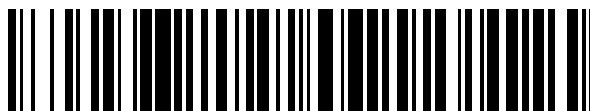


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 806**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 38/57 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2014 PCT/EP2014/051340**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14114719**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2014 E 14701195 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2948169**

54 Título: **Composiciones hemostáticas**

30 Prioridad:

24.01.2013 EP 13152475

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

26.07.2017

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:

**RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ - ALBA, JUAN RAMON
y
MURAT MORENO, JESÚS**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 626 806 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

Composiciones hemostáticas.

5 La presente invención se refiere al campo de las composiciones hemostáticas.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

10 El conjunto de mecanismos fisiológicos activados para detener el sangrado después de una lesión se conoce como hemostasia. La hemostasia es un proceso muy complejo que implica a una diversidad de moléculas y tipos de células. Para facilitar su estudio, la hemostasia se puede subdividir en cuatro etapas superpuestas: i) vasoconstricción, ii) formación de un tapón inicial de plaquetas en la zona de la herida, iii) formación de un coágulo de fibrina resistente (cascada de coagulación), y iv) una etapa de disolución del coágulo o fibrinólisis, a partir de la que comienza el proceso de curación de la herida.

15 La cascada de la coagulación se inicia después de la interacción del Factor VII (FVII), en su forma soluble e inactiva en plasma, con su receptor específico conocido como factor tisular (en lo sucesivo en el presente documento también denominado "TF"). En su forma nativa, el TF se encuentra predominantemente en la superficie de diversos tipos de células que rodean los vasos sanguíneos. Por lo tanto, en condiciones normales, éste contacta únicamente con moléculas plasmáticas en el caso de una lesión o herida. Después de la ruptura de un vaso sanguíneo, se inicia la cascada de coagulación por la asociación de TF con FVII, desencadenando la interacción posterior entre los diversos factores de coagulación sanguínea. El resultado final es la formación de trombina (FIIa) que, a su vez, convierte el fibrinógeno (FI), que es muy abundante en plasma, en fibras de fibrina. Estas fibras de fibrina son insolubles, y forman una malla, que, junto con las plaquetas, da como resultado lo que se conoce como coágulo de
25 fibrina.

Con el objetivo de facilitar una hemostasia rápida en casos de hemorragia masiva, durante siglos se han usado diversos procedimientos, tales como presión directa, envoltura con gasa, hilos de tipo sutura, y torniquete. Estas técnicas se conocen como medios hemostáticos "no activos", y ayudan en el proceso hemostático cuando se usa
30 con diferentes tipos de apósitos. En la actualidad, los apósitos más usados se basan en materiales biocompatibles y absorbibles tales como fibras de colágeno, gelatinas o fibras de celulosa oxidadas.

En un intento de mejorar las instalaciones hemostáticas quirúrgicas, en las últimas décadas se ha hecho un gran esfuerzo para desarrollar nuevos productos que contengan principios "activos" que, además de las técnicas
35 tradicionales, podrían ayudar en la mejora de la hemostasia. En este sentido, en el mercado hay disponibles medicamentos ("medios hemostáticos activos"), que contienen o todo el conjunto de factores de coagulación en concentrados de plasma o basados en factores aislados con un alto grado de pureza.

Entre ellos, ya están disponibles en el mercado el Factor de coagulación VII (FVII), factor de coagulación VIII (FVIII),
40 factor de coagulación IX (FIX), y factor de coagulación XI (FXI) ya están disponibles en el mercado. Para superar diversas deficiencias plasmáticas responsables de ciertas enfermedades como la hemofilia, estos se deberían administrar por vía intravenosa. Sin embargo, solamente la trombina, también conocida como Factor II activado (FIIa), o composiciones que la comprenden, son usadas como agente hemostático tópico que se debe aplicar en lesiones de la piel o sobre heridas que sangran en la cirugía. De hecho, desde los años 50, el FIIa se ha usado
45 ampliamente en múltiples aplicaciones quirúrgicas. En muchas de las aplicaciones descritas, el FIIa está asociado a un soporte de tipo esponja, gasa, o gel, tal como gel de colágeno o gelatinas.

El FIIa actúa en las últimas etapas de la cascada de coagulación, directamente sobre el fibrinógeno (FI), lo que facilita una rápida formación de coágulos. Por lo tanto, su eficacia no requiere la activación de los factores de
50 coagulación restantes. Sin embargo, para asegurar su eficacia, el FIIa se tiene que aplicar sobre superficies que sangran a concentraciones elevadas. Esto se debe a la existencia de muchos factores que reducen su concentración activa, tales como: i) su concentración se diluye debido al flujo sanguíneo, ii) existe una inactivación rápida debido a la interacción con su inhibidor natural, la antitrombina III, iii) existe una inactivación adicional debido a su inmovilización en la formación de trombos, y iv) su eliminación mecánica con gasas o por irrigación del
55 procedimiento quirúrgico. Tales factores (i) - (iv) obligan al uso de concentraciones de FIIa terapéuticamente más elevadas que las necesarias durante la formación fisiológica de coágulos. En ciertas actividades quirúrgicas, en las que se recomienda el uso de heparina, la concentración de FIIa recomendada aumenta.

A pesar de su utilidad, se han descrito muchos efectos secundarios debido al uso de estas cantidades elevadas de
60 FIIa. Entre ellos: (a) al tratarse de una molécula proinflamatoria, estas concentraciones pueden dar lugar a un proceso de inflamación no fisiológico; (b) existe un riesgo de inmunogenicidad porque la trombina se obtiene, en muchos casos, a partir de plasma animal no humano, y (c) el FIIa obtenido del plasma de origen humano tiene el riesgo de contener agentes extraños. Además de (a)-(c), e independientemente de la concentración usada, la

trombina por sí misma no es eficaz en la inducción de una propagación adecuada de la coagulación sanguínea, requisito para una hemostasia rápida.

Por lo tanto, en vista de lo anterior, existe la necesidad de composiciones hemostáticas adicionales con un perfil
5 hemostático adecuado.

SUMARIO DE LA INVENCION

Los presentes inventores han encontrado que añadiendo factor tisular lipidado (TF) a trombina, el efecto hemostático
10 de la trombina aumenta sustancialmente, de tal modo que la cantidad de trombina necesaria para obtener el efecto deseado se puede reducir.

En particular, cuando se preparó una composición que comprendía una combinación de factor tisular lipidado y trombina, se encontró que el efecto hemostático de la trombina aumentó de forma sinérgica de un modo tal que era
15 posible usar pequeñas cantidades de trombina (de 1 a 30 IU por gramo de composición) cuando el TF lipidado estaba presente en la composición a una concentración de 5-150 ng por gramo de composición.

Como se resume en la Tabla 2 de más abajo, por ejemplo, usando una composición como la de la invención, que comprende 1 IU de trombina/gramo de composición, el tiempo de coagulación se redujo aproximadamente al menos
20 5 veces cuando el TF lipidado se incorporaba a una concentración de 5, 15, ó 150 ng/gramo de composición. También se observaron reducciones sustanciales en el tiempo de coagulación cuando las composiciones que comprendían 3 UI o 30 UI de trombina/gramo de composición se prepararon junto con TF lipidado a concentraciones de 5, 15, y 150 ng/gramo de composición.

Por lo tanto, estos datos experimentales permiten concluir que cuando la trombina se combina con TF lipidado, se observa una gran reducción en el tiempo necesario para iniciar la formación de la red de fibrina. Esto significa que
25 con la administración de TF lipidado junto con trombina, se tiene un efecto hemostático muy fuerte. También se ha observado en estudios in vivo este efecto sinérgico derivado de la combinación de Trombina más TF a determinadas concentraciones (FIG. 1).

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una combinación de factor tisular lipidado y trombina, en la que la cantidad de trombina está comprendida de 1 a 30 IU
30 por gramo de composición, y la cantidad de factor tisular lipidado está comprendida de 5 a 150 ng por gramo de composición.

Además de lo mencionado anteriormente, las composiciones de la invención, que incluyen concentraciones bajas de trombina, proporcionan un efecto hemostático que puede ser sustancialmente el mismo que el proporcionado con la
35 administración de 300 UI de trombina/ml.

Como se ha indicado anteriormente, cuando se administra la composición de la invención, usando cantidades bajas de trombina, se requiere mucho menos tiempo para detener el sangrado.

Esto es de especial relevancia en casos de traumatismos internos, en los que las compresiones con trombina u otros productos hemostáticos no son lo suficientemente eficaces para detener el sangrado, existiendo un riesgo elevado
45 de muerte del paciente. Con la composición de la invención la coagulación se produce mucho más rápido, lo que significa un gran avance en casos de traumatismos internos en los que el tiempo para detener el sangrado es crítico para la supervivencia del paciente.

Además, usando cantidades bajas de trombina, la composición de la invención evita los problemas asociados con la
50 administración de cantidades elevadas de trombina que se describen en la técnica anterior, tales como inflamación y efectos inmunogénicos secundarios, entre otros.

La composición del primer aspecto de la invención puede incluir otros ingredientes, tales como inhibidores de la fibrinólisis, CaCl₂. etc. con la condición de que dichos otros ingredientes no influyan de manera negativa en la
55 actividad hemostática de la combinación de trombina y factor tisular lipidado.

Debido a las propiedades de la composición del primer aspecto de la invención, se puede usar en forma de composiciones farmacéuticas o veterinarias.

