etapa de contacto se realiza usando 0,05 µmol de fosfolípido para una preparación de vesículas que tiene 50 o menos de 50 µg de proteína o 1 µmol de fosfolípido para una preparación de vesículas que tiene al menos 50 µg de proteína.

Aunque la etapa de contacto se realiza habitualmente en condiciones adecuadas para la incorporación de la mayoría del fosfolípido en las vesículas sin dejar ningún exceso de fosfolípido sustancial, esto puede no ser necesariamente así, en cuyo caso puede realizarse una etapa adicional en la cual el exceso de fosfolípido cargado negativamente se elimina de la preparación de microvesículas enriquecidas con fosfolípido obtenida en la etapa (ii). Los expertos en la materia conocen diferentes métodos para eliminar el exceso tal como etapas de lavado adicionales, separación de capas, centrifugación, cromatografía, etc.

El exceso de fosfolípido puede eliminarse de las microvesículas enriquecidas con fosfolípido por varios métodos que producen una composición estable de microvesículas que albergan TF que tienen factor tisular asociado con e insertado a través de la bicapa lipídica. Los métodos adecuados para eliminar el detergente incluyen diálisis, diafiltración en flujo tangencial, filtración en fibra hueca de flujo transversal, tratamiento con resina de cromatografía hidrófoba, y simple dilución.

Microvesículas de la invención

El método de la invención produce microvesículas que albergan TF que muestran propiedades pro-coagulantes mejoradas y estabilidad aumentada en comparación con microvesículas que no se han puesto en contacto con fosfolípidos cargados negativamente. Así, en otro aspecto, la invención está relacionada con una microvesícula que se ha preparado usando el método de la invención.

El término "microvesícula" se ha descrito en detalle anteriormente y se refiere esencialmente a un compartimento cerrado que comprende esencialmente una monocapa lipídica o una bicapa lipídica. Las microvesículas pueden mostrar un diámetro que varía dentro de un amplio intervalo. Típicamente, dicho tamaño es igual a o inferior de 10 μm , típicamente igual a o inferior de 0,5 μm . En una realización particular, el tamaño de las microvesículas derivadas de levadura que albergan TF de la invención varía de 10 a 0,01 μm . Como las microvesículas obtenidas según los métodos de la invención derivan de eucariotas, su composición proteica y lipídica reflejará la de las membranas del organismo del cual deriva.

En el caso particular en que las microvesículas derivan de células de levadura, habitualmente contienen fosfolípidos específicos de levadura tales como ergosterol y cardiolipina.

Cuando las microvesículas se obtienen de células vegetales, éstas contienen lípidos específicos de membrana celular vegetal tales como fitosterol, estanoles, estanolésteres, tocoferoles, d-alfa tocoferoles, d, l-alfa tocoferoles, tocotrienoles, fitosterol o triterpeno que comprende un beta-sitosterol, un campesterol, un estigmasterol, un estigmastanol, un beta-sitostanol, un sitostanol, un desmosterol, un calinasterol, un poriferasterol, un clonasterol o un brasicasterol.

Cuando las microvesículas se obtienen de células animales, éstas contienen lípidos específicos de membrana celular animal tales como colesterol o la composición lipídica de membrana de mamífero típica.

Cuando las microvesículas se obtienen de células de insecto, éstas contienen lípidos específicos de membrana celular de insecto o la composición lipídica de membrana de insecto típica tal como altas cantidades de diacilglicerol. (Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry, and Biology Book de David W. Stanley-Samuelson, Dennis R. Nelson; University of Nebraska Press, 1993).

Aunque se prefiere que las microvesículas de la invención estén libres de otra materia particulada, el efecto procoagulante se observa dentro de un amplio intervalo de pureza de las microvesículas. Así, las microvesículas de la invención pueden proporcionarse en una preparación que comprende, con respecto a materia particulada no de microvesícula, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% de microvesículas.

Composiciones liofilizadas de la invención

Como reconocerán los expertos en la materia, cualquiera de las composiciones de microvesícula de la invención puede liofilizarse para su almacenamiento, y reconstituirse, por ejemplo, con un medio acuoso (tal como agua estéril, solución tamponada con fosfato, o solución salina acuosa), con la ayuda de agitación vigorosa.

El término "liofilización", "secado por congelación" o las variantes equivalentes gramaticales del mismo, se refiere a un procedimiento de deshidratación típicamente usado para conservar un material perecedero o hacer al material más adecuado para el transporte que funciona congelando el material y después reduciendo la presión adyacentes y añadiendo suficiente calor para permitir que el agua congelada en el material sublime directamente de la fase sólida a la gaseosa.

Los expertos en la materia conocen diferentes procedimientos de liofilización y congelación que pueden usarse. La liofilización puede realizarse usando un equipo convencional tal como evaporadores rotatorios, liofilizadores de colector y liofilizadores de bandeja. En una realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden congelarse en hielo seco, después liofilizarse usando un ciclo que empieza a -40°C y acaba a temperatura ambiente, durante un periodo de 48 horas. El reactivo resultante puede reconstituirse a la concentración de trabajo con la adición de Tris 0,1 M, pH 7,5, trehalosa 150 mM para producir una solución que contiene las vesículas de la invención a aproximadamente 10-250 $\mu\text{g/ml}$.

Para evitar la aglutinación o la fusión de los lípidos y/o las vesículas como resultado de la liofilización, puede ser útil incluir crioprotectores que evitan que suceda dicha fusión o aglutinación. El término "crioprotector" se refiere a un agente que protege a la partícula lipídica sometida a deshidratación-rehidratación, congelación-descongelación, o liofilización-rehidratación de la fusión de las vesículas y/o la filtración de los contenidos de las vesículas e incluyen, sin limitación, sorbitol, manitol, cloruro sódico, glucosa, trehalosa, polivinilpirrolidona y poli(etilenglicol) (PEG), por ejemplo, PEG 400. Estos y otros aditivos se describen en la bibliografía, tal como en la U.S. Pharmacopeia, USP XXII, NF XVII, The United States Pharmacopeia, The National Formulary, United States Pharmacopeial Convention Inc., 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, Md. 20852, cuyas descripciones se incorporan por la presente en la presente memoria por referencia en su totalidad. Las preparaciones liofilizadas generalmente tienen la ventaja de una mayor vida útil.

Composiciones farmacéuticas de la invención

En otro aspecto, la invención está relacionada con una composición farmacéutica de la invención que comprende las vesículas obtenidas según el método de la invención, en solución/suspensión o en forma liofilizada y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica después se formula en una forma farmacéutica de administración adecuada para su administración a un sujeto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden microvesículas de la invención que comprenden proteína TF humana o cualquiera de las variantes de la misma que tienen actividad procoagulante y que se han descrito en detalle anteriormente, incluyendo TF humano maduro, TF humano trincado, variantes de glicosilación de TF, TF marcado y variantes que llevan más de una de las modificaciones anteriores tales como el TF maduro que lleva una marca de hexahistidina en el extremo C-terminal y una mutación N124A.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier sustancia adecuada para suministrar una composición terapéutica útil en el método de la presente invención a un sitio in vivo o ex vivo adecuado sin causar efectos adversos indeseables como toxicidad, irritación, reacción alérgica u otro problema o complicación con un riesgo razonable de incidencia. Puede usarse prácticamente cualquier vehículo que no afecte de forma adversa a las microvesículas de la invención en dichas composiciones de la invención. En una realización, dicho vehículo es un medio sustancialmente líquido, tal como el medio que rodea las microvesículas que albergan TF de la invención obtenidas haciendo funcionar el procedimiento de la invención. Por lo tanto, en una realización particular, la composición de la invención comprende el extracto eucariota aclarado obtenido en el funcionamiento del procedimiento de la invención, en el cual se ha añadido el fosfolípido cargado negativamente.

Puede encontrarse información acerca de vehículos y excipientes, así como acerca de dichas formas de administración adecuadas para la administración de dicho producto de la invención, en tratados de farmacia galénica. Puede encontrarse una revisión de las diferentes formas farmacéuticas de administración de fármacos en general, y de sus procedimientos de preparación, en el libro titulado "Tratado de Farmacia Galénica", por C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

En una realización particular, la composición farmacéutica que comprende una microvesícula que alberga TF de la invención puede formularse junto con un promotor de la coagulación.

En la presente invención "promotor de la coagulación" puede considerarse como cualquier agente que promueve el procedimiento por el cual la sangre forma coágulos.

Agentes útiles como promotores de la coagulación son agentes químicos adsorbentes tales como zeolín; trombina; componentes de la cascada de coagulación tales como los factores de coagulación I, II, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII etc.; cofactores tales como calcio, vitamina K; y similares. En una realización preferida, el promotor de la coagulación usado se selecciona entre el grupo de factor VII (como precursor o como forma activa), factor X (como precursor o como forma activa) y combinaciones de los mismos.

Aunque se prefiere que las composiciones farmacéuticas de la invención comprendan microvesículas purificadas, también es posible que la composición comprenda microvesículas sustancialmente purificadas. Las microvesículas pueden purificarse por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para producir una preparación que comprenda, con respecto a materia particulada no de microvesícula, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% de microvesículas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de las microvesículas que albergan TF. Dicha cantidad puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo de la dosificación, vía de administración y similares. Típicamente, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender entre aproximadamente 10 µg de microvesícula activa de la invención/ml y 300 µg de microvesícula activa de la invención/ml, preferentemente entre 20 µg de proteína activa/ml y 200 µg de proteína activa/ml, e incluso más preferentemente entre aproximadamente µg de microvesícula activa de la invención/ml y 100 µg de microvesícula activa de la invención/ml.

La dosis a administrar al sujeto puede variar dentro de un intervalo muy amplio, por ejemplo, entre aproximadamente 1,0 pg de microvesícula activa de la invención/ml y 1,0 mg de microvesícula activa de la invención/ml, preferentemente entre 0,05 µg de microvesícula activa de la invención/ml y 100 µg de microvesícula activa de la invención/ml, e incluso más preferentemente entre aproximadamente 0,1 µg de microvesícula activa de la invención/ml y 50 µg de microvesícula activa de la invención/ml. La dosis de microvesículas de la invención a administrar dependerá de varios factores, incluyendo entre ellos, las características de la proteína TF o fragmento de

la misma que tiene actividad procoagulante usada, tales como por ejemplo, su actividad y semivida biológica, concentración de la proteína TF o fragmento de la misma que tiene actividad pro-coagulante en la formulación, el estado clínico del sujeto o paciente, el trastorno hemorrágico a tratar, etc. Por esta razón, las dosis mencionadas en la presente memoria deben considerarse solamente como directrices para los expertos en la materia, y estas 5 personas deben ajustar las dosis según las variables mencionadas previamente. No obstante, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse una o más veces al día para propósitos preventivos o terapéuticos.

10 Cuando se liofilizan las microvesículas que albergan TF, pueden resuspenderse en disolvente para su re-ensamblaje antes de la administración a un animal. Cuando se suministran liofilizadas, las microvesículas se reorman espontáneamente una vez se ha expuesto la composición al entorno hidrófilo dentro del cuerpo de un animal.

15 Usos terapéuticos de la invención

Usos relacionados con la coagulación sanguínea

Diferentes ensayos han demostrado que las microvesículas de la invención que comprenden una 20 microvesícula que alberga TF que se ha tratado con un fosfolípido cargado negativamente tienen una actividad pro-coagulante potenciada y estabilidad aumentada. El ejemplo 2 muestra ensayos in vitro que demuestran que las microvesículas de la invención causan la formación de coágulos de fibrina y la coagulación sanguínea tanto en condiciones sanas como de pacientes incluyendo plasma y sangre de pacientes sanos, plasma deficiente en FVIII, FIX o FXI (ensayos de coagulación en plasma); sangre de pacientes que muestran una deficiencia plaquetaria 25 adquirida (ensayos de coagulación en sangre trombocitopénica), plasma deficiente en FXI en presencia de un anticuerpo anti-FVII (ensayos de coagulación en plasma) así como sangre de pacientes hemofílicos, de von Willebrand y tratados con warfarina. Estos resultados muestran claramente que microvesículas derivadas de levadura que albergan TF de la invención son agentes pro-coagulantes o antihemorrágicos útiles para el tratamiento tópico de hemorragias en un sujeto.

30 Así, en otro aspecto, las microvesículas de la invención y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse como medicamento, concretamente, como agente pro-coagulante, o como agente antihemorrágico, particularmente, como agente antihemorrágico para aplicación tópica, en el tratamiento de hemorragias en un sujeto. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención está relacionada con la microvesícula de la 35 invención para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, la invención está relacionada con un método para el tratamiento de hemorragias en un sujeto, que comprende la administración de las microvesículas o composiciones de la invención a dicho sujeto, con el uso de las microvesículas o composiciones de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de hemorragias en un sujeto así como una microvesícula o composición de la invención para su uso en el tratamiento de hemorragias.

40 Las microvesículas de la invención pueden usarse directamente de forma tópica para tratar la hemorragia en un sujeto, es decir, sin combinarlas con un vehículo farmacéuticamente aceptable, ya que estas microvesículas son sustancialmente inocuas para un sujeto. Sin embargo, generalmente se prefiere que las microvesículas de la invención se formulen en una forma farmacéutica de administración adecuada para su 45 administración, preferentemente, para su administración tópica para el tratamiento tópico (local) de hemorragias.

Entonces, las microvesículas de la invención pueden formularse en una forma farmacéutica de administración, preferentemente una forma farmacéutica de administración adecuada para su administración tópica, para cuyo fin se incorporarán vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación 50 de la forma farmacéutica de administración deseada. Puede encontrarse información acerca de dichos vehículos y excipientes, así como acerca de dichas formas de administración adecuadas para la administración de dicho producto de la invención, en tratados de farmacia galénica. Puede encontrarse una revisión de las diferentes formas farmacéuticas de administración de fármacos en general, y de sus procedimientos de preparación, en el libro titulado "Tratado de Farmacia Galénica" ("Galenic Pharmacy Treatise"), por C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. 55 de Ediciones.

Aunque podrían usarse diferentes formas farmacéuticas de administración de las microvesículas de la invención, la administración de dicho producto de forma tópica es más ventajosa en la práctica; por lo tanto, dichas microvesículas de la invención se formulará en una forma farmacéutica adecuada para su administración tópica. 60 Ejemplos ilustrativos no limitantes de dichas formas farmacéuticas incluyen aerosoles, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, ungüentos, cremas, vendajes, parches, pomadas, enjuagues bucales, etc. Para ese fin, la composición farmacéutica de la invención incluirán los vehículos, medios y/o excipientes farmacéuticamente

aceptables necesarios para preparar la forma farmacéutica de administración de las microvesículas de la invención para administración tópica.

Por lo tanto, en una realización particular, la composición farmacéutica de la invención es una
5 composición farmacéutica para la administración tópica de la microvesícula de la invención que comprende dicho producto y un vehículo, medio o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración tópica de dicha microvesícula de la invención.

Ejemplos ilustrativos no limitantes de vehículos, medios o excipientes farmacéuticamente aceptables
10 adecuados para la administración tópica de dichas microvesículas de la invención pueden encontrarse en tratados de farmacia galénica.

Las microvesículas de la invención y combinaciones de las mismas y las composiciones farmacéuticas de la invención o combinaciones de las mismas pueden usarse junto con otros fármacos adicionales útiles en la
15 prevención y/o tratamiento de una diátesis hemorrágica (por ejemplo, factores de coagulación, plasma humano, etc.) para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden ser parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden proporcionarse en forma de una composición diferente para su administración simultánea o sucesiva (secuencia en el tiempo) con respecto a la administración de la composición farmacéutica de la invención.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden ponerse sobre un soporte. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención está relacionada con un producto que comprende la composición farmacéutica de la invención o combinaciones de los mismos y un soporte. El término "soporte", como se usa en la presente memoria, se refiere a un sustrato de material adecuado que permite depositar las composiciones farmacéuticas de la
25 invención sobre el mismo, su transporte y su liberación en el sitio deseado, por ejemplo, en el sitio donde las composiciones farmacéuticas de la invención ejercen su efecto terapéutico. Dicho soporte puede ser un soporte sólido o un soporte no sólido, por ejemplo, un soporte líquido o un soporte gaseoso. Ejemplos ilustrativos no limitantes de soportes sólidos incluyen vendajes, tiritas, compresas, esparadrapos, etc. Ejemplos ilustrativos no limitantes de soportes líquidos incluyen geles, pulverizaciones, enjuagues bucales, etc. Ejemplos ilustrativos no
30 limitantes de soportes gaseosos incluyen aire, propulsores, etc. Este producto que comprende las microvesículas de la invención o las composiciones farmacéuticas de la invención puede obtenerse por métodos convencionales, por ejemplo, mezclando las microvesículas de la invención y el soporte. La interacción entre las microvesículas de la invención y el soporte puede ser una interacción física o química, dependiendo de la naturaleza de los componentes de las vesículas, las composiciones o la composición farmacéutica de la invención y del soporte usado.

En otro aspecto, la invención está relacionada con las microvesículas de la invención o las composiciones farmacéuticas de la invención o combinaciones de las mismas para el tratamiento de hemorragias en un sujeto, en particular, para el tratamiento tópico de hemorragias en un sujeto sano o en un sujeto con una diátesis hemorrágica.

La expresión "tratamiento tópico", como se usa en la presente memoria, se refiere a la aplicación del tratamiento directamente al sitio donde se requiere, por ejemplo, en secciones discontinuas de piel (cortes, etc.) y tejido vascular (vasos rotos, etc.) en hemorragia venosa y arterial debido a heridas abiertas, cirugía, etc. y en hemorragias mucocutáneas y microvasculares.

Según esta invención y como se muestra en el ejemplo 2, las microvesículas de la invención pueden actuar como agente pro-coagulante o antihemorrágico y, por consiguiente, dicho producto puede usarse para tratar o corregir trastornos hemorrágicos, particularmente aquellos trastornos hemorrágicos asociados con diátesis hemorrágica.

La expresión "diátesis hemorrágica" se refiere al procedimiento que causa un trastorno hemostático y que, como resultado, da lugar a la aparición de un síndrome hemorrágico que puede aparecer ocasionalmente con sangrado extendido y excesivo. La diátesis hemorrágica puede estar causada por una coagulopatía congénita o adquirida y/o por un trastorno plaquetario congénito y adquirido.

El término "coagulopatía" se refiere a un trastorno de factor de coagulación. Este trastorno puede deber a una deficiencia o déficit de un factor de coagulación específico, cuya consecuencia será la aparición de un síndrome hemorrágico, o debido a un trastorno de factor de coagulación. La coagulopatía generalmente puede ser una coagulopatía congénita o una coagulopatía adquirida.

Como ejemplos ilustrativos no limitantes de coagulopatías congénitas, pueden mencionarse deficiencias de factores de coagulación seleccionados entre el factor de coagulación V (FV), factor de coagulación VII (FVII), factor de coagulación VIII (FVIII), cuyo déficit o deficiencia causa hemofilia A, factor de coagulación IX (FIX) cuyo déficit o deficiencia causa hemofilia B, factor de coagulación X (FX), factor de coagulación XI (FXI) cuyo

déficit o deficiencia causa hemofilia C, factor de coagulación XII (FXII), factor de coagulación XIII (FXIII) y sus combinaciones.

Las coagulopatías adquiridas pueden tener diferentes orígenes. Ejemplos ilustrativos incluyen
 5 deficiencias en la síntesis de factor de coagulación en fallo hepático severo, terapia anticoagulante (tal como heparina, heparinas de bajo peso molecular, warfarina, derivados de cumarina, dicumarinas, etc.). Un mecanismo alternativo se basa en un consumo exagerado de factores de coagulación de modo que no están disponibles para formar el coágulo en una lesión sangrante. Este mecanismo sucede en el síndrome de coagulación intravascular
 10 diseminada o coagulopatía debida al consumo que sucede en enfermedades múltiples tal como en sepsis severa que daña el endotelio de microcirculación que activa las plaquetas y los factores de coagulación con la formación de múltiples microtrombos; en invasión sanguínea por TF tal como liberación placentaria; en la retención de un feto muerto; en traumatismos múltiples con el aplastamiento de tejidos; en mordeduras de serpientes venenosas, etc. En vasculitis, el daño parietal y endotelial libera activadores de la coagulación. El consumo de factores de coagulación se empeora por la lisis de la fibrina de numerosos microtrombos debido a la acción de la plasmina con la liberación
 15 de PDF, que son antiplaquetarios y anticoagulantes.

La expresión "trastorno plaquetario" se refiere a un trastorno tanto en la cantidad como en la capacidad funcional de las plaquetas, cuyo resultado es la aparición de un síndrome hemorrágico. Dicho trastorno
 20 plaquetario puede ser congénito o adquirido.

En una realización particular, dicho trastorno plaquetario es un trastorno plaquetario congénito. Ejemplos ilustrativos no limitantes de trastornos plaquetarios congénitos incluyen enfermedad de Glanzmann, enfermedad de Bernard Soulier, síndrome de Bolin-Jamieson, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de Paris-Trousseau-Jacobsen, trombocitopenia del cromosoma X, síndrome plaquetario de Gray, síndrome de Sebastian y
 25 anemia de Fanconi.

En otra realización particular, dicho trastorno plaquetario es un trastorno plaquetario adquirido. Ejemplos ilustrativos no limitantes de trastornos plaquetarios adquiridos incluyen trastornos mieloproliferativos, tales como trombocitemia, policitemia, leucemia mielocítica crónica, etc.; hay trastornos plaquetarios funcionales en
 30 metaplasia mieloide con un tiempo aumentado de sangrado, defectos de retención en perlas de vidrio, defecto de agregación plaquetaria, liberación anormal, y defecto del factor plaquetario III. Se han encontrado defectos plaquetarios funcionales en disproteinemias en escorbuto y en cardiopatía congénita y cirrosis.

Las expresiones "coagulopatía adquirida" y "trastorno plaquetario adquirido" se refieren al origen del
 35 trastorno, que puede ser iatrogénico o secundario a otra enfermedad.

El término "sujeto" como se usa en la presente memoria incluye cualquier miembro de una especie animal, incluyendo la especie humana; a modo de ejemplo ilustrativo no limitante, dicho sujeto puede ser un mamífero, tal como un primate, un animal doméstico, un roedor, etc., dicho sujeto es preferentemente un hombre o
 40 mujer de cualquier edad o raza. En una realización particular, dicho sujeto es un ser humano sin historial de trastornos de hemostasis, tal como un individuo que no tiene coagulopatías o trastornos plaquetarios. En otra realización particular, dicho sujeto es un ser humano que tiene un historial de trastornos de hemostasis, tal como un individuo que tiene diátesis hemorrágica, por ejemplo, una coagulopatía, tal como una coagulopatía congénita o adquirida, o un trastorno plaquetario, tal como un trastorno plaquetario congénito o adquirido.
 45

Por lo tanto, en una realización particular, la invención está relacionada con las microvesículas de la invención o de las composiciones farmacéuticas de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento tópico de hemorragias en un ser humano sin historial de trastornos de hemostasis. En otra realización particular, la invención está relacionada con el uso de las microvesículas de la invención o de las composiciones
 50 farmacéuticas de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento tópico de hemorragias en un ser humano que tiene una diátesis hemorrágica.

Usos relacionados con la curación de heridas

Además del papel en la coagulación sanguínea, el TF promueve la reparación y curación de heridas (Nakagawa, et al. (1998) *Seminars in Thromb. and Hemostasis* 24:207-210; Philippart, et al. (2003) *The Internatl. J. of Oral and Maxillofacial Implants* 3:411-416).
 55

Así, en otro aspecto, la invención está relacionada con el uso de las microvesículas de la invención o
 60 de una composición farmacéutica de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de curación de heridas. Alternativamente, la invención está relacionada con una microvesícula de la invención o con una composición farmacéutica para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de curación de heridas. Alternativamente, la invención está relacionada con un método para el tratamiento de curación de heridas

en un paciente, que comprende la administración a dicho sujeto de microvesículas de la invención o una composición farmacéutica de la invención.

La expresión "curación de heridas" se refiere a la curación de heridas de cualquier tipo y en cualquier sitio. Puede ser curación de heridas normal y alterada. La última se encuentra en particular en el caso de enfermedades, tales como diabetes mellitus, vasculitis, enfermedad arterial oclusiva, úlcera venosa crónica y/o infectada así como úlcera gástrica de mala curación. La curación de heridas alterada también se encuentra en el caso de alteración de la innervación tal como paraplejía, lepra, neuropatía, etc., y gangrena decubital de personas que necesitan cuidados. La curación de heridas alterada también se da si existen suturas débiles y curación alterada después de operaciones, particularmente de los intestinos y trasplantes de piel y otros órganos, respectivamente. La curación de heridas alterada también se encuentra en el caso de fracturas de huesos, quemaduras y tratamientos usando esteroides.

En la presente invención "curación de heridas" o "reparación de heridas" se refiere a un procedimiento intrincado en que la piel (o algún otro órgano) se auto-repara después de una lesión. Como se usa en la presente memoria, el término "herida" incluye una lesión a cualquier tejido, incluyendo por ejemplo, retardo o dificultada para curar heridas, y heridas crónicas. Ejemplos de heridas pueden incluir heridas tanto abiertas como cerradas. El término "herida" también puede incluir, por ejemplo, lesiones a la piel y el tejido subcutáneo iniciadas de diferentes modos (por ejemplo, úlceras por presión debido a descanso prolongado en cama y heridas inducidas por traumatismo) y con características variables. Las heridas pueden clasificarse en uno de cuatro grados dependiendo de la profundidad de la herida: i) heridas de grado I limitadas al epitelio; ii) heridas de grado II que se extienden en la dermis; iii) heridas de grado III que se extienden en el tejido subcutáneo; y iv) heridas de grado IV (o heridas de grosor completo) donde los huesos quedan expuestos (por ejemplo, un punto de presión óseo tal como el trocánter mayor o el sacro).

La expresión "herida crónica" se refiere en líneas generales a una herida que no se ha curado. Las heridas que no se curan en tres meses, por ejemplo, se consideran crónicas. Las heridas crónicas incluyen úlceras venosas, úlceras venosas por estasis, úlceras arteriales, úlceras por presión, úlceras diabéticas, úlceras diabéticas en el pie, úlceras vasculíticas, úlceras decubitales, úlceras por quemadura, úlceras inducidas por traumatismo, úlceras infecciosas, úlceras mixtas, y pioderma gangrenoso. La herida crónica puede ser una úlcera que comprende ulceraciones resultantes del bloqueo arterial completo o parcial. La herida crónica puede ser una úlcera venosa o venosa por estasis que comprende ulceraciones resultantes de un mal funcionamiento de la válvula venosa y la enfermedad vascular asociada. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se caracteriza por una o más de las siguientes fases AHCPR de ulceración por presión: fase 1, fase 2, fase 3, y/o fase.

Como se usa en la presente memoria, herida crónica puede hacer referencia a, por ejemplo, una herida que se caracteriza al menos en parte por uno o más de (1) un estado de auto-perpetuación crónico de la inflamación de la herida, (2) una matriz extracelular deficiente y defectuosa de la herida, (3) células poco respondedoras (senescentes) en la herida especialmente fibroblastos, producción limitante de matriz extracelular, y/o (4) fallo de la re-epitelialización debido en parte a la ausencia de la organización necesaria de la matriz extracelular y la ausencia de estructura para la migración. Las heridas crónicas también pueden caracterizarse por 1) inflamación prolongada y actividad proteolítica que conduce a lesiones ulcerosas, incluyendo por ejemplo, úlceras diabéticas, por presión (decubitales), venosas, y arteriales; 2) deposición progresiva de matriz en el área afectada, 3) tiempos de reparación más largos, 4) menos contracción de la herida, 5) re-epitelialización más lenta, y 6) grosor aumentado del tejido de granulación.

Heridas crónicas ejemplares pueden incluir "úlceras por presión". Las úlceras por presión ejemplares pueden clasificarse en 4 fases basadas en las directrices de la AHCPR (Agency for Health Care Policy and Research, U.S. Department of Health and Human Services). Una úlcera por presión en fase I es una alteración observable relacionado con presión de piel intacta cuyos indicadores en comparación con el área adyacente u opuesta en el cuerpo pueden incluir cambios en uno o más de los siguientes: temperatura de la piel (calor o frío), consistencia tisular (sensación firme o blanduzco) y/o sensación (dolor, picor). La úlcera aparece como un área definida de rojez persistente en piel débilmente pigmentada, mientras que en tonos de piel más oscura, la úlcera puede aparecer con color rojo, azul, o morado persistente. La ulceración en fase 1 puede incluir eritema no blanqueable de piel intacta y la lesión precedentes de ulceración cutánea. En individuos con piel más oscura, la decoloración de la piel, calor, edema, endurecimiento, o dureza también pueden ser indicadores de ulceración en fase 1. La ulceración en fase 2 puede caracterizarse por pérdida parcial del grosor de la piel implicando epidermis, dermis, o ambas. La úlcera es superficial y se presenta clínicamente como una abrasión, ampolla, o cráter poco profundo. La ulceración en fase 3 puede caracterizarse por pérdida completa del grosor de la piel implicando daño a o necrosis del tejido subcutáneo que puede extenderse hacia abajo hasta, pero no a través, de la fascia subyacente. La úlcera se presenta clínica como un cráter profundo con o sin socavado del tejido adyacente. La ulceración en fase 4 puede caracterizarse por pérdida completa del grosor de la piel con destrucción extensiva, necrosis tisular, o daño al músculo, hueso, o estructuras de soporte (por ejemplo, tendones, cápsula articular). En ciertas realizaciones,

se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se caracteriza por una o más de las siguientes fases AHCPR de ulceración por presión: fase 1, fase 2, fase 3, y/o fase 4.

Heridas crónicas ejemplares también pueden incluir "úlceras decubitales". Las úlceras decubitales ejemplares pueden surgir como resultado de presión prolongada y constante sobre una prominencia ósea que condice a isquemia. La herida tiene a aparecer en pacientes que son incapaces de recolocarse por sí mismos para descargar peso, tales como personas paralizadas, inconscientes, o gravemente debilitadas. Como se define por el U.S. Department of Health and Human Services, las medidas preventivas principales incluyen la identificación de pacientes en alto riesgo; evaluación frecuente; y medidas profilácticas tales como reposicionamiento programado, ropa de cama apropiada para aliviar la presión, barreras de humedad, y estado nutricional adecuado. Las opciones de tratamiento pueden incluir, por ejemplo, alivio de la presión, desbridamiento quirúrgico y enzimático, cuidado de las heridas húmedas, y control de la carga bacteriana. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se caracteriza por úlcera o ulceración decubital, que resulta de una presión prolongada y constante sobre una prominencia ósea que conduce a isquemia.

Las heridas crónicas también pueden incluir "úlceras arteriales". Generalmente se entiende que las úlceras arteriales crónicas son ulceraciones que acompañan a enfermedad cardiovascular arteriosclerótica e hipertensiva. Son dolorosas, marcadamente marginadas, y a menudo encontradas en las extremidades inferiores laterales y dedos de los pies. Las úlceras arteriales pueden caracterizarse por el bloqueo arterial completo o parcial, que puede conducir a necrosis y/o ulceración tisular. Los signos de úlcera arterial pueden incluir, por ejemplo, pulsación de la extremidad; ulceración dolorosa; úlceras pequeñas, punteadas que habitualmente están bien delimitadas; piel fresca o fría; tiempo de retorno capilar retardado (empujar brevemente al final del dedo del pie y liberar, el color normal de volver al dedo en aproximadamente 3 segundos o menos); piel de aspecto atrófico (por ejemplo, brillante, delgada, seca); y pérdida de vello digital y pedal. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se por úlceras o ulceraciones arteriales debido al bloqueo arterial completo o parcial.