Por lo tanto, en un segundo aspecto la presente invención proporciona una composición farmacéutica o veterinaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición del primer aspecto de la invención, junto
60 con otros excipientes y/o portadores apropiados aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.

Debido a las excelentes propiedades hemostáticas de la composición del primer aspecto de la invención (Tabla 2 que sigue a continuación), tanto la composición del primer aspecto de la invención como la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención se puede usar en la formulación de una composición hemostática junto con un material portador apropiado.

5

Por lo tanto, en un tercer aspecto la presente invención proporciona una composición hemostática que comprende la composición como se define en el primer aspecto de la invención, o la composición farmacéutica o veterinaria como se define en el segundo aspecto de la invención, y un material vehículo.

10 En un cuarto aspecto la presente invención proporciona el uso de la composición del primer aspecto de la invención o de la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención como agente hemostático.

Como se ha comentado anteriormente, las composiciones de la invención, debido a su efecto hemostático, son útiles en el tratamiento de hemorragias.

15

Por lo tanto, en un quinto aspecto la presente invención proporciona la composición del primer aspecto de la invención o la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención o la composición hemostática del tercer aspecto de la invención, para su uso como medicamento. Este aspecto se puede formular como un método para el tratamiento de una enfermedad que comprende administrar una cantidad terapéuticamente

20 eficaz de la composición del primer aspecto de la invención o de la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención o de la composición hemostática del tercer aspecto de la invención junto con otros excipientes y/o portadores apropiados aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, a un sujeto que lo necesite.

25 En un sexto aspecto la presente invención proporciona la composición del primer aspecto de la invención o la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención o la composición hemostática del tercer aspecto de la invención, para su uso en el tratamiento de hemorragias.

Alternativamente, este aspecto se puede formular como el uso de la composición del primer aspecto de la invención o de la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención o de la composición hemostática del tercer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de hemorragias. Este aspecto se puede formular, alternativamente, como un método para el tratamiento de hemorragias, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición del primer aspecto de la invención o de la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención o de la composición hemostática del tercer aspecto de la invención junto con otros excipientes y/o portadores apropiados aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, a un sujeto que lo necesite.

30 En un aspecto más la presente invención proporciona el uso de la composición del primer aspecto de la invención o de la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención o de la composición hemostática del tercer aspecto de la invención como agente para curación de heridas.

Por último, las composiciones de la invención se pueden proporcionar como un kit.

45 Por lo tanto, en un octavo aspecto la presente invención proporciona un kit que comprende la composición como se define en el primer aspecto de la invención, o la composición farmacéutica como se define en el segundo aspecto de la invención, y un aplicador que permite la aplicación simultánea tanto de trombina, como del factor tisular lipidado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

50 La FIG. 1 representa el tiempo de coagulación para algunos tratamientos en incisión individual en el hígado. Cada barra corresponde a la media del tiempo para la hemostasia (en segundos) conseguida de tres a seis experimentos independientes con cada una de las muestras de ensayo que se describen en el eje x. La significancia estadística de los resultados se confirmó con el ensayo de Comparación Múltiple de Newman-Keuls, dados los siguientes valores de p: barra 6 frente a barra 5 y barra 3: valor de $p < 0,05$.

55

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se ha indicado anteriormente, en un primer aspecto la presente invención proporciona una composición que comprende trombina y factor tisular lipidado.

60

En una realización, la composición del primer aspecto de la invención se encuentra en forma sólida, forma semisólida, o forma líquida.

En la presente invención, se debe entender que la expresión “forma sólida” incluye polvo, y espumas sólidas.

En la presente invención, se debe entender que la expresión “forma semisólida” incluye pomadas, pastas, cremas, geles blandos o duros, suspensiones, emulsiones, y supositorios.

5

En la presente invención, se debe entender que la expresión “forma líquida” incluye espumas líquidas, soluciones, y lociones.

10 En una realización, la composición del primer aspecto de la invención comprende trombina a una concentración comprendida de 10 a 30 IU por gramo de composición.

En otra realización, la composición del primer aspecto de la invención comprende trombina a una concentración de 1 IU por gramo de composición, 3 IU por gramo de composición o 30 IU por gramo de composición.

15 En otra realización, la composición del primer aspecto de la invención comprende factor tisular lipidado a una concentración comprendida de 5 a 15 ng por gramo de composición.

En otra realización, la composición del primer aspecto de la invención comprende factor tisular lipidado a una concentración de 150 ng por gramo de composición.

20

En otra realización, la composición del primer aspecto de la invención es una composición seleccionada del grupo que consiste en:

- 1 IU de trombina por gramo de composición y 5 ng de TF lipidado por gramo de composición;
- 25 - 1 IU de trombina por gramo de composición y 15 ng de TF lipidado por gramo de composición;
- 1 IU de trombina por gramo de composición y 150 ng de TF lipidado por gramo de composición;
- 3 IU de trombina por gramo de composición y 5 ng de TF lipidado por gramo de composición;
- 3 IU de trombina por gramo de composición y 15 ng de TF lipidado por gramo de composición;
- 3 IU de trombina por gramo de composición y 150 ng de TF lipidado por gramo de composición;
- 30 - 30 IU de trombina por gramo de composición y 5 ng de TF lipidado por gramo de composición;
- 30 IU de trombina por gramo de composición y 15 ng de TF lipidado por gramo de composición; y
- 30 IU de trombina por gramo de composición y 150 ng de TF lipidado por gramo de composición.

35 En otra realización, la composición del primer aspecto de la invención es una seleccionada del grupo que consiste en:

- 1 IU de trombina por gramo de composición y 150 ng de TF lipidado por gramo de composición;
- 3 IU de trombina por gramo de composición y 150 ng de TF lipidado por gramo de composición; y
- 40 - 30 IU de trombina por gramo de composición y 150 ng de TF lipidado por gramo de composición.

En otra realización, la composición del primer aspecto de la invención comprende 20 IU de trombina por gramo de composición y 8 ng de TF lipidado por gramo de composición.

45 En la presente invención, la expresión “factor tisular” (TF) se debe entender como una glicoproteína de membrana integral que está ampliamente distribuida en el reino animal. El TF aparece en diferentes tipos de células, predominantemente en el tejido subendotelial, y es necesario para el inicio de la ruta extrínseca de la cascada de coagulación que conduce a la producción del FIIa y la formación de un coágulo de fibrina estable. Algunas proteínas de TF a modo de ejemplo que se pueden usar en la presente invención incluyen TF humano (Versión 148 de UniProtKB/Swiss-Prot., noviembre de 2012, número de referencia P13726), TF de ratón (Versión 103 de UniProtKB/Swiss-Prot., noviembre de 2012, número de referencia P20352), TF bovino (Versión 89 de UniProtKB/Swiss-Prot., noviembre de 2012, número de referencia P30931), TF de conejo (Versión 90 de UniProtKB/Swiss-Prot., noviembre de 2012, número de referencia P24055) y proteínas de TF de diferentes animales.

55 La proteína de TF humano con el número de referencia P13726 de SwissProt tiene una estructura de dominio bien definida que comprende (1) un péptido de señal o una región con una secuencia líder de 32 aminoácidos que se procesa después de la traducción a partir de la forma inmadura a la madura; (2) un dominio extracelular hidrófilo N-glicosilado que comprende 219 aminoácidos; (3) un fragmento altamente hidrófobo de 23 aminoácidos, que forma el dominio transmembrana; y (4) el extremo carboxilo de 21 aminoácidos que es el fragmento citoplasmático de la proteína.

60

En una realización en particular, el TF corresponde al TF maduro.

La expresión "TF maduro", como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína de TF cuya secuencia de aminoácidos carece del péptido de señal. En una realización, dicha proteína de TF maduro es el TF humano maduro de la SEC ID N°: 1.

5 En una realización, el TF está glicosilado.

Como se usa en el presente documento, el término "glicosilado" incluye cualquier grado de glicosilación. Dado que el TF nativo contiene varios sitios de glicosilación, como se explica en detalle más abajo, la expresión "factor tisular" también incluye aquellas formas de la proteína que muestran diferentes grados de glicosilación, obteniéndose dichas formas mediante la expresión del TF en hospedadores capaces de llevar a cabo reacciones de N-glicosilación. Además, la expresión "factor tisular" también incluye las variantes que resultan de la inserción, supresión, o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de TF nativo. Ensayos funcionales adecuados que se pueden usar para evaluar si un polipéptido dado es una variante funcional de TF son los ensayos basados en la determinación de la capacidad de la variante de TF para unirse de forma específica a FVIIa, o en la determinación *in vitro* del tiempo de coagulación en plasma o en sangre completa, mediante un ensayo *in vivo* en un modelo animal de hemorragia grave 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.

Tales variantes de acuerdo con la presente invención incluyen secuencias de aminoácidos que son idénticas en al menos un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o un 96 % a las moléculas del TF nativo que se han mencionado anteriormente. Como se conoce en el estado de la técnica, la "identidad" entre dos proteínas se determina por comparación de la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de una proteína con una secuencia de una segunda proteína. El grado de identidad entre dos proteínas se determina usando algoritmos informáticos y métodos que son ampliamente conocidos para las personas expertas en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP.

El TF puede estar totalmente glicosilado, parcialmente glicosilado o no glicosilado.

30 En la presente solicitud "totalmente glicosilado" significa que todos los sitios potenciales de glicosilación se han glicosilado.

En la presente solicitud "parcialmente glicosilado" significa que al menos uno de los tres sitios de N-glicosilación no es funcional, no siendo posible su glicosilación.