Heridas crónicas ejemplares pueden incluir "úlceras venosas". Las úlceras venosas ejemplares son el tipo más habitual de úlcera que afecta a las extremidades inferiores y pueden caracterizarse por el mal funcionamiento de la válvula venosa. La vena normal tiene válvulas que evitan el flujo contracorrente de la sangre. Cuando estas válvulas se vuelven incompetentes, el flujo contracorrente de la sangre venosa causa congestión venosa. La hemoglobina de los glóbulos rojos escapa y se filtra en el espacio extravascular, causando la decoloración pardusca habitualmente apreciada. Se ha demostrado que la presión de oxígeno transcutánea de la piel que rodea una úlcera venosa está disminuida, lo que sugiere que hay fuerzas que obstruyen la vascularidad normal del área. El drenaje y el flujo linfático también desempeñan una tarea en estas úlceras. La úlcera venosa puede aparecer cerca del maléolo medial y habitualmente ocurre en combinación con una extremidad inferior edematosa y endurecida; puede ser superficial, no demasiado dolorosa y puede presentarse con una descarga exudante desde el sitio afectado. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se caracteriza por úlceras o ulceraciones venosas debidas al mal funcionamiento de la válvula venosa y la enfermedad vascular asociada. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se caracteriza por úlceras o ulceraciones arteriales debidas al bloqueo arterial completo o parcial.

Heridas crónicas ejemplares pueden incluir "úlceras venosas por estasis". Las úlceras por estasis son lesiones asociadas con insuficiencia venosa que están más habitualmente presentes en el maléolo medial, habitualmente con edema con fovea, varices, pigmentación moteada, eritema, y petequias no palpables y púrpura. La dermatitis y las úlceras por estasis son generalmente pruríticas en lugar de dolorosas. Las úlceras venosas por estasis ejemplares pueden caracterizarse por congestión venosa pasiva crónica de las extremidades inferiores que resulta en hipoxia local. Un posible mecanismo de patogénesis de esas heridas incluye el impedimento de la difusión de oxígeno en el tejido a través de los manguitos de fibrina perivasculares gruesos. Otro mecanismo es que macromoléculas que se filtran en el tejido perivascular atrapan los factores de crecimiento necesarios para el mantenimiento de la integridad de la piel. Además, el flujo de glóbulos blancos grandes se ralentiza debido a la congestión venosa, ocluyendo los capilares, que llegan a activarse, y dañando el endotelio vascular. Para predisponerlo a la formación de úlceras. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se caracteriza por úlceras o ulceraciones venosas debidas al mal funcionamiento de la válvula venosa y la enfermedad vascular asociada. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se caracteriza por úlceras o ulceraciones venosas por estasis debidas a la congestión venosa pasiva crónica de las extremidades inferiores y/o la hipoxia local resultante.

Heridas crónicas ejemplares pueden incluir "úlceras diabéticas". Los pacientes diabéticos son propensos a las ulceraciones, incluyendo ulceraciones en el pie, debido a complicaciones tanto neurológicas como vasculares. La neuropatía periférica puede causar pérdida alterada o completa de la sensación en el pie y/o la pierna. Los pacientes diabéticos con neuropatía avanzada pierden toda capacidad de discriminación de objetos

agudos-romos. Cualquier corte o traumatismo en el pie puede pasar completamente inadvertido durante días o semanas en un paciente con neuropatía. No es raro que un paciente con neuropatía advierta que la úlcera "justo apareció" cuando, de hecho, la úlcera ha estado presente desde hace bastante tiempo. Para pacientes de neuropatía, el estricto control de la glucosa ha demostrado ralentizar el progreso de la enfermedad. También puede aparecer deformidad del pie de Charcot como resultado de la sensación disminuida. La gente con sensaciones "normales" en sus pies tienen la capacidad de sentir automáticamente cuando se está poniendo demasiada presión sobre un área del pie. Una vez identificado, nuestros cuerpos instintivamente cambian de posición para aliviar este estrés. Un paciente con neuropatía avanzada pierde esta capacidad de sentir el agravio por presión sostenida, como resultado, puede aparecer isquemia y necrosis tisular que conducen a, por ejemplo, ulceraciones plantares. Además, las microfracturas en los huesos del pie, sin no se advierten y no se tratan, pueden provocar desfiguración, hinchamiento crónico y prominencias óseas adicionales. La enfermedad microvascular es una de las complicaciones significativas de la diabetes, que también puede conducir a ulceraciones. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se caracteriza por úlceras y/o ulceraciones diabéticas en el pie debidas a complicaciones tanto neurológicas como y vasculares de la diabetes.

Las heridas crónicas ejemplares pueden incluir "úlceras traumáticas". La formación de úlceras traumáticas puede suceder como resultado de lesiones traumáticas en el cuerpo. Estas lesiones incluyen, por ejemplo, compromiso de los sistemas arterial, venoso o linfático; cambios en la arquitectura ósea del esqueleto; pérdida de capas tisulares-epidermis, dermis, tejido blando subcutáneo, músculo o hueso; daño a partes u órganos corporales y pérdida de partes u órganos corporales. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se caracteriza por ulceraciones asociadas con lesiones traumáticas al cuerpo.

Heridas crónicas ejemplares puede incluir "úlceras por quemadura", incluyendo quemadura de primer grado (es decir superficial, área enrojecida de la piel); quemadura de segundo grado (un sitio de lesión con ampolla que puede curarse espontáneamente después de haber eliminado el fluido de la ampolla); quemadura de tercer grado (quemadura a través de la piel completa y habitualmente requiere intervención quirúrgica para la curación de heridas); quemaduras por escaldado (pueden suceder desde escaldado con agua caliente, grasa o fluido de radiador); térmicas (pueden suceder por llamas, habitualmente quemaduras profundas); químicas (pueden provenir de ácidos y álcalis, habitualmente quemaduras profundas); eléctricas (bajo voltaje de una casa o alto voltaje en el trabajo); por el fogonazo de una explosión (habitualmente lesiones superficiales); y por contacto (habitualmente profundas y pueden suceder por tubos de escape silenciadores, planchas calientes y estufas). En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se caracteriza por ulceraciones asociadas con lesiones por quemadura en el cuerpo. Las heridas crónicas ejemplares pueden incluir "úlceras vasculíticas". Las úlceras vasculíticas también aparecen en las extremidades inferiores y son lesiones dolorosas, marcadamente delimitadas, que pueden tener asociadas púrpuras palpables y ampollas hemorrágicas. Las enfermedades del colágeno, septicemias, y una diversidad de trastornos hematológicos (por ejemplo, trombocitopenia, disproteinemia) pueden ser la causa de esta afección grave, aguda. Heridas crónicas ejemplares pueden incluir pioderma gangrenoso. El pioderma gangrenoso aparece como úlceras individuales o múltiples, muy delicadas de las pantorrillas. Un borde indeterminado de rojo oscuro a morado rodea el defecto central purulento. La biopsia típicamente no logra revelar una vasculitis. En la mitad de los pacientes, está asociado con una enfermedad sistémica tal como colitis ulcerosa, ileítis regional, o leucemia. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se caracteriza por ulceraciones asociadas con pioderma gangrenoso. Heridas crónicas ejemplares pueden incluir úlceras infecciosas. Las úlceras infecciosas derivan de la inoculación directa con una diversidad de organismos y pueden estar asociadas con adenopatía regional significativa. La infección por micobacterias, ántrax, difteria, blastomiosis, esporotricosis, tularemia, y fiebre por arañazo de gato son ejemplos. Las úlceras genitales de sífilis primaria son típicamente no delicadas con una base firme, limpia. Aquellas con chancro blando y granuloma inguinal tienden a ser lesiones irregulares, sucias, y más extravagantes. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el cual la herida crónica se caracteriza por ulceraciones asociadas con infección. Como se usa en la presente memoria, la expresión "herida dehisciente" se refiere a una herida, habitualmente una herida quirúrgica, que tiene abertura rota o dividida. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida que no se cura a la velocidad esperada en el cual la herida se caracteriza por dehiscencia.

Los vehículos adecuados que pueden usarse se han descrito previamente. El medicamento que comprende la microvesícula de la invención, también puede comprender otros compuestos usados para la curación de heridas.

Usos relacionados con angiogénesis

Además de su papel en la coagulación sanguínea, el TF desempeña una tarea en la angiogénesis. Esto se descubrió cuando se halló que ratones en los que se había eliminado genéticamente el TF eran incapaces de desarrollarse más allá del día embrionario 9-10 debido al fallo en el desarrollo de los vasos sanguíneos

(Carmeliet, et al., 1996, Nature 383:73-75; Bugge et al., 1996, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93: 6258-6263; Toomey, et al., 1996, Blood 88: 1583-1587). Estudios adicionales han demostrado que la activación de las proteasas de coagulación puede conducir a la activación de los receptores activados por proteasa lo que conduce a una producción aumentada de factores de crecimiento del endotelio vascular que estimulan la angiogénesis (Richard, et al., 2002, Oncogene 20: 1556-1562; Milia, et al., 2002, Circ. Res. 91:346-352). Además, la sobre-expresión de TF en células tumorales promueve el crecimiento tumoral, la vascularización y la metástasis (Mueller, et al., 1992, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89: 11832-11836).

Así, en otro aspecto, la invención está relacionada con el uso de microvesículas de la invención, composiciones de la invención, o composiciones farmacéuticas de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con angiogénesis deficiente.

La angiogénesis es el procedimiento por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos o vasos linfáticos desarrollándose desde vasos pre-existentes. La expresión "enfermedad asociada con angiogénesis deficiente", como se usa en la presente memoria, se refiere a enfermedades que pueden curarse activando la formación de vasos. La expresión "formación de vasos" se refiere a la formación de vasos de cualquier tipo y en cualquier sitio. La promoción de la formación de vasos puede ser útil en varias afecciones clínicas. Por ejemplo, las microvesículas pro-angiogénicas que albergan TF de la invención pueden usarse para promover la angiogénesis de la vasculatura colateral en tejido miocárdico durante o después de enfermedad isquémica, infarto de miocardio o después de cirugía de derivación coronaria. Otras enfermedades o afecciones que pueden tratarse proporcionando las microvesículas que albergan TF de la invención incluyen enfermedad vascular y/o enfermedad isquémica que causa patología del sistema nervioso periférico o central. Dichas afecciones/enfermedades pueden incluir accidentes cerebrovasculares, por ejemplo, causados por oclusiones con coágulo o por rotura de aneurismas, o isquemia general/localizada que causa muerte neuronal o alteración funcional periférica tal como en alteración de las funciones motora o sensorial o en el habla, cardiomiopatía isquémica, o enfermedad arterial periférica, tal como claudicación por isquemia crónica de un miembro (músculo esquelético), dolor en reposo/ulceración isquémica/gangrena. Además, la promoción de la formación de vasos es adecuada para reemplazar vasos sanguíneos alterados, por ejemplo, viejos. Pueden estar presentes, por ejemplo, en el cerebro o el corazón, de modo que puede prevenirse o tratarse una apoplejía o infarto. También pueden adoptarse precauciones contra presbifrenia. Además, se refiere a una formación de vasos para tratar la arteriosclerosis, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, retinopatía diabética y la trombosis venosa profunda de las piernas/ulcus cruris así como la prevención de recaídas.

Un paciente que padece una enfermedad asociada con angiogénesis deficiente puede tratarse con una microvesícula de la invención o con una composición farmacéutica de la invención o combinaciones de las mismas en combinación con una terapia anti-angiogénesis, una terapia anti-cáncer, u otra terapia conocida para tratar la enfermedad o afección.

Como se usa en la presente memoria, "terapia" incluye, aunque sin limitación, un fármaco conocido. Los cánceres que pueden tratarse por los métodos de la presente invención incluyen todos los tumores sólidos y cánceres metastásicos, incluyendo, aunque sin limitación, los seleccionados entre el grupo compuesto por cáncer de vejiga, mama, hígado, hueso, riñón, colon, ovario, próstata, pancreático, pulmonar, cerebral y cutáneo. La invención incluye, aunque sin limitación, el tratamiento del cáncer con una microvesícula de la invención, sola, en combinación con quimioterapia, o en combinación con radioterapia por métodos conocidos en la técnica (véase la patente US 6596712).

Kits de la invención

En otro aspecto, la invención está relacionada con un kit que comprende la microvesícula de la invención así como con el uso de dicha microvesícula para determinar un factor de terapia anticoagulante en una muestra.

Como se usa en la presente memoria, el término "kit" se usa en referencia a una combinación de artículos que facilitan un procedimiento, método, ensayo, análisis o manipulación de una muestra. Estos kits proporcionan los materiales necesarios para realizar los métodos descritos en la presente invención.

La expresión "factor de terapia anticoagulante", como se usa en la presente memoria, se refiere a un parámetro que es útil para decidir si un paciente requiere una terapia anticoagulante. Los factores de terapia anticoagulante incluyen, sin limitación, el tiempo de protrombina (PT), las proporciones normalizadas internacionales (INR), ATF modificado (MATF), ATF corregido (CATF), proporción de protrombina (PR) y velocidad de transformación de fibrinógeno (FTR).

La expresión "tiempo de protrombina", "PT" o equivalentes gramaticales de la misma, como se usa en la presente memoria, significa ensayos para el tiempo de coagulación sanguínea que se pueden utilizar para

controlar el tratamiento de individuos que están en riesgo de excesiva coagulación sanguínea (trombosis). El tiempo de protrombina se refiere al periodo de tiempo calculado desde la adición de factor tisular - calcio a una muestra hasta el punto en que empieza la conversión de fibrinógeno en fibrina. El tiempo de protrombina se determina típicamente poniendo en contacto diferentes diluciones de plasma humano normal (preferentemente diluciones 1:2, 1:4, 1:10, 1:20 y 1:40 en NaCl 0,15 M) para producir muestras que tienen actividad reducida del factor (50, 25, 10, 5 y 2,5%, respectivamente). Las vesículas de la invención se añaden a las muestras y se mide ópticamente el tiempo que tarda en coagular.

La proporción de protrombina (PR), como se usa en la presente memoria, se refiere a otra medición de la coagulación sanguínea que se calcula dividiendo el PT del plasma de un paciente por el PT de una combinación de plasmas de individuos normales.

Los kits y usos de la invención pueden usarse en el laboratorio de coagulación. Variantes de este ensayo tienen varios usos (White, et al., Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice, Coleman, et al., eds., J. B. Lippencott Co., Filadelfia, pág. 1048-1060, 1987). Un uso es evaluar deficiencias en la vía extrínseca de coagulación (factores VII, X, V, y protrombina). Un segundo uso es controlar a pacientes que experimentan terapia anticoagulante oral a largo plazo para trastornos tales como trombosis venosa recurrente y cáncer (Hirsh, J., Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 12:1-11, 1986). Un tercer uso es evaluar la disfunción hepática.

El intervalo terapéutico de la terapia anticoagulante se basa en la evitación de hemorragias y complicaciones trombóticas. Cuando se controla la terapia anticoagulante oral, así como para una diversidad de otras afecciones por el ensayo de PT, es más deseable un alargamiento del tiempo de protrombina en un factor de 2 para terapia a largo plazo (O'Reilly, Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice, Coleman, et al., eds., J. B. Lippencott Co., Filadelfia, pág. 1367-1372, 1987). Este factor de alargamiento se define como la proporción de protrombina (PR) y se calcula dividiendo el PT del plasma de un paciente por el PT de una combinación de plasmas de individuos normales. Una PR mayor indica un reactivo de PT más sensible. Los beneficios de un reactivo más sensible para controlar la terapia de anticoagulación es el uso de dosis inferiores de fármaco anticoagulante. Estas dosis inferiores proporcionarán protección adecuada contra enfermedad tromboembólica minimizando al mismo tiempo las complicaciones hemorrágicas.

El kit puede comprender, además, un envase que permita mantener los reactivos dentro de límites determinados. Los materiales adecuados para preparar dichos envases incluyen vidrio, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), frascos, viales, papel, bolsitas y similares. El kit de la invención puede contener adicionalmente, instrucciones para usar el reactivo o reactivos en el método de la invención. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de soporte electrónico que puede almacenar instrucciones de tal modo que pueda leerlas un sujeto, tal como un medio de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medio óptico (CD-ROM, DVD) y similares. El medio puede contener adicional o alternativamente sitios web de Internet que proporcionan dichas instrucciones.