35 En la presente solicitud "no glicosilado" significa que ninguno de los sitios de N-glicosilación es funcional o, alternativamente, el polipéptido de TF se ha expresado mediante un método de no glicosilación *in vitro* (es decir sistema de expresión libre de células), o en un vector desprovisto de rutas de glicosilación metabólica (es decir *E. coli*).

40 En una realización, el TF está parcialmente glicosilado o no glicosilado. En esta realización, el TF se ha modificado de tal manera que al menos uno de los sitios de N-glicosilación no es funcional, no siendo posible su glicosilación.

Todas las proteínas del TF maduro contienen tres sitios potenciales de glicosilación N-unidos que tienen la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr. En el caso del TF maduro humano, estos tres sitios de glicosilación se localizan en Asn11 (secuencia Asn11-Leu12-Thr13), Asn124 (secuencia Asn124-Val125-Thr126) y Asn137 (secuencia Asn137-Asn138-Thr139), estando dichas posiciones con respecto a la SEC ID N°: 1.

50 En una realización, el sitio o sitios de N-glicosilación que se pueden modificar para hacerlos no funcionales en la proteína del TF maduro humano son los que corresponden a los sitios NLT de N-glicosilación en las posiciones 11-13, NVT en las posiciones 124-126, y NNT en las posiciones 137-139 en el TF humano maduro de la secuencia SEC ID N°: 1 mencionada anteriormente.

55 En otra realización, el TF porta una o más sustituciones de los residuos de Asn en los residuos que no son aceptores de la N-glicosilación. En una realización aún más preferida, la variante de TF comprende una o más mutaciones de Asn a Ala en los residuos de Asn en posiciones que corresponden a las posiciones 11, 124 ó 137 en el TF humano maduro. Preferiblemente, el TF humano maduro porta la mutación de Asn a Ala en la posición 124 de la SEC ID N°: 1.

60 La glicosilación variará dependiendo del sistema de expresión usado para la producción de TF. Por ejemplo, la proteína del factor tisular puede incluir uno o más glucanos específicos de vegetales, glucanos específicos de levaduras, glucanos específicos de insectos, o glucanos específicos de animales.

5 Cuando el TF se produce en levadura, por lo general la glicosilación implicará un núcleo interno de aproximadamente diez residuos de manosa, unidos a la asparagina a través de dos residuos de GlcNAc, y una cadena externa ramificada de 50-100 residuos de manosa. Por lo tanto, la glicosilación N-unida podría añadir de forma potencial tanto como 300 residuos de manosa al TF, un aumento en la masa molecular de aproximadamente 60 kDa. Además, también es posible que se puedan unir varios residuos de manosa a diversos sitios de glicosilación O-unidos (más de 25). Por lo tanto, las moléculas de TF incluidas en las composiciones de la presente invención tienen un grado y una composición variables de glicosilación unida a N en uno o más sitios de N-glicosilación.

10 En otra realización, la proteína de TF es una proteína de fusión, dicha proteína de fusión comprendiendo una primera porción, que comprende dicha proteína de TF y una segunda porción, que comprende otro péptido o proteína.

15 Dicha segunda porción se puede unir a la primera porción del N-terminal de dicho fragmento de proteína de TF o, alternativamente, dicha segunda porción se puede unir a la región del C-terminal de dicho fragmento de proteína de TF. Tanto la primera como la segunda porción se pueden unir directamente o se pueden unir a través de un polipéptido engarce entre dichas primera y segunda regiones.

20 En otra realización, dicha segunda porción es una etiqueta. La etiqueta se puede unir al dominio C-terminal o N-terminal de la primera porción de la proteína de TF.

25 En la presente invención, el término "etiqueta" se debe entender como cualquier péptido o secuencia de aminoácidos, unido al dominio C-terminal o N-terminal de dicha proteína de TF, que se puede usar en el aislamiento o purificación de la proteína de fusión. Por lo tanto, dicha etiqueta 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 para cromatografía con afinidad elevada. Un ejemplo de dicha etiqueta es una etiqueta de histidina (etiqueta de His o HT), tal como una etiqueta que comprende 6 residuos de histidina (His6 o H6), que se pueden unir a una columna de níquel (Ni^{2+}) o cobalto (Co^{2+}) con afinidad elevada. Ejemplos adicionales ilustrativos, no limitativos, de etiquetas útiles en el aislamiento o purificación de una proteína de fusión incluyen etiqueta de Arg, etiqueta de FLAG, etiqueta de Estrep, un epítipo capaz de ser reconocido por un anticuerpo, tal como etiqueta de c-myc (reconocido por un anticuerpo anti-c-myc), etiqueta de SBP, etiqueta de S, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, etiqueta de glutatión S-transferasa, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, etiqueta de Avi, entre otros, 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.

35 Se ha descrito anteriormente que la etiqueta de His, usada para el aislamiento o purificación de TF recombinante, tiene la característica deseable de que puede unir sus ligandos en condiciones que son de desnaturalización para la mayoría de las proteínas y perjudiciales para la mayoría de interacciones proteína-proteína. Por lo tanto, se puede usar para retirar la proteína cebo marcada con H6 después de la interrupción de las interacciones proteína-proteína en las que ha participado el cebo.

40 Por lo tanto, en una realización, la etiqueta es una etiqueta de His. En otra realización, dicha etiqueta de His se une al dominio C-terminal de la primera porción de la proteína TF. En todavía otra realización, dicha etiqueta de His está unida al dominio N-terminal de la primera porción de la proteína TF.

45 En otra realización, la primera porción de la proteína de fusión comprende la proteína del TF maduro, preferiblemente, la proteína del TF humano maduro. Además, en otra realización, la primera porción se encuentra en el TF maduro humano.

50 En otra realización, la proteína de fusión tiene una primera porción que comprende la proteína del factor tisular humano maduro con al menos uno de los sitios de N-glicosilación no siendo funcional, y una segunda porción que comprende una etiqueta de His. En una realización preferida, el factor tisular es una proteína de fusión que comprende un TF humano de la SEC ID N°: 5 que: (a) carece de la secuencia señal, (b) tiene una mutación de N124A en el sitio de glicosilación, y (c) tiene una etiqueta de hexahistidina en el extremo C.

55 Dicha proteína de fusión se puede obtener por medios convencionales, por ejemplo, por medio de expresión genética de la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de fusión en una célula de levadura adecuada. La etiqueta eventual se puede usar, si se desea, para el alistamiento o purificación de dicha proteína de fusión.

60 La expresión "Factor tisular lipidado (TF)", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier fuente de TF, estando este TF total o parcialmente insertado en vesículas lipídicas o membranas celulares. Algunos ejemplos ilustrativos no limitativos de fuentes de "TF lipidado" son: 1) TF lipidado que contiene extracto de tejido (cuyo aislamiento se puede realizar a partir de varios tejidos tales como tejido cerebral, placentaria y pulmonar,

tejidos de diferentes animales tales como ovejas, vacas, conejos, perros, y seres humanos, entre otros); 2) componente proteínico de TF purificado y (re)-lipidado, es decir que se ha añadido el componente lipídico (fosfolípidos) después de la purificación del TF; y 3) extracto celular que contiene TF lipidado cuando la fracción lipídica proviene de la célula hospedadora y el TF se ha expresado de forma recombinante.

5 El TF purificado y (re)-lipidado se puede preparar, a modo de un ejemplo ilustrativo, no limitativo, de acuerdo con el protocolo que se ha descrito anteriormente en Mimms L. T. *et al.*, "Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside", *Biochemistry*, 1981, vol. 20 (4), p. 833-840. En dicho protocolo, el TF no lipidado se incorpora dentro de vesículas de fosfolípido usando un detergente no iónico, tal como
10 N-octil-beta-D-galactopiranosido, por ejemplo. Los fosfolípidos que se pueden usar en el TF lipidado de acuerdo con la invención pueden tener cualquier origen (animal, vegetal o sintético). De forma virtual, se puede usar cualquier fosfolípido en la preparación del TF lipidado mencionado en el presente documento. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de fosfolípidos que se pueden usar en la preparación del TF lipidado incluyen fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, etc. La relación del componente proteico del TF:fosfolípido (molar, peso o
15 volumétrica) puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 1:50000 a aproximadamente 1:3000. En una realización particular el TF lipidado es un TF humano lipidado y consiste en el componente proteico de un TF aislado de tejido humano, o de células recombinantes, y se puede insertar en una membrana lipídica en una relación adecuada de componente proteico de TF:fosfolípido. Las relaciones molares preferidas de la composición de lípido (preferiblemente fosfatidilcolina y fosfatidilserina), para conseguir la actividad
20 óptima del TF, son bien conocidas en el estado de la técnica.

Con respecto a la preparación de un extracto celular que contiene TF lipidado donde la fracción lipídica proviene de la célula hospedadora y el TF se ha expresado de manera recombinante, puesto que la molécula de TF contiene un
25 gran dominio hidrófobo, es razonable asumir que la clonación del gen de rTF en cualquiera de los sistemas de expresión eucariota disponibles daría como resultado la expresión de la proteína TF recombinante (rTF) asociada a membranas lipídicas de células hospedadoras. En esta asociación, sería posible que los componentes membranosos hospedadores pudieran imitar o proporcionar un armazón similar o idéntico al de moléculas de rTF tal y como se encuentran en las células de mamífero a las que normalmente se asocia el TF. Por lo tanto, la purificación de estos componentes membranosos daría como resultado una fuente disponible de rTF lipidado. Debido a su
30 composición química, estos componentes membranosos lipídicos aislados se encontrarían de forma predominante en forma de vesículas de diferentes tamaños. Además de rTF, esas vesículas también contendrían proteínas o lípidos específicos dependiendo del origen de la célula hospedadora. Por lo tanto, las membranas lipídicas que provienen de levaduras, bacterias, células de diferente origen tales como insectos, mamíferos, plantas, peces, algas, también contendrían proteínas y lípidos característicos de tales células hospedadoras).

35 El TF comprende una región hidrófoba (el dominio transmembrana) que se ancla a una membrana lipídica, mientras que las regiones hidrófilas de la misma (es decir, la región amino terminal y la región carboxilo terminal de dicha proteína TF) se encuentran orientados en el lado exoplasmático de la membrana.

40 En la presente invención, la expresión "membrana lipídica" se debe entender como una capa organizada de unas pocas moléculas de grosor (lípidos y proteínas) que forma el límite de una célula (es decir, la membrana celular o plasmática) o los límites de orgánulos intracelulares. Por lo general, una membrana está formada por dos capas lipídicas orientadas en las que se pueden embeber proteínas. Una bicapa lipídica, que es la estructura básica de las membranas de una célula, está formada normalmente por moléculas anfipáticas (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos
45 grasos, etc.) en un entorno acuoso, estando orientada cada molécula con el grupo hidrófilo en la parte externa de la capa y el grupo hidrófobo en la parte interior de la capa. Preferiblemente, el TF está anclado en una microvesícula lipídica.

En la presente invención, "microvesícula lipídica" se debe entender como un compartimento pequeño y cerrado, que
50 está formado sustancialmente por mono o bicapas lipídicas. El tamaño de la microvesícula que porta el TF de la invención puede variar dentro de un intervalo relativamente amplio, normalmente, dicho tamaño es inferior o igual a 10 μm , por lo general inferior o igual a 0,5 μm . En una realización particular, el tamaño de las microvesículas derivadas de levadura que porta 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. En una realización, la microvesícula puede
55 estar enriquecida en fosfolípidos cargados negativamente, preferiblemente, fosfatidilserina. Métodos para enriquecer tales microvesículas con fosfatidilserina se describen, por ejemplo, en el documento de patente WO2011/131658. Brevemente, dichas microvesículas enriquecidas en fosfolípidos que portan TF se pueden preparar mediante un proceso que comprende: a) someter a fermentación un cultivo de células eucariotas recombinantes que expresan la proteína TF, en condiciones que permitan la expresión de dicha proteína TF, o de un fragmento de la misma que
60 tiene actividad pro-coagulante; b) sedimentar las células cultivadas que resultan de la fermentación de la etapa a), para proporcionar un producto de fermentación; c) someter dicho producto de fermentación de la etapa b) a la homogeneización, para proporcionar un homogenado de fermentación; y d) someter dicho homogenado de fermentación de la etapa c) a separación, para proporcionar un sedimento y un extracto de levadura aclarado (CYE)

que contiene dichas microvesículas derivadas de levadura que portan TF que tienen actividad pro-coagulante; e) recoger dicho extracto de levadura aclarado (CYE) que contiene dichas microvesículas derivadas de levadura que portan TF que tienen actividad pro-coagulante; y, opcionalmente, f) si se desea, aislar o purificar dichas microvesículas derivadas de levadura que portan TF que tienen actividad pro-coagulante mediante procedimientos
 5 de separación por tamaño, y g) enriquecer las microvesículas obtenidas en fosfolípido con carga negativa (es decir, fosfatidilserina) mediante la incubación de los dos componentes, fosfatidilserina y microvesículas lipídicas que contienen TF. Como una etapa anterior a la incubación mencionada, la fosfatidilserina se podría preparar como vesículas multilamelares mediante otra suspensión de lípidos en una solución tamponada seguido de sonicación.

- 10 El método de producción del TF 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 del TF unida de forma operativa a un promotor funcional en una célula que puede ser de: hongo, levadura, planta o animal (tal como peces, reptiles, mamíferos, insectos, etc). El ADNc codificante de la proteína TF se puede amplificar mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) usando una biblioteca de ADNc como molde y los
 15 cebadores apropiados. El Ejemplo 1 describe la amplificación del ADNc que codifica la proteína del hTF maduro con 18 nucleótidos adicionales (que codifican seis histidinas) en el extremo 3'.

En otra realización, la proteína TF se podría purificar a partir de las etapas a) a d) mencionadas anteriormente, seguido de procedimientos de purificación por cromatografía bien establecidos. Una vez purificada, la proteína TF se
 20 podría lipidar *in vitro* con concentraciones óptimas de fosfolípido.

En una realización adicional, el TF lipidado se podría obtener de extractos de tejido animal, tales como tejido de cerebro, placenta y pulmón, y tejidos de diferentes animales tales como ovejas, vacas, conejos, perros, y seres humanos, entre otros. Preferiblemente, el TF lipidado es de ser humano. Más preferiblemente, el TF lipidado es
 25 recombinante humano.

En la presente invención, el término "trombina" (FIIa) se tiene que entender como la serina proteasa fundamental que desempeña un papel esencial en la hemostasia. La FIIa activa muchos de los factores de coagulación implicados en la cascada de coagulación que incluyen Fibrinógeno (FI), Factor V (FV), Factor VIII (FVIII), Factor XI
 30 (FXI), y Factor XIII (FXIII). El FIIa también activa plaquetas y células del endotelio vascular. El precursor de trombina es la Protrombina zimógena (FII), que es secretada a la sangre desde el hígado. Durante la cascada de coagulación, la FII se convierte en FIIa a diferentes velocidades primero por el FX activado (FXa), y en las últimas etapas de la cascada por el complejo de protrombinasa (FXa:FVa). La FIIa comercial se produce después del aislamiento de FII del plasma de origen humano o bovino. Después de su aislamiento, FII se transforma *in vitro* en FIIa. Todos los FS
 35 disponibles en el mercado en la actualidad contienen FIIa de origen humano o bovino. Además, también está disponible la FIIa recombinante humana altamente purificada. Esta FIIa recombinante humana se obtiene después de la purificación de FII humana de células recombinantes de Ovario de Hámster Chino (CHO), seguido de su procesamiento a FIIa mediante procedimientos *in vitro*.

40 Ejemplos de proteínas FII que se pueden usar en la presente invención incluyen FII humana (Versión 182 de UniProtKB/Swiss-Prot., noviembre de 2012, número de referencia P00734.), FII bovina (Versión 153 de UniProtKB/Swiss-Prot., noviembre de 2012, número de referencia P00735), FII de ratón (Versión 141 de UniProtKB/Swiss-Prot., noviembre de 2012, número de referencia P19221), FII de cerdo (Versión 37 de UniProtKB/Swiss-Prot., noviembre de 2012, número de referencia B3STX9), y proteínas FII de diferentes animales.
 45 Preferiblemente, la trombina es de origen humano o bovino, aunque más preferiblemente es trombina humana e incluso más preferiblemente trombina humana recombinante.

En el estado de la técnica está bien establecido que la concentración de trombina se proporcionan unidades por ml. Las unidades para expresar la cantidad de trombina pueden ser unidades "NIH" o unidades internacionales. En el
 50 estado de la técnica también está bien establecido cómo se tiene que realizar la conversión de las unidades expresadas en un sistema en el otro sistema:

1 unidad IOWA = 0,83 unidades NIH

1 IU = 1 unidad NIH

55 1 unidad NIH = 0,324 ± 0,073 mg

1 unidad NIH = 1 unidad USP

En una realización, cualquiera de las composiciones de la presente invención está presente en forma líquida. En esta realización, la composición se puede tener preparando soluciones separadas de trombina y solución de TF
 60 lipidado en concentraciones tales que, cuando se mezclan ambas soluciones, la composición resultante tiene trombina y TF en las concentraciones específicas mencionadas anteriormente. Como alternativa, la composición se puede obtener preparando una solución de trombina o TF lipidado, y el otro componente se añade en forma de polvo, con la condición de que la concentración final de cada uno de los componentes en la composición líquida

resultante, es la que se ha mencionado anteriormente. Se puede usar cualquier disolvente fisiológicamente aceptable. Algunos ejemplos ilustrativos no limitativos incluyen agua, tampón salino, tampón fosfato, o un fluido corporal, tal como sangre o líquido sinovial.

- 5 En otra realización, cualquiera de las composiciones de la invención se presenta en forma de polvo. En esta realización, la composición se puede obtener partiendo de una composición líquida (que se puede obtener como se ha descrito anteriormente) que ya tiene trombina y TF lipidado en las concentraciones específicas y, a continuación, se puede someter a técnicas de polvo bien conocidas, con la condición de que tales técnicas no influyan de forma adversa en la estabilidad de la trombina o TF. Algunos ejemplos ilustrativos no limitativos de técnicas de polvo se basan en técnicas de desecación, como por ejemplo liofilización, o secado por pulverización.

10 Como alternativa, la composición de polvo se puede obtener partiendo de trombina y TF lipidado en forma de polvo. En esta realización, el experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad de cada uno de los componentes necesarios para obtener una composición con cada uno de los componentes a las concentraciones especificadas.

15 En otra realización, cualquiera de las composiciones de la invención se presenta en forma de una espuma sólida. Estas espumas sólidas se pueden obtener a partir de una composición líquida (que se puede obtener como se ha desvelado anteriormente) mediante técnicas de secado por pulverización.