EJEMPLOS

MÉTODOS

Ensayos de coagulación en plasma

La actividad procoagulante espontánea (no estimulada) en plasma se midió mediante un ensayo de coagulación de dos etapas en un coagulómetro de 4 canales (Start 4, Diagnostica Stago). En resumen, se añadieron 50 µl de plasma pobre en plaquetas a cubetas ya templadas y 50 µl de la muestra (TF, o agua destilada como control). Esta mezcla se dejó incubar durante 60 segundos a 37°C y se añadieron inmediatamente 50 µl de cloruro cálcico 25 mM y se determinó el tiempo de coagulación en segundos en el coagulómetro, verificado por la formación del coágulo. Los plasmas pobres en plaquetas se obtuvieron por centrifugación y la cantidad de plaquetas se determinó por Coulter.

Se investigó el efecto procoagulante de TF sobre plasmas deficientes en factores de coagulación (FVIII, FIX o FXI) correspondientes a hemofilia A, B o C, respectivamente, usando plasmas comerciales (Dade Behring Marburg GmbH) empobrecidos mediante técnicas de inmunoafinidad. En cada caso, el contenido final de dichos factores de coagulación fue menor del 1%.

Se investigó el efecto procoagulante en un estado tipo trombocitopénico en plasma empobrecido de plaquetas con un procedimiento de centrifugación secuencial.

Ensayos de coagulación en sangre completa.

La actividad procoagulante en sangre completa no anticoagulada se determinó mediante un método de coagulación. Se añadieron los diferentes agentes (mTF) a estudiar en 0,2 ml de volumen final a 0,8 ml de sangre completa no anticoagulada y se midió el tiempo de coagulación con un cronómetro desde el inicio de la extracción hasta que apareció un coágulo sanguíneo estable y consolidado. El efecto de los diferentes agentes se evaluó mediante su acortamiento o alargamiento de los tiempos de coagulación sanguínea.

Las muestras de sangre completa se obtuvieron de pacientes o voluntarios sanos.

EJEMPLO 1

10

Producción de un producto pro-coagulante basado en la expresión de la proteína TF de longitud completa modificada con marca his en levaduras (TT-173).

Se usó el vector episómico de levaduras descrito en el documento WO2008080989 y que comprendía el gen URA3, el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación 2 μ de levadura, el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y la señal de terminación de la transcripción de levadura de la fosfoglicerato quinasa para clonar bajo el control del promotor GPD un ADNc que codifica la proteína hTF madura (aa 33-295 de la SEC ID N° 1) con 18 nucleótidos extra (que codifican seis histidinas) en el extremo 3' y una mutación Asn124Ala que inactiva uno de los potenciales sitios de N-glicosilación en la secuencia nativa de hTF (SEC ID N° 6).

20

Después de la transformación de la cepa de levadura T73 ura3-, se recogieron las cepas capaces de crecer en medio sin uracilo y se ensayaron para su capacidad de expresar hTF por análisis de transferencia de Western de los extractos de levadura esencialmente como se describe en el documento WO2008080989.

25

Para evaluar la posibilidad de aumentar a escala a nivel pre-industrial la producción de extractos de levadura, se realizaron fermentaciones en un biorreactor de 2 litros (Biostat B-2 I. BRAUN) cultivando las células a 30°C a una velocidad de agitación de 250-300 rpm, a pH de 4,5 y un flujo de aire de 6 l/m. El medio de cultivo fue CSM-URA: 0,78 g/l; YNB: 6,7 g/l; sacarosa: 20 g/l. La fermentación se detuvo cuando el cultivo alcanzó una DO de 8,0.

30

El producto resultante de la fermentación se recogió por centrifugación a 3.000 rpm (1.200xg) durante 10 min. y se resuspendió en 200 ml de tampón de lisis (tampón fosfato 20 mM (pH 7,4), NaCl 50 mM). Las levaduras se homogeneizaron por alta presión (1.000 bar (108 Pa)) (homogeneizador NIRO SOAVIS. Panda 2K), y el homogeneizado se centrifugó a 13.000 rpm (13.000xg) durante 30 min. a 4°C. El sedimento se desechó, y se recogió el sobrenadante conocido como extracto de levadura aclarado (CYE).

35

Este CYE que contenía rTF se fraccionó por etapas sucesivas de filtración en flujo tangencial en un sistema de filtración de flujo transversal (Sartorius sartoflow Slice 200 Benchtop) usando filtros con una reducción gradual en el tamaño de poro (membranas de 0,45 μ m, 0,2 μ m y 0,1 μ m (Sartorius, polisulfona).

40

La actividad pro-coagulante de los diferentes retenidos y permeados obtenidos de cuatro CYE independientes después de las etapas sucesivas de filtración se representa en la Tabla 1. La presencia de TF en cada una de las cuatro fracciones MFR 0,1 se muestra en la figura 1.

	Actividad segundos
CYE	23,5
MFR 0,45	23,6
MFP 0,45	24,0
MFR 0,2	24,3
MFP 0,2	24,9
MFR 0,1	18,1
MFP 0,1	>300

Tabla 1. Actividad procoagulante promedio de retenidos de microfiltrado (MFR), y permeados de microfiltrado (MFP) de cuatro CYE independientes después de filtración en flujo tangencial. El procedimiento del ensayo de coagulación se define en Métodos.

45

De este modo, se obtuvo una preparación de vesículas purificada de levadura (a partir de ahora en la presente memoria mencionada como TT-173) que tiene propiedades procoagulantes determinadas usando diferentes ensayos in vitro e in vivo esencialmente como se describe en el documento WO2008080989. Este resultado indica que el uso de los procedimientos de filtración en flujo tangencial usados para purificar el producto

TT-173 permite la recuperación de hTF biológicamente activo que está asociado a microvesículas de membrana derivadas de levadura.

EJEMPLO 2

5

Potenciación de la bioactividad de TT-173 por la adición de PS.

2.1 Efecto de fosfatidilserina (PS) sobre la bioactividad de TT-173

10 Se añadió PS (0,1 mM) a TT-173 y la mezcla se incubó durante hasta 4 h. En diferentes momentos puntuales, partiendo del momento en que se añadió PS (tiempo 0), se comprobó una alícuota de la mezcla TT-173/PS para la actividad de coagulación en un ensayo coagulométrico convencional.

Los resultados, presentados en la figura 2, muestran claramente que la adición de PS reduce el tiempo de coagulación en aproximadamente 10 s (Panel A), que corresponde a un incremento en la actividad
15 específica de seis veces (panel B), y que esta amplificación es dependiente del tiempo, alcanzando un máximo de 1 a 2 h después de la adición de PS.

El efecto insignificante de PS por sí mismo en el tiempo de coagulación (no mostrado), y el aumento en el efecto reforzante observado durante la primera hora después de su adición a TT-173, sugirió que sucedía
20 alguna interacción entre TT-173 y PS, y que esta interacción era importante para acelerar el tiempo de coagulación.

Este efecto fue específico para fosfolípidos cargados negativamente ya que la adición de fosfolípidos no cargados o cargados positivamente a concentraciones similares (0,1 mM) no induce un incremento detectable en la actividad de coagulación de TT-173. En particular, ninguna de fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE),
25 esfingomielina (SM), o fosfatidilcolina (PC) indujeron un incremento detectable en la actividad de coagulación.

Entonces se ensayó si la interacción PS/TT-173 estaba restringida a estructuras derivadas de levadura o si podía recrearse en vesículas preparadas artificialmente. Para ensayar esto, se añadió PS a diferentes concentraciones (que variaban de 0,05 a 1 mM) a alícuotas con actividad de coagulación equivalente de TT-173 o
30 rTF relipidado in vitro. Después de incubación de la mezcla durante 2 h a TA, se ensayaron muestras de ambos productos que contenían rTF para su actividad de coagulación. Los resultados se muestran en la figura 3. Como se ha observado anteriormente, la adición de PS a TT-173 aumenta claramente la actividad en aproximadamente seis veces. Este efecto se observó en el intervalo de concentración de 0,05 a 0,5 mM de PS. A concentraciones mayores (1 mM) PS producía un claro efecto inhibitorio de la coagulación. Sorprendentemente, la adición de PS a rTF
35 relipidado no provocó un aumento apreciable en la actividad procoagulante, a ninguna de las concentraciones usadas de PS. De nuevo, la concentración mayor de PS ensayada (1 mM) produjo un claro efecto inhibitorio. Este efecto inhibitorio por la concentración mayor de PS en muestras de TT-173 o rTF relipidado, podía explicarse si las vesículas de PS a altas concentraciones interaccionan con factores de coagulación solubles, secuestrándolos, y por tanto limitando su interacción con las vesículas que contienen rTF.

40

Esto se confirmó adicionalmente ensayando el efecto sobre la actividad de coagulación como resultado de añadir concentraciones crecientes de PS a micelas que contienen rTF ya pre-existentes que tienen diferentes proporciones de PC a PS. La concentración óptima de fosfolípidos para restaurar la actividad completa de rTF está bien establecida, y corresponde a proporciones de fosfatidilcolina (PC) a fosfatidilserina (PS) de 80:20 a
45 70:30. La figura 4 (barras negras), muestra un experimento de coagulación típico en el que el rTF se relipidó con PC solo (concentración de PC:PS de 100:0), o con proporciones de concentración crecientes de PS con relación a PC (concentraciones de PC:PS de 95:5, 90:10 y 80:20 respectivamente). El resultado muestra claramente que la adición de cantidades crecientes de PS produce tiempos de coagulación disminuidos. Sin embargo, cuando se añadió PS extra a micelas pre-existentes, a cualquiera de las proporciones PC:PS ensayadas, no ejerció ningún incremento en
50 la actividad de coagulación (figura 4, barras grises).

Para proporcionar evidencias adicionales de que el efecto observado está restringido a estructuras derivadas de eucariotas, y no podía recrearse en vesículas preparadas artificialmente por relipidación, se añadió PS a la concentración 0,1 mM a alícuotas con actividad de coagulación equivalente de vesículas TT-173 producidas en
55 células de levadura o rTF relipidado in vitro a proporciones PC:PS de 80:20 y 70:30. Después de incubación de las diferentes vesículas con PS durante 2 h a TA, se ensayaron las muestras de diferentes productos que contenían rTF para su actividad de coagulación. Los resultados se muestran en la figura 5. Como se observa, la adición de PS a TT-173 de origen de levadura, redujo claramente el tiempo de coagulación, mientras que como se esperaba, la adición de PS a rTF relipidado no provocó un aumento apreciable en la actividad procoagulante, a ninguna de las
60 proporciones PC:PS usadas para la relipidación.

Para ensayar si la adición de PS era eficaz solamente cuando estaba asociada a vesículas derivadas de levadura, se hizo un experimento usando rTF relipidado y vesículas TT-100 (microvesículas obtenidas de

levadura recombinante transformada con el plásmido sin la secuencia de la proteína TF), obtenidas de levadura no recombinante después del mismo procedimiento de producción que TT-173. Se mezclaron alícuotas de rTF relipidado con diferentes concentraciones de vesículas TT-100 que se incubaron previamente con PS (0,1 mM) durante 2 h. Después de 30 min. se determinó la actividad de coagulación de cada alícuota. Los resultados (figura 6) muestran claramente que independientemente de la cantidad de TT-100 usada, la mezcla TT-100/PS no tiene un efecto detectable sobre el rTF relipidado.

Este resultado demuestra que el efecto de PS sobre la actividad de coagulación es dependiente de su asociación con vesículas derivadas de levadura, y que estas vesículas deben contener rTF.

10

En vista de los resultados anteriores, el efecto reforzante de la coagulación inducido por PS en TT-173 (véanse las figuras 2, 3 y 5) podría explicarse si: i) PS facilita la interacción entre rTF y FVII, induciendo una estructura más adecuada para la interacción; ii) PS añadida induce efectos estructurales en las vesículas generando áreas enriquecidas en PS, como en plaquetas activadas, más adecuadas para la formación de complejo de protrombinasa; o iii) una combinación de ambos efectos.

15

Para ensayar el posible efecto de PS sobre la interacción rTF:FVII, se usó un ensayo amidolítico convencional definido para cuantificar la actividad enzimática de complejo TF:FVII. Para este experimento, se incubaron tres concentraciones de TT-173 con o sin PS añadida con dos concentraciones diferentes de FVIIa comercial purificado. Después de la adición de FVIIa a TT-173, se detectó la actividad TF/FVIIa por la capacidad del complejo de transformar enzimáticamente el sustrato cromogénico específico S-2288. Como se muestra en la Fig. 5, no hubo diferencias apreciables en la actividad amidolítica entre TT-173 con o sin PS a las tres concentraciones de TT-173 ensayadas, y a ambas concentraciones de FVIIa usadas, 50 nM (no mostrado) o 500 nM (figura 7). Estos resultados demuestran claramente que la adición de PS a TT-173 no ejerce un efecto significativo sobre la interacción rTF-FVII inicial.

25

Sin embargo, cuando se ensayaron las mismas muestras de TT-173 para la actividad procoagulante en plasma normal (figura 8, panel A) o sangre completa normal (figura 8, panel B) se observó un incremento altamente significativo en la actividad de coagulación cuando PS se asociaba a TT-173.

30

Por lo tanto, el efecto estimulador de PS sobre la actividad de TT-173 debe ser atribuible a un efecto sobre la cascada de coagulación corriente debajo de la interacción TF:FVII inicial. Nuestra interpretación es que PS modifica la superficie de la vesícula TT-173, proporcionando una estructura dependiente de PS similar a la observada en plaquetas activadas.

35

2.2. Mecanismos de acción de TT-173 y TT-173 PS

Durante la hemostasis normal, el tiempo necesario para alcanzar la fase de activación (tiempo necesario para alcanzar la concentración de trombina requerida para activar FV, FVIII y las plaquetas) es 4 minutos, aproximadamente. Este es el tiempo requerido para permitir la interacción entre moléculas TF y FVII, ambas presentes en una concentración relativamente baja en plasma o en la membrana de células dañadas. La colisión molecular y la interacción resultante entre TF y FVII conducen a la transformación de FX en FXa que, a su vez, produce trombina.

40

Por lo tanto, aumentando la concentración de TF incorporada en una membrana adecuada, tal como añadiendo TT-173 a plasma o sangre, se aumentará la oportunidad de que tengan lugar interacciones entre TF y FVII. Esto provoca una producción mucho más rápida y elevada de FXa, y por tanto una producción más rápida de la cantidad de trombina requerida para la activación de plaquetas, FVIII y FV.

45

En TT-173, el TF se inserta en un compartimiento membranoso que también alberga parches concretos de PS. Así, la adición de TT-173 a plasma o sangre proporciona no solamente el iniciador de la cascada de coagulación a una concentración mayor, sino también una superficie adecuada que proporciona la estructura fisiológica apropiada que contiene PS para la formación de complejos activos de protrombinasa. La figura 9 resume el mecanismo propuesto de acción de TT-173.

50

Durante la coagulación sanguínea normal, la activación de la coagulación tarda aproximadamente cuatro minutos. Esto es una consecuencia de la concentración relativamente baja de proteína TF en los tejidos dañados adyacentes a vasos sanguíneos, y la cantidad escasa de FVIIa en circulación en el torrente sanguíneo.

Este modelo, en el que está aumentada la producción de FXa, explica la reducción drástica en el tiempo de coagulación observada cuando se añade TT-173 con o sin PS a plasma normal (figura 10, izquierda). Además, a través de la formación de complejos de protrombinasa, el modelo explica los tiempos normales de coagulación observados cuando FVIII o FIX (deficiencias en Hemofilia A y B) están ausentes o en concentraciones muy bajas (figura 10, derecha). En el caso de deficiencias en los factores de coagulación, la adición de PS a TT-173

60

disminuye claramente el tiempo de coagulación. Este efecto es más evidente en plasmas en los que la concentración de FVII o FV es menor del 1% (figura 11).

Como el modelo predice, el tiempo de coagulación de plasma con deficiencias adquiridas en FVII y FX, como los efectos del tratamiento con warfarina, también se normaliza por la adición de TT-173 (figura 10).

2.3. Papel de las membranas de levadura en la actividad de TT-173

Los componentes de las vesículas de levadura mostraron una limitada actividad procoagulante por sí mismos, pero todos ellos deben ser esenciales para mantener la integridad de las micropartículas. Cuando se descomponían vesículas TT-173 con y sin PS añadida por tratamiento con un detergente dializable, y después se reconstituían in vitro por diálisis, se perdía aproximadamente el 50% de la actividad inicial (figura 13, panel A). Sin embargo, cuando se hizo un experimento similar usando vesículas de rTF relipidado, no se observó diferencia apreciable antes y después de la diálisis (figura 13, panel B).