20 En otra realización, cualquiera de las composiciones de la invención se presenta en forma semisólida. Para obtener tal forma, se necesitan excipientes y vehículos apropiados. A continuación se proporcionan excipientes y vehículos útiles para obtener tales composiciones semisólidas.

- 25 En una realización del primer aspecto de la invención, la composición comprende adicionalmente un agente de reticulación.

En otra realización del primer aspecto de la invención, la composición comprende adicionalmente un inhibidor de la fibrinólisis.

30 Además, en otra realización del primer aspecto de la invención, la composición comprende adicionalmente CaCl_2 .

En una realización más del primer aspecto de la invención, la composición comprende adicionalmente un agente de reticulación, y un inhibidor de la fibrinólisis.

35 En una realización más del primer aspecto de la invención, la composición comprende adicionalmente un agente de reticulación, y CaCl_2 .

En una realización más del primer aspecto de la invención, la composición comprende adicionalmente un inhibidor de la fibrinólisis, y CaCl_2 .

40 En una realización más del primer aspecto de la invención, la composición comprende adicionalmente un agente de reticulación, inhibidor de la fibrinólisis, y CaCl_2 .

- 45 Preferiblemente, dicho agente de reticulación es FXIII o FXIIIa activado.

Preferiblemente, dicho inhibidor de la fibrinólisis se selecciona entre aprotinina, ácido tranexámico, y ácido aminocaproico.

50 Como se ha mencionado anteriormente, en un aspecto adicional la presente invención proporciona una composición farmacéutica o veterinaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición del primer aspecto de la invención, junto con excipientes y/o portadores apropiados aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.

55 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de la composición que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo de, o aliviar hasta cierto punto, uno o más de los síntomas de la enfermedad a la que se dirige. La dosis en particular de la composición administrada de acuerdo con la presente invención se determinará, por supuesto, de acuerdo con las circunstancias en particular que rodean el caso, que incluyen el compuesto administrado, la vía de administración, la afección en particular que se está tratando, y las consideraciones similares.

60 En el estado de la técnica se conocen bien algunos procesos para la preparación de tales composiciones farmacéuticas o veterinarias.

La composición farmacéutica o veterinaria de la invención se debería aplicar por vía tópica al sitio de sangrado, directamente o en un material portador, tal como una gasa. Ejemplos de aplicación tópica incluyen, pero no se limitan a, aplicación tópica externa, cutánea, intranasal, intravesicular, intravaginal, bucal, rectal, oftálmica, endoscópica, e instilación.

5

La composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención puede adquirir la forma de gel blando o duro, líquido, loción, crema, pomadas, pastas, formulaciones en roll-on, pulverizaciones, aerosoles, espumas, formulaciones aplicadas en capas y formulaciones formadoras de película.

10 Para la administración tópica, algunos excipientes o portadores farmacéuticos apropiados incluyen, pero no se limitan a, agentes hidratantes, emolientes, agentes emulgentes, humectantes, agentes reguladores de pH, antioxidantes, agentes conservantes, vehículos, o mezclas de los mismos. Los excipientes o portadores usados tienen afinidad por la piel, se toleran bien, son estables y se usan en una cantidad adecuada para proporcionar la consistencia, y la facilidad de aplicación deseadas.

15

Cuando la composición farmacéutica o veterinaria de la presente invención es tópica, se puede formular en varias formas que incluyen, pero no se limitan a, soluciones, lociones, geles, pomadas, pastas, cremas, de gel blando o duro, líquidas, espumas, formulaciones en roll-on, pulverizaciones, aerosoles, formulaciones aplicadas en capas y formulaciones formadoras de películas. Estas composiciones farmacéuticas tópicas se pueden preparar de acuerdo

20 con métodos bien conocidos en el estado de la técnica. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente los excipientes y/o portadores farmacéuticos apropiados, y sus cantidades, de acuerdo con el tipo de formulación que se está preparando.

En una realización de la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención, la composición

25 comprende un agente de reticulación.

En otra realización de la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención, la composición comprende adicionalmente un inhibidor de la fibrinólisis.

30 Además, en otra realización de la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención, la composición comprende adicionalmente CaCl_2 .

En una realización más de la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención, la composición comprende adicionalmente un agente de reticulación y un inhibidor de la fibrinólisis.

35

En una realización más de la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención, la composición hemostática comprende adicionalmente un agente de reticulación y CaCl_2 .

En una realización más de la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención, la

40 composición comprende adicionalmente un inhibidor de la fibrinólisis y CaCl_2 .

En una realización más de la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención, la composición comprende adicionalmente un agente de reticulación, inhibidor de la fibrinólisis y CaCl_2 .

45 Preferiblemente, dicho agente de reticulación es FXIII.

Preferiblemente, dicho inhibidor de la fibrinólisis se selecciona entre aprotinina, ácido tranexámico, y ácido aminocaproico.

50 Las composiciones de la invención, se pueden usar adyuvante para la hemostasia en pacientes que se someten a cirugía cuando se controla el sangrado mediante técnicas quirúrgicas convencionales (tal como sutura, ligadura, y cauterización), así como adyuvante en técnicas quirúrgicas convencionales (tales como sutura y ligadura) para evitar pérdidas.

55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones hemostáticas que comprenden la composición del primer aspecto de la invención o la composición farmacéutica o veterinaria del segundo aspecto de la invención, y un material portador.

En la presente invención, el término "hemostático" referido a composiciones, efecto y uso, se ha de entender como

60 una sustancia que promueve la hemostasia, es decir, que detiene el sangrado. También se puede denominar "antihemorrágico" y "procoagulante".

La expresión "material portador" se tiene que entender como un sustrato de un material adecuado que permite depositar la composición de la invención en el mismo, su transporte y su administración en el sitio deseado, por ejemplo, en el sitio en el que las composiciones de la invención tienen que ejercer su efecto terapéutico. Dicho material portador puede ser un soporte sólido. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de soportes sólidos incluyen
5 apósitos, tiritas, compresas, parches, etc. Algunos ejemplos ilustrativos, no limitativos de soportes líquidos incluyen geles, pulverizaciones, enjuagues bucales, etc. La interacción entre los componentes de la composición y el material sólido puede ser una interacción física o química.

En una realización, el material portador es un soporte sólido hecho de colágeno, gelatina o celulosa regenerada
10 oxidada.

En otra realización, el material portador es un dispositivo para la administración de un polvo.

En una realización, la composición del primer aspecto se aplica en el material portador en forma líquida, es decir, el
15 soporte está impregnado con la composición de la presente invención.

En otra realización de la composición hemostática del tercer aspecto de la invención, la composición hemostática comprende un agente de reticulación.

20 En otra realización de la composición hemostática del tercer aspecto de la invención, la composición hemostática comprende adicionalmente un inhibidor de la fibrinólisis.

En todavía otra realización de la composición hemostática del tercer aspecto de la invención, la composición hemostática comprende adicionalmente CaCl_2 .

25 En una realización más de la composición hemostática del tercer aspecto de la invención, la composición hemostática comprende adicionalmente un agente de reticulación y un inhibidor de la fibrinólisis.

En una realización más de la composición hemostática del tercer aspecto de la invención, la composición
30 hemostática comprende adicionalmente un agente de reticulación y CaCl_2 .

En una realización más de la composición hemostática del tercer aspecto de la invención, la composición hemostática comprende adicionalmente un inhibidor de la fibrinólisis y CaCl_2 .

35 En una realización más de la composición hemostática del tercer aspecto de la invención, la composición hemostática comprende adicionalmente un agente de reticulación, un inhibidor de la fibrinólisis y CaCl_2 .

Preferiblemente, dicho agente de reticulación es FXIII.

40 Preferiblemente, dicho inhibidor de la fibrinólisis se selecciona de aprotinina, ácido tranexámico, y ácido aminocaproico.

Debido a las propiedades indicadas anteriormente en detalle, las composiciones de la invención se pueden usar como agente de curación de heridas.

45 La expresión "curación de heridas" se refiere a un proceso complejo en el que la piel (o algún otro órgano) se repara a sí misma después de la curación de heridas por lesiones de cualquier tipo y en cualquier sitio. Se puede tratar de una curación de heridas normal y alterada. Esta última se encuentra en particular en el caso de enfermedades, tales como diabetes mellitus, vasculitis, enfermedad oclusiva arterial, úlcera venosa crónica y/o infectada así como úlcera
50 gástrica de mala curación. La curación de heridas alterada también se encuentra en el caso de alteración de inervaciones tales como paraplejía, lepra, neuropatía, etc., y gangrena por decúbito de personas con necesidad de cuidados. La curación de heridas alterada también se puede producir si se producen suturas débiles y la curación alterada después de operaciones, en particularmente de los intestinos y trasplantes de piel y otros órganos, respectivamente.

55 La curación de heridas alterada también se encuentra en el caso de fracturas de huesos, quemaduras, y tratamientos con esteroides.

Tal y como se usa en el presente documento, el término "herida" incluye una lesión en cualquier tejido, que incluye
60 por ejemplo, retraso o dificultad para la curación de heridas, y heridas crónicas. Ejemplos de heridas pueden incluir heridas tanto abiertas, cerradas. El término "herida" también puede incluir por ejemplo, lesiones en la piel y tejido subcutáneo iniciadas de diferentes formas (por ejemplo, úlceras de presión por reposo en cama prolongado y heridas inducidas por traumatismo) y con características variables. Las heridas se pueden clasificar en uno de los

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 a la dermis; iii) heridas de Grado III que se extienden al tejido subcutáneo; y iv) heridas de Grado IV (o heridas de espesor completo) en las que quedan expuestos los huesos (por ejemplo, un punto de presión ósea tal como el trocánter mayor o el sacro).