Este resultado indica que la actividad de coagulación reside no solamente en las cantidades relativas de rTF, proteínas de levadura y lípidos de levadura, sino también en la disposición/orientación espacial de todos estos componentes. Cuando se produjeron vesículas espontáneamente in vitro, todos los componentes de membrana de TT-173 se incorporaron aleatoriamente en membranas recién formadas, y no adquirieron la conformación compleja que puede adquirirse solamente en el contexto que puede proporcionar una célula viva eucariota.

EJEMPLO 3

25 Producción de un producto pro-coagulante basado en la expresión de la proteína TF de longitud completa en células de insecto

3.1 Construcción de baculovirus recombinantes

La construcción de baculovirus recombinantes (rBV) que expresan la longitud completa del factor tisular (TF) humano maduro se realizó del siguiente modo:

Se amplificó el ADNc que codifica la proteína TF humana madura (aa 33-295) como un fragmento de 816 pb por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esta reacción de PCR, se usó el plásmido pTT-103, que contiene el gen que codifica TF, como molde, y se usaron los oligonucleótidos A

5'- CCGCTCGAGCGGTTATGAAACATTCAGTGGGGAGTTCTC-3' (SEC ID N° 7) y B

5'-CCGCTCGAGCGGTTATTCTCTGAATTCCTTTCTC-3' (SEC ID N° 8), que hibridan respectivamente en el extremo 5' o 3' del gen de TF, como cebadores. El fragmento de ADN obtenido se digirió con NcoI y HindIII y se insertó en el vector de transferencia de baculovirus pFastBac1-mAV-MCS digerido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido resultante, pFB-TF, se sometió a secuenciación de nucleótidos para evaluar la precisión de la secuencia TF insertada, y después se usó para producir el rBV correspondiente usando el sistema Bac-to-Bac y siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Para la producción y purificación de vesículas que contienen TF activo, se infectaron células high five de insecto con rBV que expresaba TF a una multiplicidad de 5 PFU/célula. Las células se recogieron a las 72 h después de la infección, se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato, se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM). Después de ello, se alteraron los extractos celulares con la ayuda de un homogeneizador dounce. Se ensayaron las alícuotas de los extractos celulares para la actividad de coagulación siguiendo el protocolo descrito previamente en el ejemplo 2. La Tabla 2 muestra la actividad de coagulación provocada por los extractos.

50

	Tiempo de coagulación		Proteína TF (ng/ml)
	(segundos)		
Control	>300	>300	0
rTF	>300	>300	30
rTF lipidado	60,8	60,8	30
TT-172	55.9	55.3	30

Tabla 2: Tiempo de coagulación y concentración de proteína TF de vesículas de control, TF recombinante, TF lipidado in Vitro y TT-172 (microvesículas derivadas de células de insecto que portan wt-TF).

3.2. Efecto de la fosfatidilserina (PS) sobre la bioactividad de las microvesículas derivadas de células de insecto TT-173 que portan wt-TF

Para proporcionar evidencias adicionales de que el efecto observado y reivindicado en esta patente se restringe a estructuras derivadas de eucariotas, y que no podía recrearse en vesículas preparadas artificialmente por relipidación, se añadió PS a una concentración 0,1 mM a alícuotas con actividad de coagulación equivalente de vesículas TT-173 producidas en células de levadura, vesículas TT-172 producidas en células de insecto o rTF relipidado in vitro a proporciones PC:PS de 80:20 y 70:30. Después de incubación de las diferentes vesículas con PS durante 2 h a TA, se ensayaron muestras de los diferentes productos que contenían rTF para su actividad de coagulación. Los resultados se muestran en la figura 14. Como se observa, la adición de PS a TT-170 de origen en células de insecto provocó una disminución en el tiempo de coagulación similar al obtenido con células de levadura, claramente redujo el tiempo de coagulación. Sin embargo, como se esperaba, la adición de PS a rTF relipidado no provocó un aumento apreciable en la actividad procoagulante, a ninguna de las proporciones PC:PS usadas para la relipidación.

EJEMPLO 4

Otro efecto inesperado de la adición de PS fue su incidencia sobre la estabilidad de vesículas TT-173. Para ensayar este efecto, alícuotas de tres lotes independientes de TT-173 incubados o no con PS como se describe en el ejemplo 2 se mantuvieron a dos temperaturas diferentes (4°C y 20°C) durante un periodo prolongado de tiempo. En diferentes momentos puntuales, se analizó una alícuota de cada muestra para la actividad de coagulación. El resultado de este experimento se muestra en la figura 15. Como se mostrado anteriormente, la adición de PS sobre muestras TT-173 acelera el tiempo de coagulación hasta 10 segundo a tiempo 0, e inesperadamente, la estabilidad de las muestras que contenían PS se prolongó en comparación con muestras sin PS. Este efecto de estabilidad fue especialmente evidente a 20°C, aunque las muestras TT-173 sin PS extra perdieron más del 50% de la actividad después de 5 h, las muestras en que se añadió PS permanecieron estables durante al menos 4 días.

La media de la estabilidad mínima de diferentes lotes de TF-173 con o sin PS añadida se determinó entonces a 20°C y 4°C.

Lote	Estabilidad a 20°C (horas)	
	TT-173	TT-173 + PS (0,1 mM)
TT-173 612-615	1	96
TT-173 644-647	1	48
TT-173 660-663	1	24
TT-173 702-705	1	48
Media de la estabilidad mínima	1	54

Lote	Estabilidad a 4°C (horas)	
	TT-173	TT-173 + PS (0,1 mM)
TT-173 612-615	<1	25
TT-173 628-631	4	<57
TT-173 644-647	<1	<28
TT-173 660-663	<1	20
TT-173 702-705	<1	>11
Media de la estabilidad mínima	1,6	28,2

La media de la estabilidad mínima se muestra en la figura 15 (paneles C y D).

EJEMPLO 5

Potenciación del efecto pro-coagulante de TT-173 por agentes pro-coagulantes.

Se añadieron diferentes concentraciones de FVII (20 nM y 60 nM), FVIIa (20 nM y 60 nM), FX (1000 nM y 3000 nM) y FXa (1000 nM) a TT-173. En diferentes momentos puntuales, partiendo del momento en que se añadió PS (tiempo 0), se comprobaron alícuotas de las mezclas TT-173/FVII y TT-173/FX para la actividad de coagulación en un ensayo coagulométrico convencional. Los resultados, presentados en la figura 16, muestran

claramente que la adición de FVII, FVIIa y FX reduce el tiempo de coagulación en aproximadamente 2 s y que la adición de FXa reduce el tiempo de coagulación en aproximadamente 7 s.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Thrombotargets S.L.

<120> VESÍCULAS ENRIQUECIDAS CON FOSFOLÍPIDOS QUE ALBERGAN FACTOR TISULAR QUE TIENEN
10 ACTIVIDADES HEMOSTÁTICAS Y USOS DE LAS MISMAS

<130> P5250PC00

<150> EP10382085

15 <151> 2010-04-19

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5
20

<210> 1

<211> 263

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 1

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
1 5 10 15

30

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
20 25 30

35

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
35 40 45

40 Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
50 55 60

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
45 65 70 75 80

Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
85 90 95

50

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
100 105 110

55

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
115 120 125

60 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
130 135 140

ES 2 553 228 T3

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
145 150 155 160

5 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
165 170 175

10 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
180 185 190

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
195 200 205
15

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile
210 215 220

20 Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile
225 230 235 240

25 Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu
245 250 255

30 Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser
260

<210> 2

<211> 6

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo AHGHRP

40

<400> 2

Ala His Gly His Arg Pro

1 5

45

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

<223> Epítopo PIHDHDHPLVIHS

55 <400> 3

Pro Ile His Asp His Asp His Pro His Leu Val Ile His Ser

1 5 10

60

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Epítipo GMTCXXC
 5
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (5)..(6)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <400> 4
 Gly Met Thr Cys Xaa Xaa Cys
 15 1 5
 <210> 5
 <211> 269
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> TF Maduro humano con la mutación N124A y tag de hexahistidina C terminal
 25
 <400> 5
 Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
 1 5 10 15
 30
 Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
 20 25 30
 35
 Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
 35 40 45
 40 Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
 50 55 60
 Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
 45 65 70 75 80
 Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
 85 90 95
 50
 Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
 100 105 110
 55
 Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Ala Val Thr Val Glu
 115 120 125
 60 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 130 135 140

ES 2 553 228 T3

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
145 150 155 160

5 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
165 170 175

10 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
180 185 190

15 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
195 200 205

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile
210 215 220

20 Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile
225 230 235 240

25 Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu
245 250 255

30 Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser His His His His His His
260 265

<210> 6

<211> 813

35 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA que codifica para factor tisular humano con N124A y tag de hexahistidina en C-terminal

40

<400> 6

atgtcaggca ctacaaatac tgtggcagca tataatttaa ctggaaatc aactaatttc 60

aagacaattt tggagtggga acccaaacc gtcaatcaag tctactgt tcaaataagc 120

45

actaagtcag gagattgaa aagcaaatgc ttacacaa cagacacaga gtgtgacctc 180

accgacgaga ttgtgaagga tgtgaagcag acgtactgg cacgggtct ctctacccg 240

50 gcagggaatg tggagagcac cgttctgct ggggagcctc tgtatgagaa ctcccagag 300

ttcacacctt acctggagac aaacctgga cagccaacaa ttcagagttt tgaacagggtg 360

ggaacaaaag tggcagtgc cgtagaagat gaacggactt tagtcagaag gaacaacact 420

55

ttcctaagcc tccgggatgt tttggcaag gacttaatt atacttta ttattgaaa 480

tctcaagtt caggaaagaa aacagccaaa acaaacacta atgagtttt gattgatgtg 540

60 gataaaggag aaaactactg ttccagtgt caagcagtga ttccctccg aacagttaac 600

cgaagagta cagacagccc ggtagagtgt atgggccagg agaaaggga attcagagaa 660

ES 2 553 228 T3

atattctaca tcattggagc tgttgtattt gtggatca tcctgtcat catcctggct 720

atatctctac acaagtgtag aaaggcagga gtggggcaga gctggaagga gaactcccca 780

5 ctgaatgttt cacatcacca tcaccatcac tag 813

<210> 7

<211> 39

10 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido A

15

<400> 7

ccgctcgagc ggttatgaaa cattcagtg ggagttctc 39

20 <210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

25 <220>

<223> Oligonucleótido B

<400> 8

ccgctcgagc ggttatctc tgaattcccc ttctc 36

30

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de una microvesícula que alberga factor tisular que tiene actividad pro-coagulante que comprende
 - (i) expresar factor tisular o una variante del mismo que tiene actividad pro-coagulante en una célula eucariota,
 - (ii) recuperar microvesículas que albergan factor tisular de las células de la etapa (i) y
 - (iii) poner en contacto las vesículas obtenidas en la etapa (ii) con un fosfolípido cargado negativamente en ausencia de detergentes en condiciones adecuadas para la incorporación de dicho fosfolípido en dichas vesículas, donde dichas microvesículas están formadas por membranas lipídicas, o fragmentos de las mismas, de dicha célula eucariota.
2. Método según la reivindicación 1, en el cual la célula eucariota es una célula de levadura.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el cual la etapa de contacto se realiza usando 0,05 μmol de fosfolípidos cargados negativamente donde el contenido de proteína de las microvesículas es inferior a 50 μg y 0,1 μmol de fosfolípidos cargados negativamente donde el contenido de proteína de las microvesículas es mayor de 50 μg .
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual el fosfolípido cargado negativamente se selecciona entre el grupo de un fosfolípido que contiene esfingosina o fosfolípido que contiene glicerol.
5. Método según la reivindicación 6, en el cual el fosfolípido que contiene glicerol es fosfatidilserina.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual dicho factor tisular o la variante del mismo que tiene actividad pro-coagulante está glicosilado.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el factor tisular es una proteína factor tisular madura, preferentemente, proteína factor tisular madura humana.
8. Método según la reivindicación 7, en el cual el factor tisular o la variante del mismo que tiene actividad procoagulante porta la mutación N124A y/o porta una marca de hexahistidina en el extremo C-terminal.
9. Una microvesícula que alberga factor tisular obtenida usando el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Una composición farmacéutica que comprende una microvesícula que alberga factor tisular según la reivindicación 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10, que comprende adicionalmente al menos un agente que promueve el proceso por el cual la sangre forma coágulos.
12. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en la cual la composición está liofilizada.
13. Una microvesícula que alberga factor tisular según se define en la reivindicación 9 o una composición farmacéutica según se define en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11 para su uso como medicamento.
14. Una microvesícula que alberga factor tisular según se define en la reivindicación 9 o una composición farmacéutica según se define en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11 para su uso en el tratamiento de una hemorragia, para promover la curación de heridas o para el tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis.
15. Una microvesícula que alberga factor tisular según se define en la reivindicación 9 o una composición según se define en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, para su uso en el tratamiento de una hemorragia, en la cual la hemorragia se trata en un sujeto seleccionado entre el grupo de un sujeto sano y un sujeto con una diátesis hemorrágica, donde dicha diátesis hemorrágica se selecciona entre el grupo de una coagulopatía, un trastorno plaquetario y una combinación de los mismos.

16. Una microvesícula que alberga factor tisular según se define en la reivindicación 9 o una composición farmacéutica según se define en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, en la cual la microvesícula que alberga factor tisular o la composición farmacéutica se administra de forma tópica.

17. Uso de una microvesícula que alberga factor tisular según se define en la reivindicación 9 para la determinación del tiempo de protrombina en una muestra.

10 18. Un kit para la determinación del tiempo de protrombina que comprende una microvesícula según se define en la reivindicación 9.

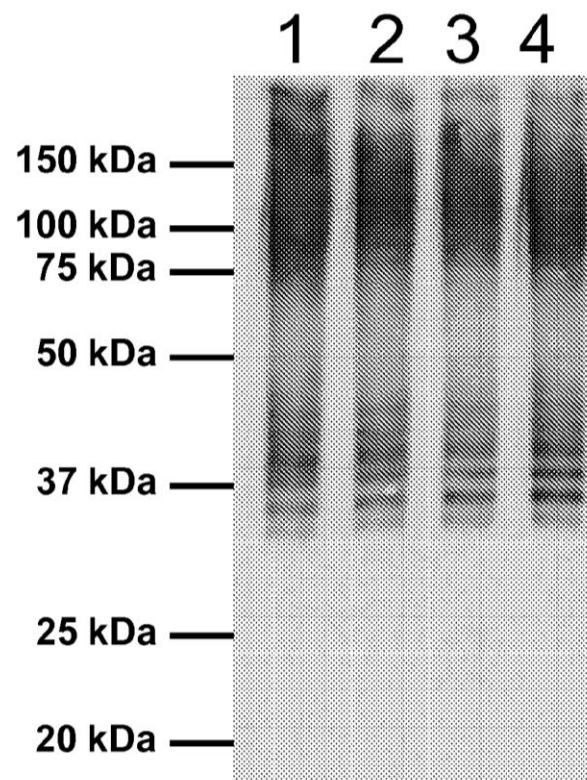


FIG. 1

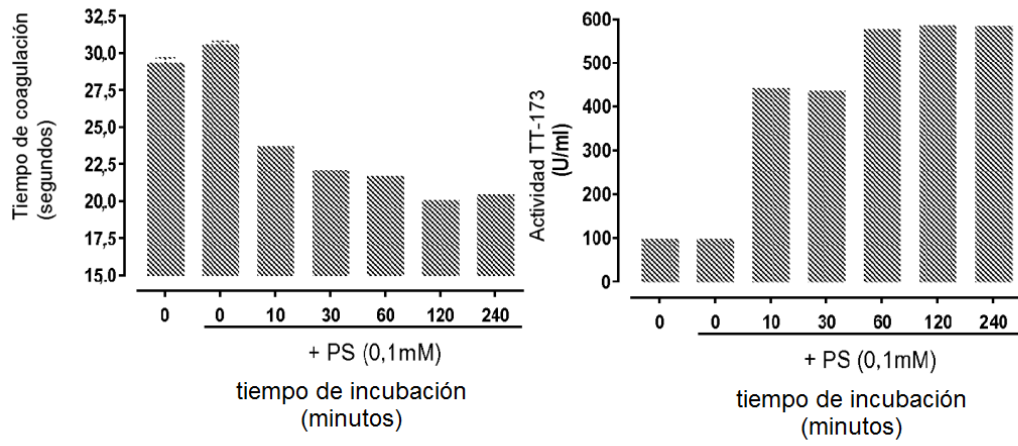


FIG. 2

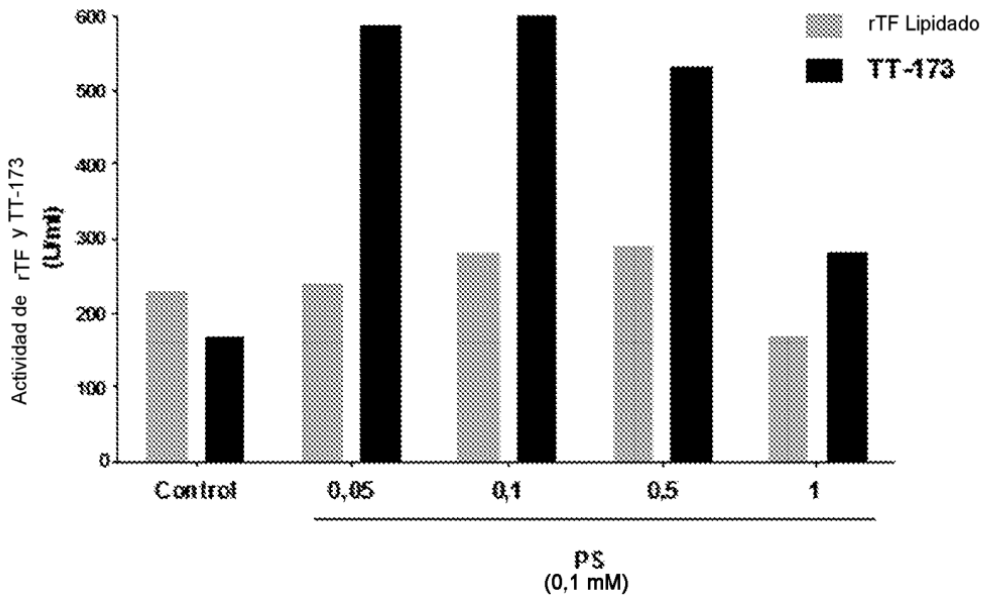


FIG. 3

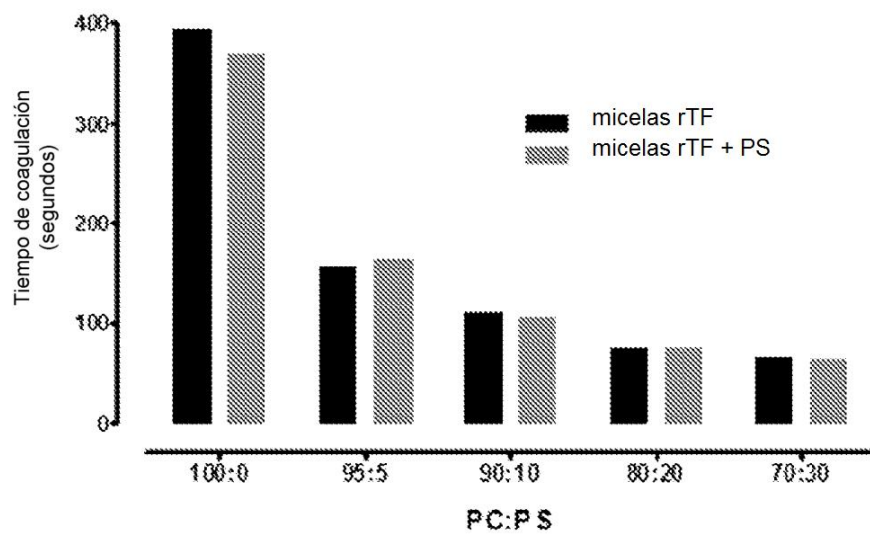


FIG. 4

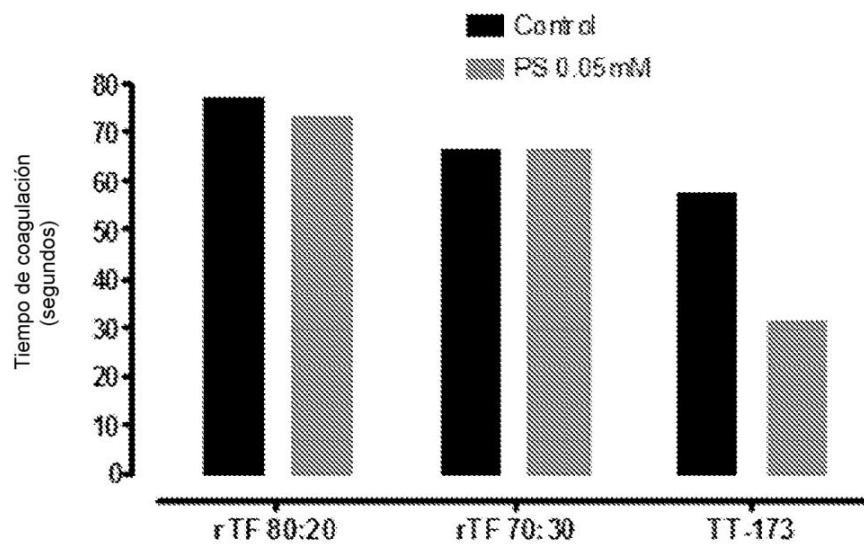


FIG. 5

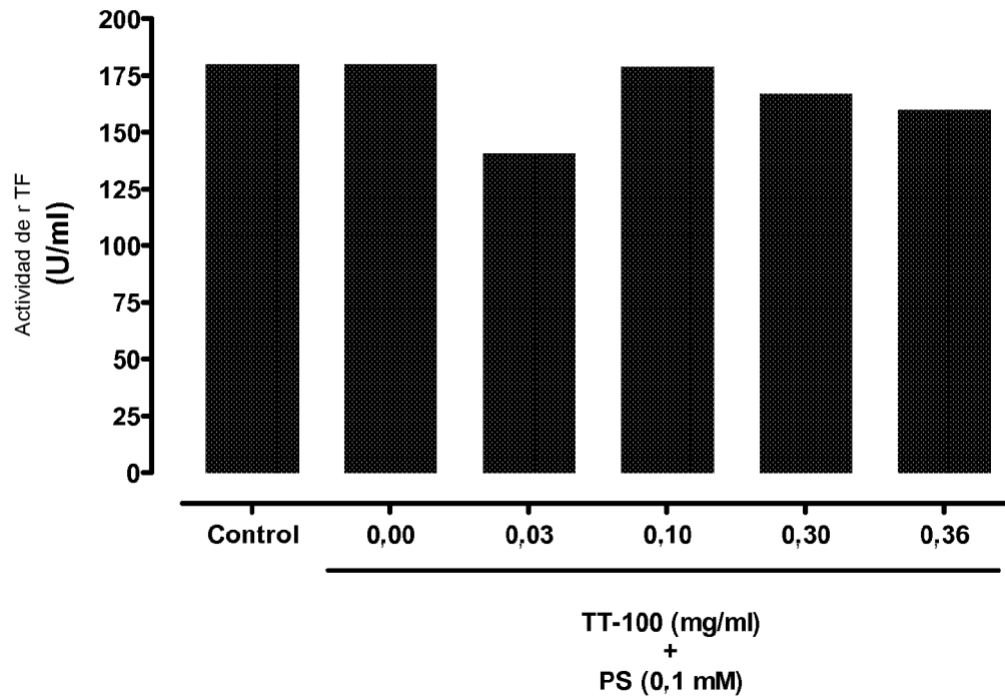


FIG. 6

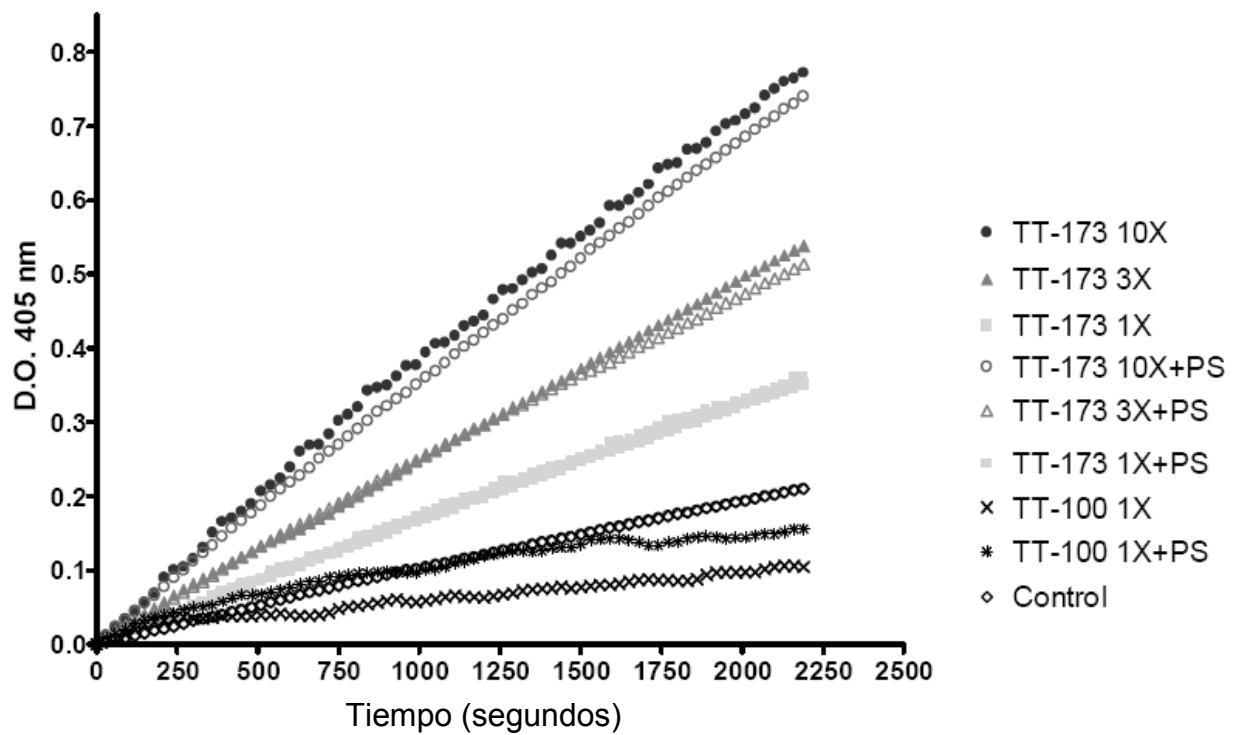
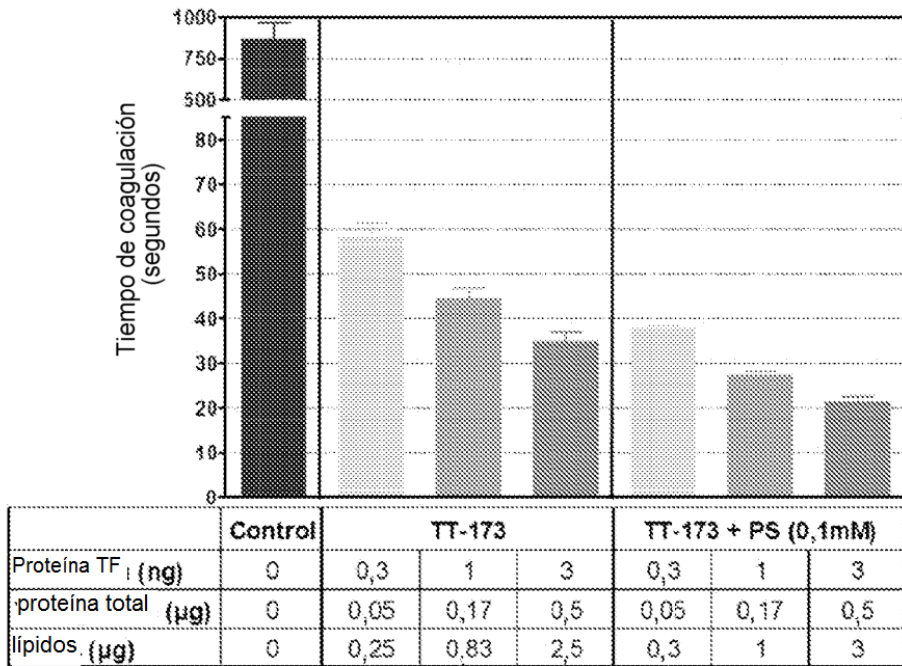