5

La expresión "herida crónica" se refiere por lo general a una herida que no se ha curado. Las heridas crónicas incluyen úlceras venosas, úlceras por estasis venosa, úlceras arteriales, úlceras por presión, úlceras diabéticas, úlceras del pie diabético, úlceras vasculíticas, úlceras de decúbito, úlceras por quemadura, úlceras inducidas por traumatismo, úlceras infecciosas, úlceras mixtas, y pioderma gangrenoso.

10

Las composiciones de la invención también se pueden usar en el tratamiento de hemorragias. Preferiblemente, las composiciones de la presente invención se aplican por vía tópica. Tales hemorragias se pueden deber a coagulopatías, lesiones, heridas, o trastornos plaquetarios, entre otros.

15 Como se muestra a continuación, las composiciones de la invención actúan como agente antihemorrágico, y, en consecuencia, se pueden usar para tratar o para corregir trastornos hemorrágicos, en particular los trastornos hemorrágicos asociados con diátesis hemorrágica.

El término "diátesis hemorrágica" se refiere al proceso que causa un trastorno hemostático y que, como resultado, da lugar a la aparición de un síndrome hemorrágico que se puede producir ocasionalmente con sangrado prolongado y excesivo.

El término "coagulopatía" se refiere a un trastorno del factor de coagulación. Este trastorno se puede deber a una deficiencia o déficit de un factor de coagulación específico, cuya consecuencia será la aparición de un síndrome hemorrágico, o se puede deber a un trastorno de un factor de coagulación. La coagulopatía generalmente puede ser una coagulopatía congénita o una coagulopatía adquirida. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de coagulopatías congénitas, se pueden mencionar deficiencias de factores de coagulación seleccionados de Factor de coagulación V (FV), Factor de coagulación VII (FVII), Factor de coagulación VIII (FVIII), cuyo déficit o deficiencia causa la hemofilia A, Factor de coagulación IX (FIX) cuyo déficit o deficiencia causa la hemofilia B, Factor de coagulación X (FX), Factor de coagulación XI (FXI) cuyo déficit o deficiencia causa la 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 deficiencias en la síntesis de un factor de coagulación en insuficiencia hepática grave, terapia con anticoagulantes (tales 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 con sangrado. Este mecanismo se produce en el síndrome de coagulación intravascular diseminada o coagulopatía de consumo que se produce en múltiples enfermedades tales como sepsis grave que daña la microcirculación de endotelio que activa las plaquetas y factores de coagulación con la formación de múltiples microtrombos; en invasión sanguínea por el TF tal como liberación de placenta; en la retención de un feto muerto; en múltiples traumatismos con el aplastamiento de tejidos; en mordeduras de serpiente venenosa, etc. En la vasculitis, el daño parietal y endotelial libera activadores de la coagulación. El consumo de factores de coagulación se ve agravado por la lisis de la fibrina de numerosos microtrombos debido a la acción de plasminas, que son agentes antiplaquetarios y anticoagulantes.

La expresión "trastorno plaquetario" se refiere a un trastorno tanto en el número como en la capacidad funcional de las plaquetas, cuyo resultado es la aparición de un síndrome hemorrágico. Dicho trastorno plaquetario puede ser congénito o adquirido. En una realización en particular, dicho trastorno plaquetario es un trastorno plaquetario congénito. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de trastornos plaquetarios congénitos incluyen la enfermedad de Glanzmann, la enfermedad de Bernard Soulier, el síndrome de Bolin-Jamieson, el síndrome de Wiskott-Aldrich, el síndrome de Paris-Trousseau-Jacobsen, la trombocitopenia del cromosoma X, el síndrome de plaquetas grises, el síndrome de Sebastian y la anemia de Fanconi. En otra realización en particular, dicho trastorno plaquetario es un trastorno plaquetario adquirido. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de trastornos plaquetarios adquiridos incluyen trastornos mieloproliferativos, tales como la trombocitemia, la policitemia, la leucemia mielocítica crónica, etc.; existen trastornos plaquetarios funcionales en la metaplasia mieloide con aumento del tiempo de sangrado, defectos de retención de perlas de vidrio, defecto de agregación plaquetaria, liberación anómala, y defecto del factor III plaquetario. Se han encontrado defectos plaquetarios funcionales en disproteinemias en escorbuto y en enfermedad cardíaca congénita y cirrosis.

En una realización del séptimo aspecto de la invención, se proporcionan las composiciones como se han definido anteriormente para su uso en el tratamiento tópico de hemorragias mediante su aplicación al sitio de la lesión.

60

El término "sujeto" como se usa en el presente documento incluye cualquier miembro de una especie animal, que incluye la especie humana; a modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo dicho sujeto puede ser un mamífero, tal como un primate, un animal doméstico, un roedor, etc. Dicho sujeto es preferiblemente un hombre o una mujer de

cualquier edad y raza. En una realización en particular, dicho sujeto es un ser humano sin historia de trastornos de hemostasia, tal como un individuo que no presenta coagulopatías o trastornos plaquetarios. En otra realización en particular, dicho sujeto es un ser humano que tiene una historia de trastornos de hemostasia, tal como un individuo que presenta diatesis hemorrágica, por ejemplo, una coagulopatía, tal como una coagulopatía congénita o adquirida, o un trastorno plaquetario, tal como un trastorno plaquetario congénito o adquirido.

Dado que el TF es una molécula pro-angiogénica bien conocida, las composiciones de la invención también se pueden usar en el tratamiento de una enfermedad asociada con una angiogénesis deficiente.

10 La expresión "enfermedad asociada con angiogénesis deficiente", como se usa en el presente documento, se refiere a enfermedades que se pueden curar mediante la activación de formación de vasos. La expresión "formación de vasos" se refiere a una formación de vasos de cualquier tipo y en cualquier sitio. La promoción de la formación de vasos puede ser útil en una serie de afecciones clínicas. Por ejemplo, la composición de la invención se puede usar para estimular la angiogénesis de la vasculatura colateral en tejido de miocardio durante o después de una enfermedad isquémica, infarto de miocardio o después de revascularización quirúrgica coronaria. Otras enfermedades o afecciones que se pueden tratar mediante el suministro de las composiciones de la invención incluyen enfermedad vascular y/o enfermedad sistémica que causa patología del sistema nervioso periférico o central. Tales afecciones/enfermedades pueden incluir accidentes cerebrovasculares, por ejemplo causados por oclusiones por coágulos o por rotura de aneurismas, o una isquemia general/localizada que causa muerte neuronal o alteración funcional periférica tal como en funciones motoras o sensoriales o alteración del habla, cardiomiopatía isquémica, o enfermedad arterial periférica, tal como claudicación crónica por isquemia de las extremidades (músculo esquelético), dolor en reposo/ulceración isquémica/gangrena. Además, la promoción de la formación de vasos es adecuada para la sustitución por ejemplo, de vasos sanguíneos viejos y alterados. Pueden estar presentes, por ejemplo, en el cerebro o el corazón, de modo que una apoplejía o infarto se puede evitar o tratar. También se pueden tomar precauciones contra la presbifrenia. Además, se refiere a una formación de vasos para tratar arteriosclerosis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, retinopatía diabética y trombosis venosa profunda de las piernas/ulcus cruris así como la prevención de recaídas.

Por último, en un aspecto adicional la presente invención proporciona kits que comprenden las composiciones del primer o de segundo aspecto de la invención junto con un aplicador.

El kit puede tomar la forma de (a) dos partes, de tal manera que cada parte contiene cada uno de los componentes que forman la combinación, es decir, una parte del kit contiene la trombina, y la otra contiene el factor tisular lipidado; o, como alternativa, (b) como una parte, de tal modo que tanto la trombina como el TF lipidado comparten una sola parte.

Por lo tanto, en una realización, el kit comprende: a) una primera parte que comprende trombina; b) una segunda parte que comprende el factor tisular lipidado; y c) un aplicador para aplicar de forma simultánea todos los componentes incluidos en el kit.

En otra realización, el kit comprende: a) una primera parte que comprende trombina y factor tisular lipidado; y b) un aplicador para aplicar de forma simultánea todos los componentes incluidos en el kit.

La trombina, y el factor tisular lipidado contenidos en el kit pueden estar en cualquier forma adecuada, tal como en solución, suspensión, o polvo, con la condición de que se encuentran en las concentraciones de 1-30 IU/g de composición y 5-150 ng/g de composición, respectivamente, junto con los excipientes y/o portadores adecuados aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.

Además, el kit puede incluir instrucciones para su uso en cualquiera de las aplicaciones que se han mencionado anteriormente.

En una realización, el kit comprende adicionalmente un agente de reticulación.

En otra realización, el kit comprende adicionalmente un inhibidor de la fibrinólisis.

Además, en otra realización, el kit comprende adicionalmente CaCl_2 .

En una realización más, el kit comprende adicionalmente un agente de reticulación y un inhibidor de la fibrinólisis.

En una realización más, el kit comprende un agente de reticulación y CaCl_2 .

En una realización más, el kit comprende un inhibidor de la fibrinólisis y CaCl_2 .

En una realización más, el kit comprende un agente de reticulación, un inhibidor de la fibrinólisis y CaCl_2 .

Preferiblemente, dicho agente de reticulación es FXIII.