FIG. 7

A

Plasma sano



B

Sangre completa

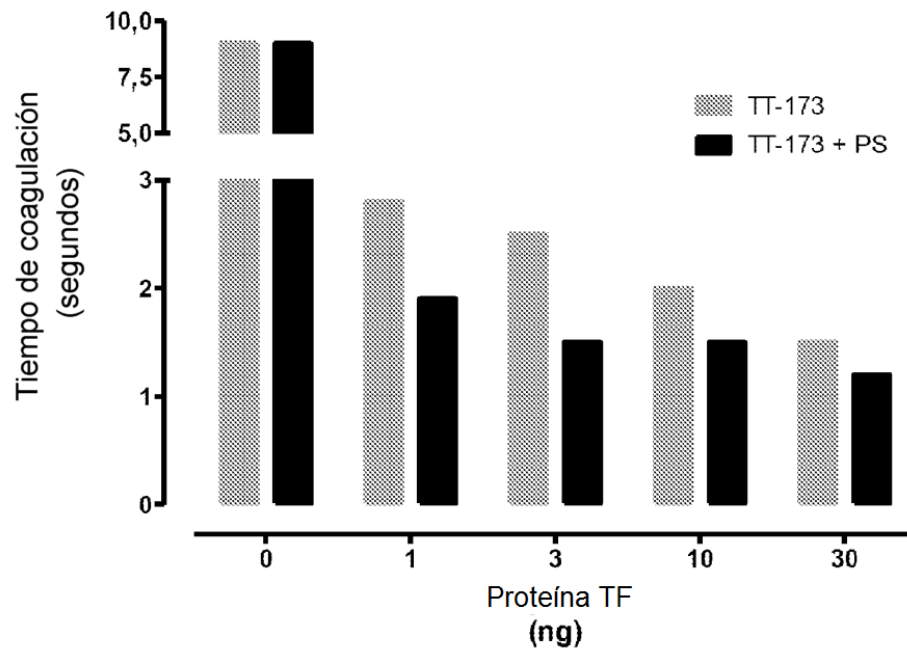


FIG. 8

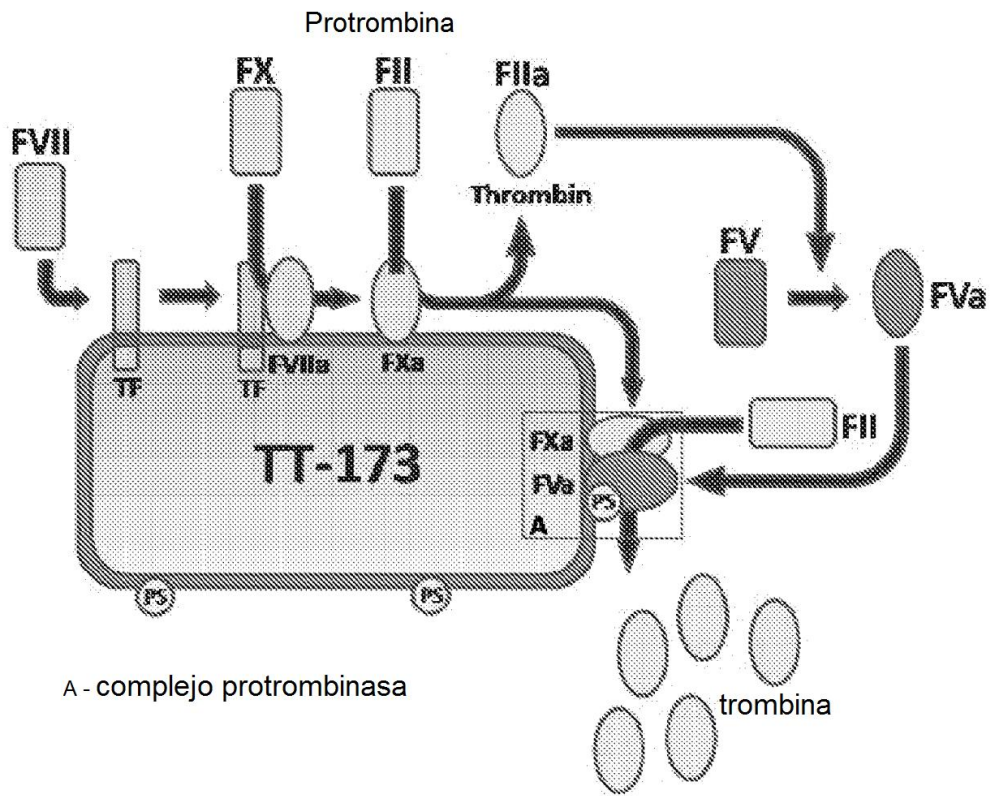
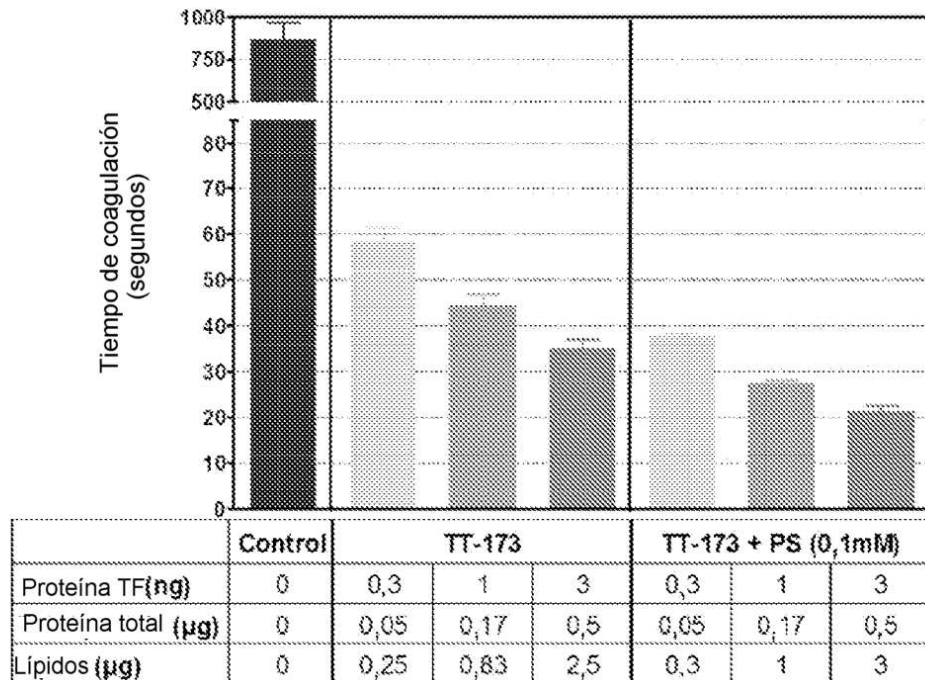


FIG. 9

Plasma sano



Plasma hemofílico

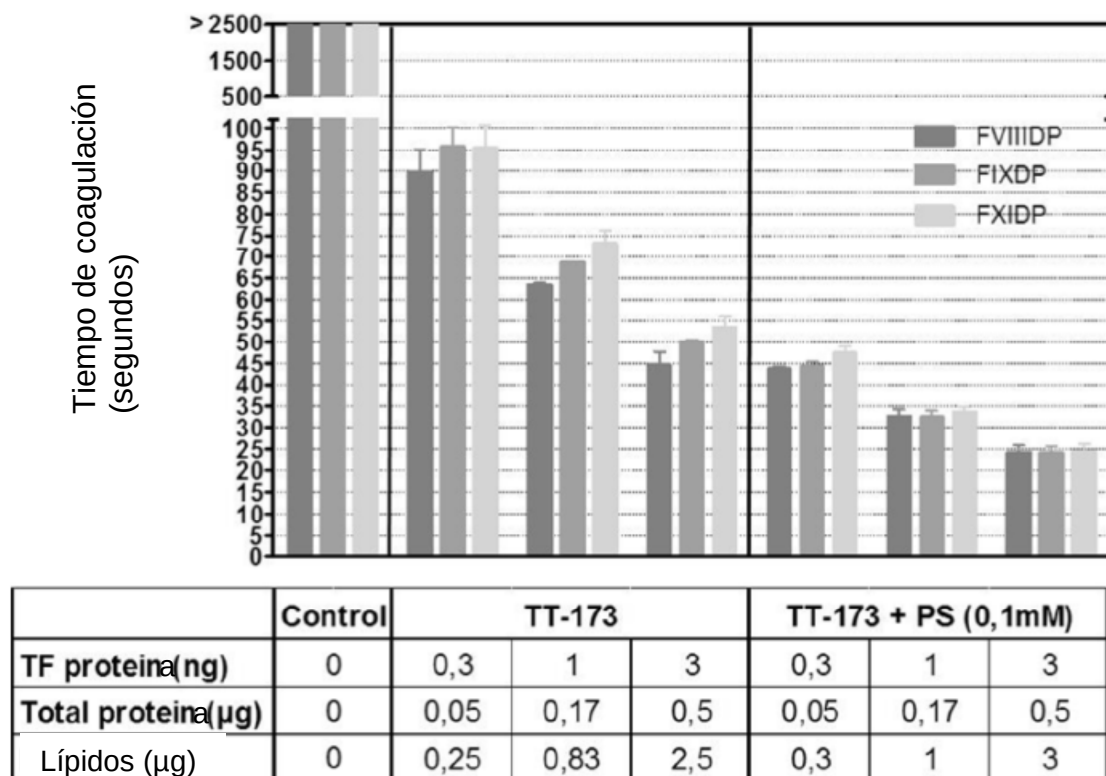
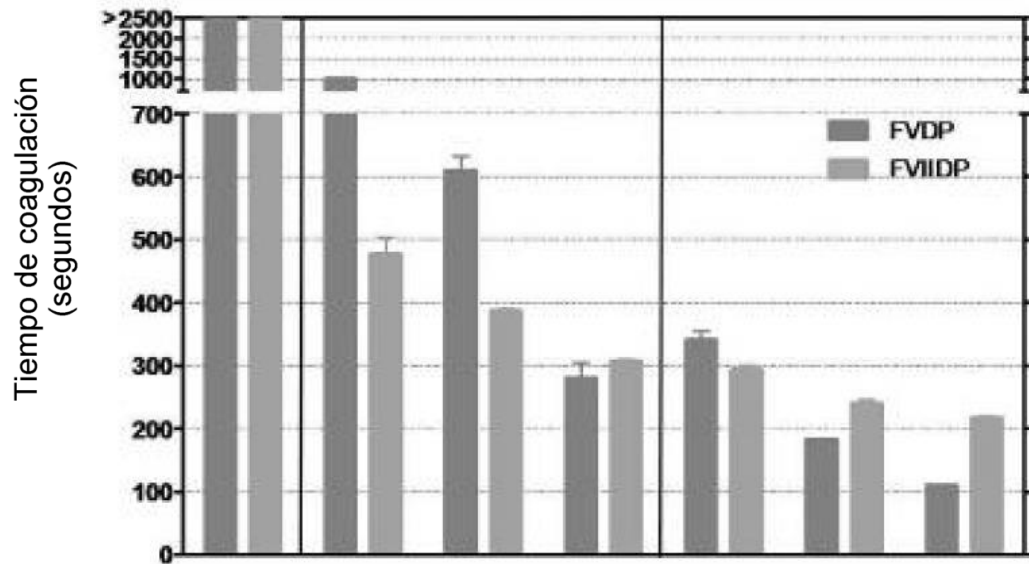


FIG. 10

Plasmas deficientes en factor de coagulación V y VII



	Control	TT-173			TT-173 + PS (0,1mM)		
Proteína TF (ng)	0	0,3	1	3	0,3	1	3
proteína total (µg)	0	0,05	0,17	0,5	0,05	0,17	0,5
lípidos (µg)	0	0,25	0,83	2,5	0,3	1	3

FIG. 11

Plasma tratado con warfarina

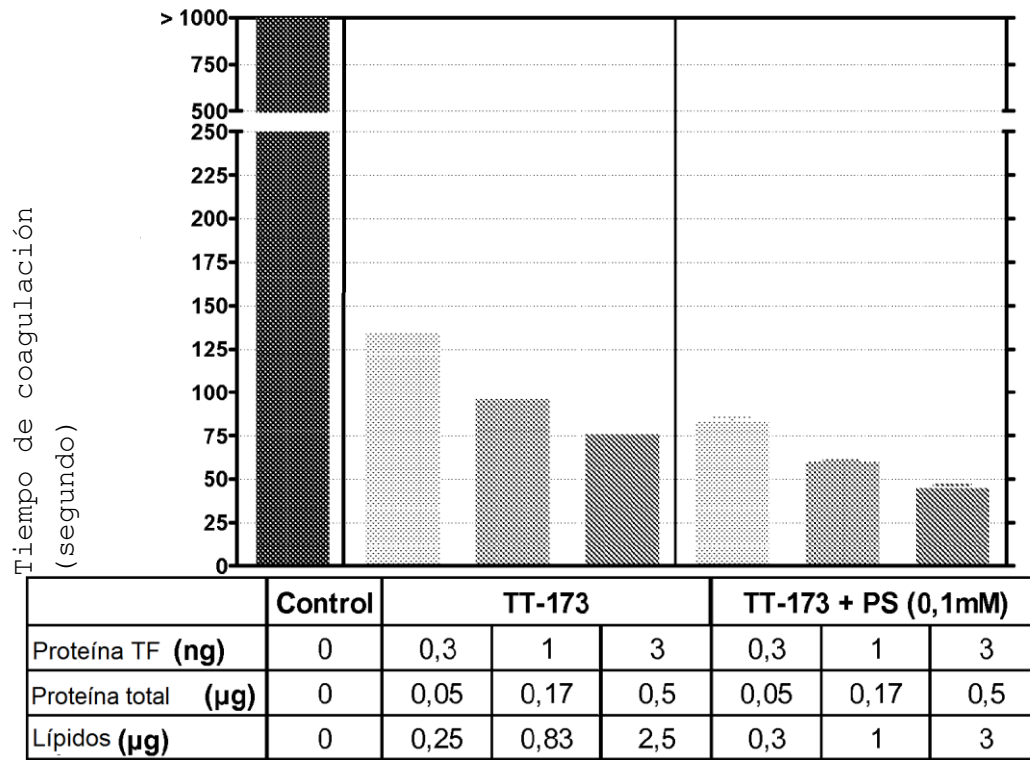
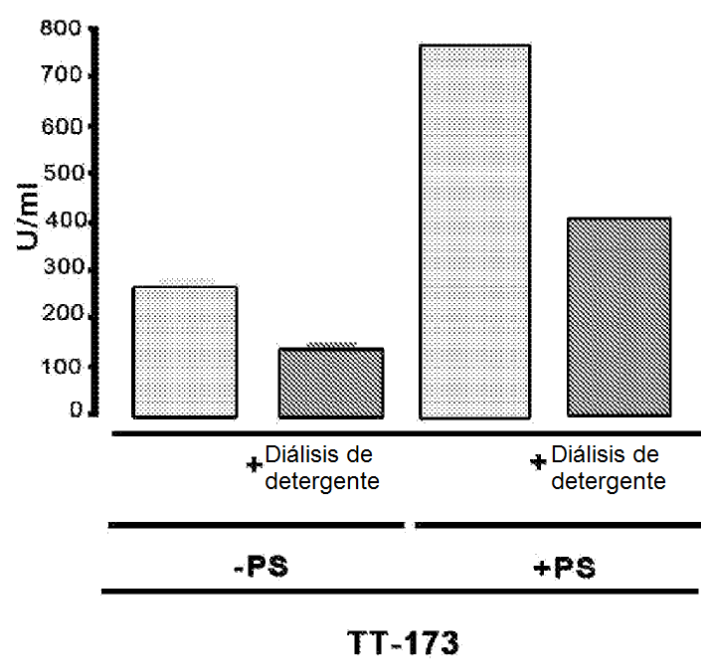


FIG. 12

A



B

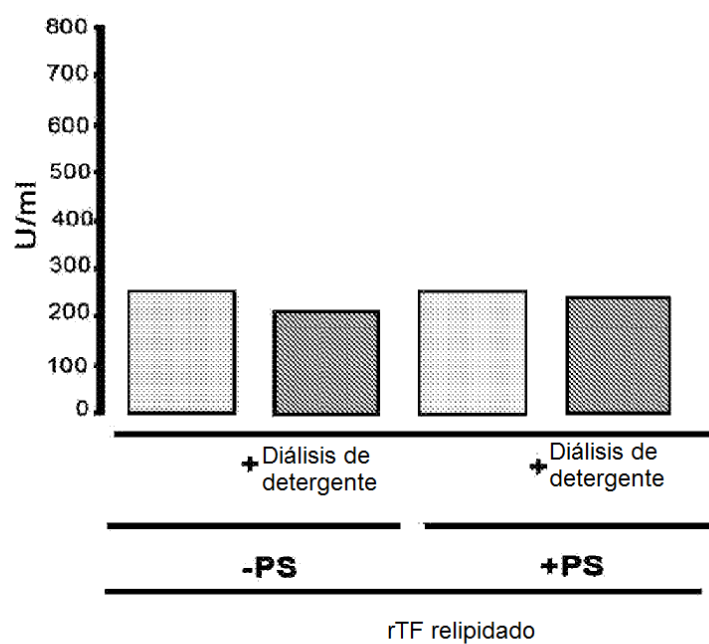
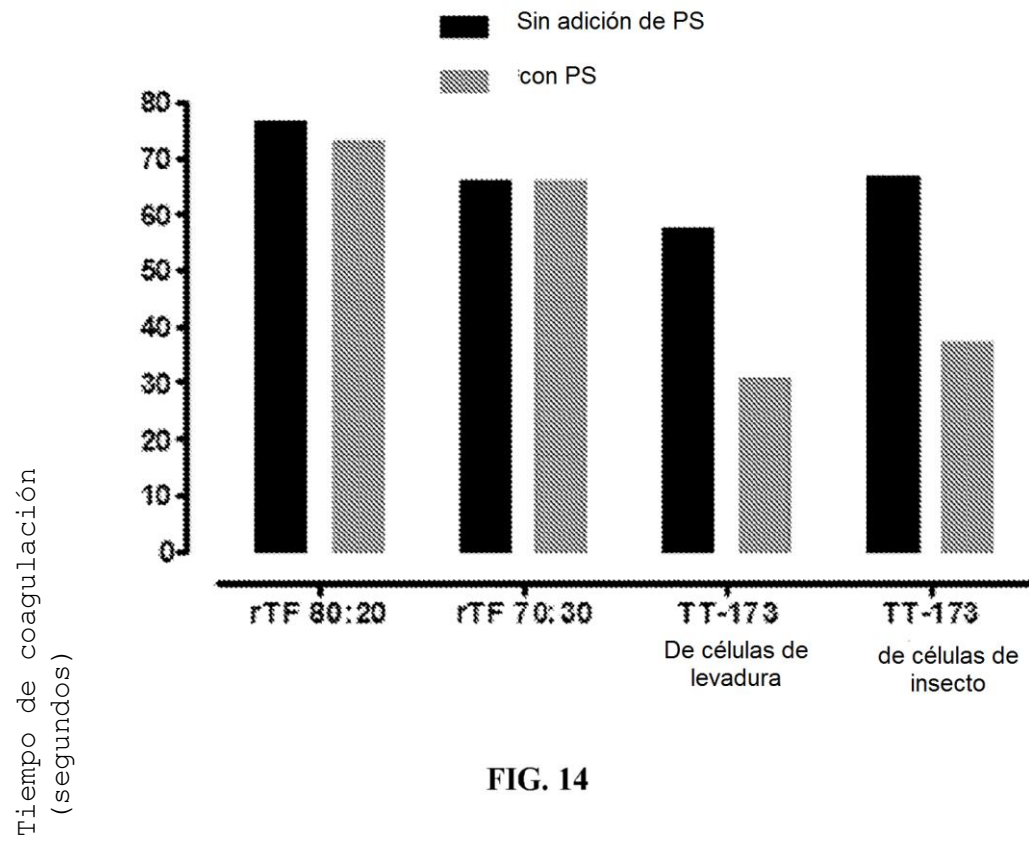