- 5 Preferiblemente, dicho inhibidor de la fibrinólisis se selecciona de aprotinina, ácido tranexámico, y ácido aminocaproico.

10 El agente de reticulación, el inhibidor de la fibrinólisis, y/o CaCl_2 pueden estar incluidos en cualquiera de las partes identificadas anteriormente para trombina, y factor tisular lipidado, o como alternativa, cada uno puede estar en una parte adicional separada o pueden estar compartiendo la misma parte del kit.

15 Cualquier componente adicional se puede incluir en el kit con la condición de que no influya de manera negativa en el perfil hemostático de la composición incluida en el mismo. Tales componentes adicionales se pueden incluir en cualquiera de las partes identificadas anteriormente para trombina y factor tisular lipidado. Como alternativa, cada uno de los "componentes adicionales" del kit pueden estar en partes adicionales separadas.

20 Algunos ejemplos ilustrativos no limitativos de aplicadores que permiten la aplicación de forma simultánea de todos los componentes incluidos en el kit son jeringas de cilindro, aplicadores de pulverización, una almohadilla, o un dispositivo para dosificar los componentes cuando se encuentran en forma de polvo, entre otros.

Un ejemplo de dispositivo de dosificación de polvo es el que se describe en el documento de patente WO2010/07033.

25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra "comprende" incluye el caso "consiste en". Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

30 EJEMPLOS

35 Ejemplo 1: Producción del factor tisular recombinante basándose en la expresión en levadura de la proteína TF de longitud completa modificada con etiqueta de His (en lo sucesivo en el presente documento también denominado "TT-173")

40 El vector episomal de levadura PTT-10301 descrito en el Ejemplo 1 del documento de patente WO2008080989 que comprende el gen URA3, el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación 2μ de levadura, el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y la señal de terminación de la transcripción de la fosfoglicerato quinasa de levadura, se usó para clonar, bajo el control del promotor GPD, un ADNc de la SEC ID N°: 6 que codifica la proteína del hTF maduro (aa 33-295 de la SEC ID N°: 1) con la etiqueta de His en el extremo 3' y una mutación Asn124Ala que inactiva uno de los sitios potenciales de N-glicosilación en la secuencia de hTF nativo (SEC ID N°: 5).

45 La SEC ID N°: 6 se obtuvo como sigue a continuación. La secuencia del ADNc humano del TF (número de referencia en Genbank BC011029, SEC ID N°: 11) se amplificó usando los cebadores de secuencias SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8. La secuencia de ADN amplificado resultante se modificó adicionalmente mediante mutagénesis dirigida a sitio, usando cebadores de las secuencias SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10. Para esto, se usó el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick Change (Stratagene), siguiendo el método que se describe en los manuales de
50 Stratagene. Con tal última mutagénesis, se generó la secuencia del TF que contenía la mutación puntual de Asn a Ala en el residuo aminoacídico 124 de la secuencia de la proteína TF.

Después de la transformación, se recogieron las cepas de levadura capaces de crecer en medios libres de uracilo y fueron analizadas por su capacidad para expresar el hTF mediante análisis de transferencia Western de los
55 extractos de levadura, básicamente como se describe en el documento de patente WO2008080989. Brevemente, levaduras, que contienen el plásmido de expresión episomal con una versión modificada del gen que codifica el TF (SEC ID N°: 6), se cultivan en un fermentador, y las células resultantes se recogen por centrifugación. Las células recogidas se vuelven a suspender en un tampón de lisis apropiado (fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4), y se someten a lisis de alta presión pasando tres veces a través de un homogeneizador a 1000 bares de presión para
60 obtener el lisado de fermentación (homogenado de fermentación). La suspensión celular se mantiene fría sumergiendo el recipiente en un baño de hielo. Después de esto, el material más pesado se elimina del lisado de fermentación mediante centrifugación, obteniendo de este modo un sobrenadante de extracto de levadura aclarado (CYE). El CYE obtenido a partir de la etapa de homogeneización se diluye con tampón de lisis hasta que el

contenido de proteína total alcanza una concentración entre 5-6 mg/ml, y se filtra a través de filtros consecutivos de 0,45 µm, 0,2 µm, y 0,1 µm respectivamente para reducir la cantidad de proteínas derivadas de células hospedadoras que no están en la membrana (HCP) y para obtener un material más homogéneo en las vesículas del rTF.

- 5 Las vesículas en la fracción retenida del microfiltrado de 0,1 µm tienen diámetros inferiores a 0,2 µm. Para eliminar las trazas de ADN, la fracción retenida del microfiltrado de 0,1 µm se trata a continuación con 10 U/ml de la endonucleasa Benzonasa (Merck) y cloruro de magnesio hasta una concentración final de 1 mM, se incuba durante 12 h a 4 °C en un recipiente de vidrio centrifugando a aproximadamente 20 rpm, y se usa para etapas adicionales de enriquecimiento.

10

Para fraccionar adicionalmente diferentes subpoblaciones de vesículas de acuerdo con su tamaño, y para retirar material celular residual no deseado, el extracto de levadura aclarado con filtro se aplica a una columna Sephacril de cromatografía por exclusión de tamaño. Después de la separación, se combinan fracciones de 2 a 22, que corresponden a vesículas enriquecidas en rTF, y se esterilizan con filtro. Después de eso, se añade fosfatidilserina

15

(PS) a una concentración final de 0,1 mg/ml al producto esterilizado y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 2 h para permitir la incorporación de PS en las vesículas. Como una etapa anterior, la PS se podría preparar como vesículas multilamelares por resuspensión de lípidos en una solución tamponada seguido de sonicación, siguiendo el Protocolo de Laboratorio de Morrissey para la Preparación de Vesículas de

Fosfolípido (SUV) por sonicación. Brevemente: (1) Poner 2,6 µmoles de fosfolípidos totales (PL) en un tubo de

20 ensayo de vidrio (un tubo de 13 x 100 mm tiene un tamaño conveniente); (2) En la campana extractora, secar la mezcla de PL con una corriente suave de nitrógeno o argón. Cuando se seca, se hace vacío con velocidad durante un período adicional de 60 minutos a alto vacío. (Esto se realiza para retirar cualquier residuo de cloroformo.); (3) A los PL secos, añadir 2,6 ml de solución de HBS a temperatura ambiente y cubrir el extremo del tubo con parafilm.

Dejar reposar 1 h a temperatura ambiente; (4) Agitación vorticial del tubo de forma vigorosa para completar la nueva

25 suspensión del PL. El resultado debería ser una suspensión lechosa uniforme; (5) Llenar el baño del sonicador con agua a temperatura ambiente. Usando un soporte de anillo y una abrazadera para tubo de ensayo, suspender el tubo que contiene la suspensión de PL en el baño. El nivel de líquido dentro del tubo debería ser igual al de fuera del tubo. Sonicar hasta que la suspensión cambia de un aspecto lechoso a casi transparente (es decir, solamente una turbidez muy ligera). Comprobar cada 10 min; normalmente se necesitará un tiempo total de sonicación entre 10 y

30 30 min. (Asegurarse de no dejar que el baño se sobrecaliente, y no vaciar el baño hasta que se haya enfriado completamente.); y (6) Almacenar el producto final a 4 grados C. El resultado es una suspensión de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) que contienen un total de fosfolípido 1 mM en HBS.

Después de 2 h de incubación, se toman alícuotas del producto estéril, que contiene vesículas enriquecidas en PS, y

35 se liofiliza. Este material liofilizado corresponde al rTF usado en los ensayos que siguen a continuación y consiste en una proteína de la SEC ID N°: 5 anclada a una vesícula lipídica altamente enriquecida en PS.

Ejemplo 2: Efecto de la adición de TF sobre trombina en sangre completa

- 40 Para estos experimentos, se usaron muestras de sangre tratadas con citrato sódico de tres individuos sanos. Antes de empezar los experimentos, se prepararon soluciones de trombina y TF lipídado. Para esto, un vial que contenía 1000 unidades NIH de trombina bovina liofilizada (Ref. T4648 SIGMA) se volvió a suspender en 1 ml de tampón de Fosfato (Fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4). En paralelo, TT-173 liofilizado que contenía 1 µg de TF lipídado también se reconstituyó en 1 ml de tampón de Fosfato. A partir de estas dos soluciones stock, se prepararon

45

soluciones de trabajo que contenían:

i) productos de ensayo individuales: trombina (1000, 300, 30, 3, y 1 IU/ml) y o TF lipídado (150, 15, y 5 ng/ml), y

ii) una combinación de trombina (IU) + TF lipídado (ng) por mililitro, en las siguientes proporciones: 1 + 5, 1 + 15, 1 + 150, 3 + 5, 3 + 15, 3 + 150, 30 + 5, 30 + 15 y 30 + 150.

50

Para cada una de las soluciones preparadas, se encontró que cualquiera de los productos de ensayo individuales, o las combinaciones, que un ml pesaba 1 gramo. Por lo tanto, las concentraciones indicadas anteriormente para: trombina, TF lipídado o las proporciones diferentes de trombina + TF lipídado, se podrían expresar también por

55 gramo de solución (en el caso de trombina o TF lipídado solos) o por gramo de composición (en el caso de combinaciones de trombina + TF lipídado).