FIG. 13



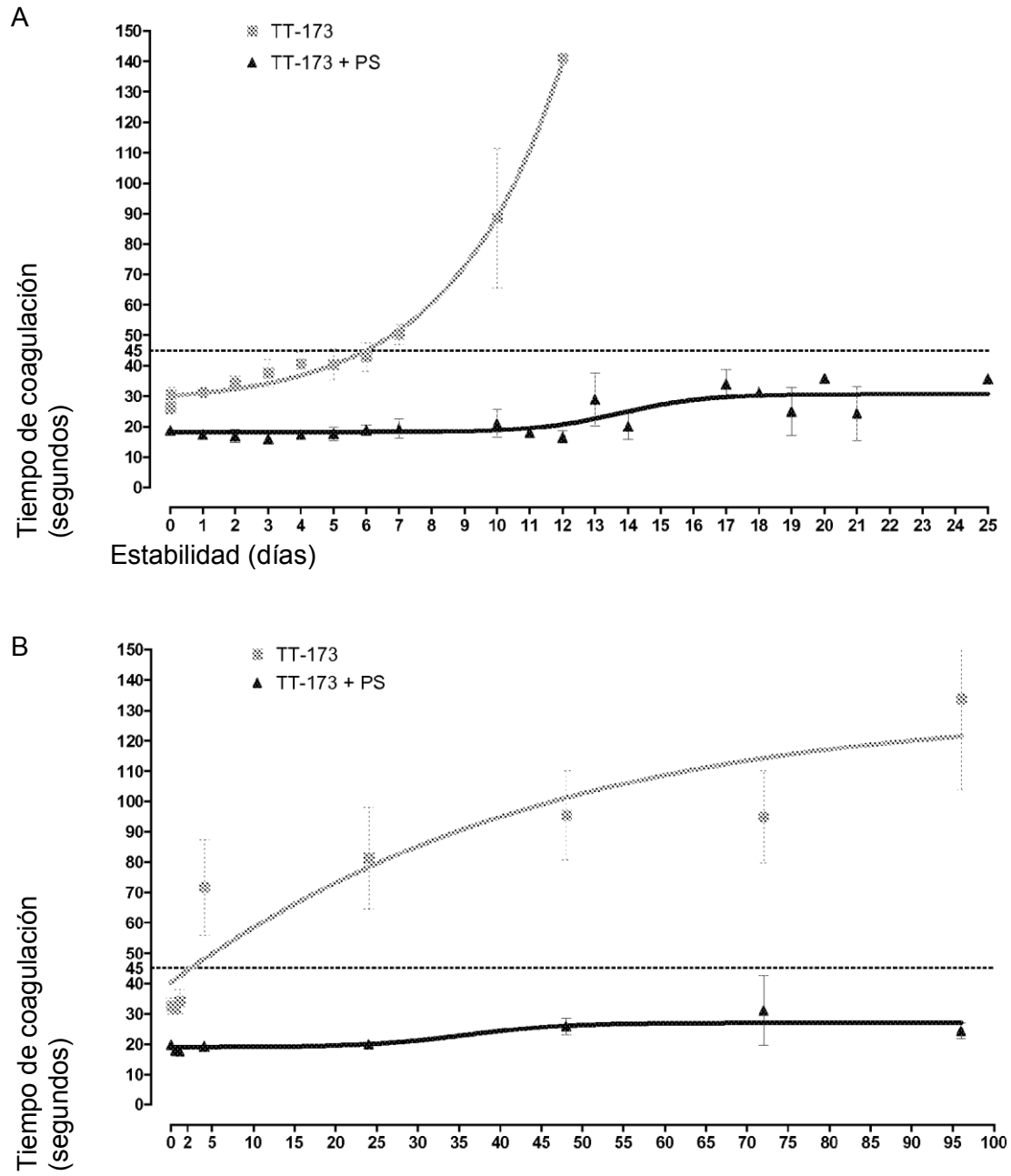


FIG. 15

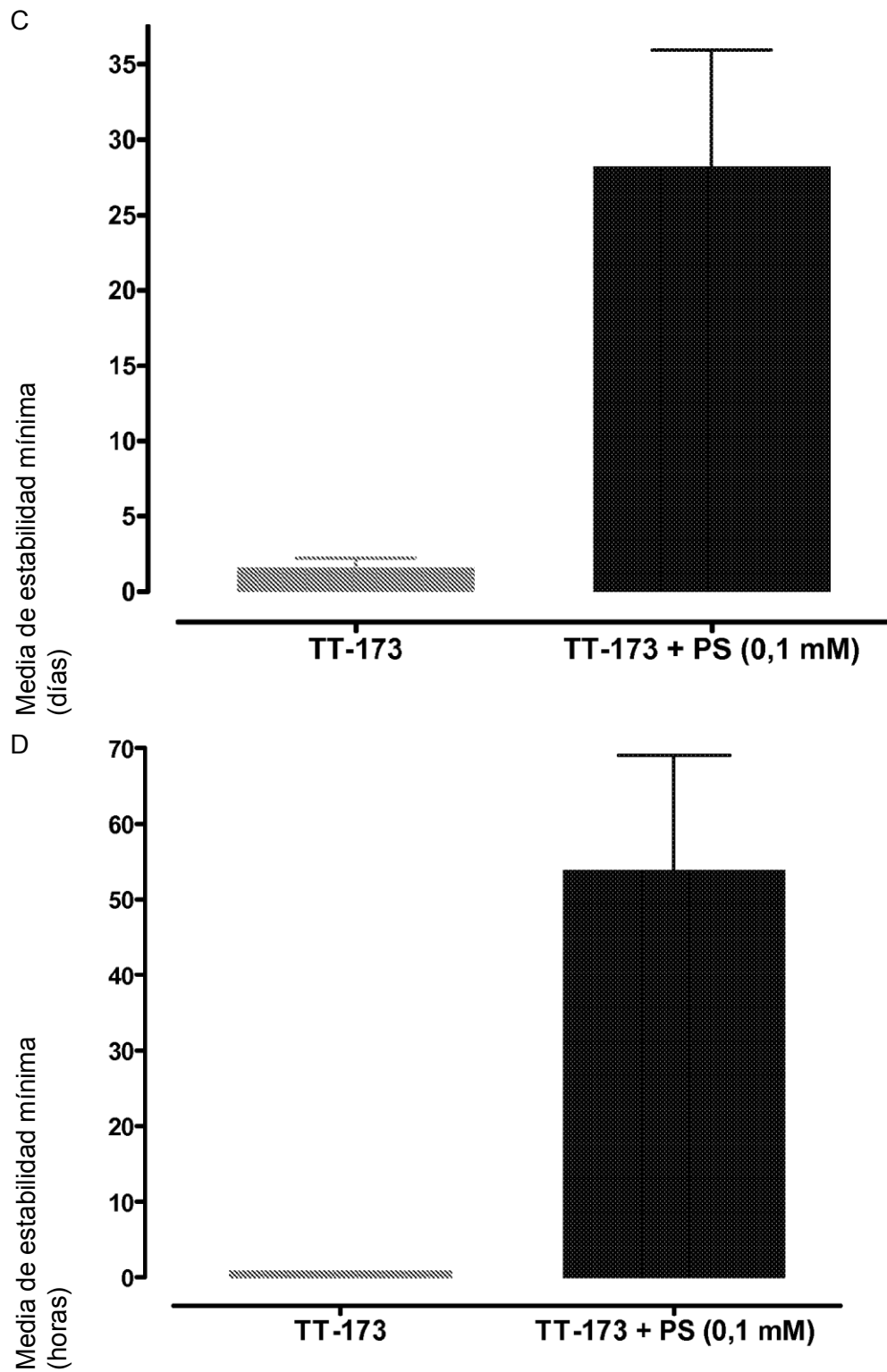


FIG. 15 (cont.)

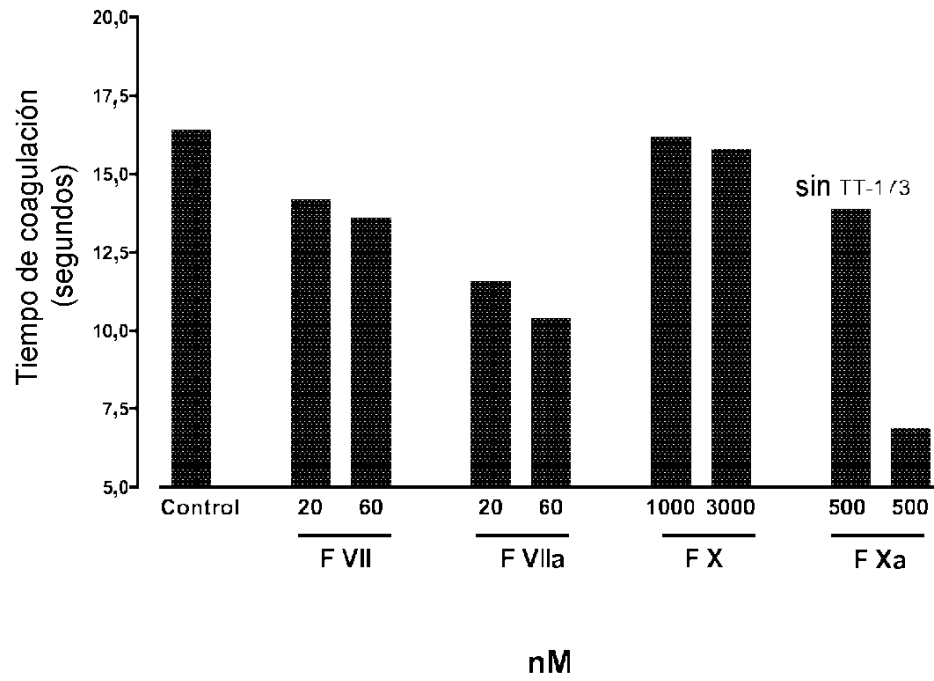


FIG. 16

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 9848283 A [0009]
- WO 2002034109 A [0009]
- US 2006088524 A [0009]
- US 2006046309 A [0009]
- WO 2008080989 A [0010] [0036] [0051] [0179] [0180] [0185]
- WO 2006004675 A [0011]
- EP 1935902 A [0012]
- EP 1212420 A [0031]
- US 0223624 W, Bascomb, N. [0063]
- US 0217927 W, Hall, G. [0063]
- US 5591616 A [0065]
- EP A0604662 A1 [0065]
- US 6130074 A [0067]
- EP 45573 A, Stinchcomb [0068]
- US 5618676 A [0070]
- US 5854018 A [0070]
- US 5856123 A [0070]
- US 5919651 A [0070]
- US 6596712 B [0165]
- EP 10382085 A [0212]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- **BACH R et al.** Biochemistry. American Chemical Society, 1986, vol. 25, 4007-4020 [0009]
- **BACH R et al.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, vol. 87, 6995-6999 [0009]
- **BRUCATO et al.** *Protein Expression and Purification*, 2002, vol. 26, 386-393 [0009]
- **MIMMS et al.** *Biochemistry*, 1981, vol. 20, 833 [0022]
- **SKINNER, F. et al.** Biology and Activities of Yeast. Soc. App. Bacteriol. Symp. Series No. 9 [0029]
- **ALTSCHUL, S. et al.** BLASTManual. NCBI NLM NIH [0037]
- **ALTSCHUL, S. et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0037]
- **TERPE K.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, vol. 60, 523-525 [0047]
- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2001 [0058]
- Transferencia génica a plantas. **MARTA IZQUIERDO.** Ingeniería genética and transferencia génica. 1999, 283-316 [0060]
- **ROOIJEN et al.** *Plant Physiology*, 1995, vol. 109, 1353-61 [0062]
- **LIU et al.** *Molecular Breeding*, 1997, vol. 3, 463-70 [0062]
- **BORISJUK et al.** *Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, 466-69 [0062]
- **HOOD et al.** *Molecular Breeding*, 1997, vol. 3, 291-306 [0062]
- **HOOD et al.** Chemicals via Higher Plant Bioengineering. Plenum Publishing Corp, 1999, 127-148 [0062]
- **KUSNADI et al.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, vol. 56, 473-84 [0062]
- **KUSNADI et al.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, vol. 60, 44-52 [0062]
- **KUSNADI et al.** *Biotechnology Progress*, 1998, vol. 14, 149-55 [0062]
- **WITCHER et al.** *Molecular Breeding*, 1998, vol. 4, 301-12 [0062]
- **VERCH et al.** *J. Immunological Methods*, 1998, vol. 220, 69-75 [0062]
- **BRENNAN et al.** *J. Virology*, 1999, vol. 73, 930-38 [0062]
- **BRENNAN et al.** *Microbiology*, 1999, vol. 145, 211-20 [0062]
- **ARAKAWA et al.** *Transgenic Research*, 1997, vol. 6, 403-13 [0062]
- **ARAKAWA et al.** *Nature Biotechnology*, 1998, vol. 16, 292-97 [0062]
- **TACKET et al.** *Nature Medicine*, 1998, vol. 4, 607-09 [0062]
- **FRALEY et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 4803 [0065]
- **HOOD et al.** *Biotechnol.*, 1984, vol. 2, 702-709 [0065]
- **HOOD et al.** *J. Bacteriol.*, 1986, vol. 168, 1283-1290 [0065]
- **KOMARI et al.** *J. Bacteriol.*, 1986, vol. 166, 88-94 [0065]
- **JIN et al.** *J. Bacteriol.*, 1987, vol. 169, 4417-4425 [0065]
- **KOMARI T.** *Plant Science*, 1989, vol. 60, 223-229 [0065]
- Biochemistry and Genetics of Yeast. Academic Press, 1978 [0068]
- **ROSE; HARRISON.** The Yeasts. Academic Press, 1987 [0068]

- **HINNEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, 1919-1933 [0068]
- **BEGGS.** *Nature*, 1978, vol. 275 (5676), 104-109 [0068]
- **BECKER ; GAURANTE.** *Methods Enzymol.*, 1991, vol. 194, 182-187 [0068]
- **GIETZ et al.** *Methods Enzymol.*, 2002, vol. 350, 87-96 [0068]
- **MOUNT et al.** *Methods Mol. Biol.*, 1996, vol. 53, 139-145 [0068]
- **WANG et al.** *Crit. Rev Biotechnol.*, 2001, vol. 21 (3), 177-218 [0068]
- **BARR et al.** *Yeast genetic engineering.* Butterworths, 1989 [0068]
- **DAVID W. STANLEY-SAMUELSON ; DENNIS R. NELSON.** *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry, and Biology Book.* University of Nebraska Press, 1993 [0107]
- **C. FAULÍ ; TRILLO.** *Tratado de Farmacia Galénica.* 1993 [0116] [0127]
- **NAKAGAWA et al.** *Seminars in Thromb. and Hemostasis*, 1998, vol. 24, 207-210 [0146]
- **PHILIPPART et al.** *The Internatl. J. of Oral and Maxillofacial Implants*, 2003, vol. 3, 411-416 [0146]
- **CARMELIET et al.** *Nature*, 1996, vol. 383, 73-75 [0161]
- **BUGGE et al.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1996, vol. 93, 6258-6263 [0161]
- **TOOMEY et al.** *Blood*, 1996, vol. 88, 1583-1587 [0161]
- **RICHARD et al.** *Oncogene*, 2002, vol. 20, 1556-1562 [0161]
- **MILIA et al.** *Circ. Res.*, 2002, vol. 91, 346-352 [0161]
- **MUELLER et al.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1992, vol. 89, 11832-11836 [0161]
- **WHITE et al.** *Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice.* J. B. Lippencott Co, 1987, 1048-1060 [0171]
- **HIRSH, J.** *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 1986, vol. 12, 1-11 [0171]
- **O'REILLY et al.** *Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice.* J. B. Lippencott Co, 1987, 1367-1372 [0172]