Una vez preparadas, se colocaron 20 µl de las soluciones mencionadas anteriormente independientemente en la copa de muestra de ensayo de un aparato de tromboelastografía (TEG), seguido de la adición de 20 µl de cloruro cálcico. A continuación, se transfirieron 300 µl de sangre a la copa del TEG y se controló el parámetro del tiempo de coagulación (en lo sucesivo en el presente documento también denominado "parámetro del CT") por TEG. Por último, se registró el tiempo de CT para cada concentración de muestra de ensayo (trombina, TF lipídado o la combinación). Los resultados se resumen en las Tablas 1-2:

60

Tabla 1: CT cuando se usa solamente trombina

Cantidad de trombina	CT en segundos
1 IU/ gramo de Trombina	735 ± 21,2
3 IU/ gramo de Trombina	506 ± 38,2
30 IU/ gramo de Trombina	127,5 ± 40,3
300 IU/gramo de Trombina	84,7 ± 20,1

5 Tabla 2: CT cuando se usan composiciones de trombina + TF lipiado

Combinaciones de Trombina + TF Lipiado (proporciones expresadas por gramo de composición)		CT en segundos
Trombina (IU)	TF Lipiado (ng)	
0	0	955,5 ± 119,5
1	5	157,5 ± 0,7
1	15	136 ± 11,3
1	150	89 ± 5,6
3	5	160 ± 1,4
3	15	125 ± 4,2
3	150	85 ± 9,8
30	5	105,5 ± 3,5
30	15	107,5 ± 14,8
30	150	87 ± 21,2

Como se esperaba, la adición de trombina exógena a la sangre en concentraciones de 1, 3, 30 IU unidades/g de combinación reduce de forma significativa el valor de CT de una manera dependiente de la dosis (véase la Tabla 1).

10

El siguiente paso fue determinar el efecto que ejercía la combinación de TF lipiado en las concentraciones de FIIa a ensayo (1, 3 y 30 U/ml). De forma sorprendente, la adición de cantidades mínimas de TF lipiado (5 ng/ml) a FIIa indujo una reducción notable en el tiempo de CT. Como se muestra en la Tabla 2, una combinación de 5 ng de TF lipiado con 1, 3, o 30 IU de trombina induce un tiempo de CT similar al obtenido con 300 U/ml de trombina solamente.

15

Estos resultados se confirmaron cuando se usó un rTF lipiado disponible en el mercado (American Diagnostica ref. 4500L) en lugar de TT-173 en experimentos similares. En estos estudios, solamente se sometió a ensayo una sola concentración del rTF lipiado. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

20

Tabla 3

Combinaciones de Trombina + TF Lipiado (proporciones expresadas por gramo de composición)		CT en segundos
Trombina (IU)	TF Lipiado (ng)	
0	0	955,5 ± 119,5
3	5	159 ± 18,5
3	15	128 ± 16
3	150	93 ± 11,4

A partir de estos resultados, se puede concluir que una composición que comprende 1-30 IU de trombina y 5-150 ng de TF lipiado, por gramo de composición, da como resultado un efecto de coagulación sinérgico.

25

Ejemplo 3. Efecto *in vivo* de la combinación de rTF lipiado más trombina

Con el fin de demostrar que la combinación de rTF lipiado más trombina en ciertas proporciones de concentración inducía un efecto sinérgico sustancial, se realizaron los siguientes estudios en un modelo porcino hepático convencional.

30

Para esto, un cerdo que pesaba 30-40 Kg mantenido en instalaciones apropiadas siguiendo el reglamento convencional de la UE para estudios con animales, se anestesió con inyección intramuscular de una combinación de clorhidrato de xilacina (1,1 mg/Kg) y clorhidrato de ketamina (15 mg/Kg), y se mantuvo con inhalación de isoflurano de oxígeno durante todo el estudio. El cerdo se puso en una posición de decúbito dorsal. Se rasuró la piel y se preparó para cirugía aséptica. Para lesiones hepáticas, se realizó una incisión laparotómica en la línea media

35

superior a través de la piel. El hígado se expuso, y una sonda con extremo afilado con un diámetro de 8 mm se insertó 2 cm en el lóbulo izquierdo. Inmediatamente después, el producto del ensayo hemostático se aplicó sobre la herida, y el intervalo de tiempo necesario para la hemostasia se registró con la ayuda de un cronómetro. Después de eso, se realizó una incisión similar 3 cm más allá, y se sometió al ensayo el efecto hemostático de un nuevo producto de ensayo. Los productos de ensayo sometidos a ensayo fueron:

- 1.- Una almohadilla de colágeno disponible en el mercado (Curaspon) de 5 cm² empapada en 1 ml de solución salina
- 2.- Una almohadilla de colágeno disponible en el mercado (Curaspon) de 5 cm² empapada en 1 ml de tampón de fosfato que contenía 80 ng de rTF lipidado (TT-173)
- 3.- Una almohadilla de colágeno disponible en el mercado (Curaspon) de 5 cm² empapada en 1 ml de tampón de fosfato que contenía 8 ng de rTF lipidado (TT-173)
- 4.- Una almohadilla de colágeno disponible en el mercado (Curaspon) de 5 cm² empapada en 1 ml de tampón de fosfato que contenía 200 IU de Trombina (SIGMA)
- 5.- Una almohadilla de colágeno disponible en el mercado (Curaspon) de 5 cm² empapada en 1 ml de tampón de fosfato que contenía 20 IU de Trombina (SIGMA)
- 6.- Una almohadilla de colágeno disponible en el mercado (Curaspon) de 5 cm² empapada en 1 ml de tampón de fosfato que contenía 20 IU de Trombina (SIGMA) más 8 ng de rTF (TT-173).

Para cada una de las soluciones preparadas, se encontró que cualquiera de los productos de ensayo individuales, o las combinaciones, que un ml pesaba 1 gramo. Por lo tanto, las concentraciones mencionadas anteriormente para: trombina, TF lipidado o las diferentes proporciones de trombina + TF lipidado, se podían expresar también por gramo de solución (en el caso de trombina o TF lipidado solos) o por gramo de composición (en el caso de las combinaciones de trombina + TF lipidado).

Cada producto de ensayo se sometió a ensayo de tres a seis veces. Las medias de los tiempos observados para la hemostasia para cada uno de los productos de ensayo se muestran en la FIG. 1. Al final del estudio, el animal se sacrificó mediante inyección intravenosa de pentotal.

Como se muestra en la figura, el tratamiento de heridas con una almohadilla de colágeno disponible en el mercado empapada en solución salina daba como resultado un tiempo para la hemostasia de aproximadamente 260 s (barra 1). Sin embargo, cuando las heridas se trataron independientemente con almohadillas de colágeno disponibles en el mercado empapadas en dos dosis (80 o 8 ng/ml de rTF) de rTF solo (barras 2 y 3), o en dos dosis (de 200 o 20 IU/ml) de Trombina sola (barras 4 y 5) se producía una reducción evidente en el tiempo de coagulación de una manera dependiente de la dosis. Por lo tanto, el tratamiento con 80 ng de rTF/ml dio como resultado una reducción del tiempo de coagulación de 260 s a 50 s (comparar las barras 1 y 2). Como se esperaba, la reducción de 10 veces en la concentración de rTF dio como resultado un aumento del tiempo de coagulación de 50 a 170 s (comparar las barras 2 y 3). De forma análoga, el efecto hemostático observado con 200 IU/ml de Trombina (80 s, barra 4) se vio drásticamente reducido cuando la dosis de Trombina se redujo 10 veces (230 s, barra 5).

De forma sorprendente, la combinación de la dosis más baja de rTF (8 ng/ml) con la dosis más baja de Trombina (20 IU/ml) dio como resultado un efecto sinérgico, que indujo una reducción sustancial en el tiempo de coagulación en comparación con la aplicación de concentraciones similares de rTF solo (de 170 a 90 s, comparar la barra 3 con lavar 6), o Trombina sola (de 240 a 90 s, comparar la barra 5 con la barra 6). Estos resultados confirman *in vivo* que una composición que comprende ciertas proporciones de concentraciones de Trombina y rTF lipidado da como resultado un efecto hemostático sinérgico.

REFERENCIAS MENCIONADAS EN LA SOLICITUD

Documento de patente WO2008/080989;
 Documento de patente WO2010/07033;
 Documento de patente WO2011/131658; y
 Mimms LT, Zampighi G, Nozaki Y, Tanford C, Reynolds JA. Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside. *Biochemistry*. 17 de febrero de 1981; 20 (4): 833-40.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Thrombotargets Europe SL

<120> Composiciones Hemostáticas

<130> P2553EP00

ES 2 626 806 T3

<150> EP 13152475.3

<151> 2013-01-24

<160> 11

5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 263

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

15

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

20

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

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

25

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

30

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

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

35

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

40

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

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

45

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

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu

50

55

60

ES 2 626 806 T3

165 170 175

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

5

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

10

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

15

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

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

20

Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser
 260

<210> 2
 <211> 6
 <212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> epítopo AHGHRP

30 <400> 2

Ala His Gly His Arg Pro
 1 5

35

<210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> epítopo

<400> 3

45

Pro Ile His Asp His Asp His Pro His Leu Val Ile His Ser
 1 5 10

50 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> epítopo donde Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

60 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

ES 2 626 806 T3

<400> 4

Gly Met Thr Cys Xaa Xaa Cys
 1 5

5

<210> 5

<211> 269

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TF humana madura con una mutación N124A y una hexahistidina C-terminal

15 <400> 5

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

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

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

30 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
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu

55

60

ES 2 626 806 T3

	165		170		175
	Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val				
	180		185		190
5	Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu				
	195		200		205
10	Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile				
	210		215		220
	Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile				
	225		230		235
15	Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu				
	245		250		255
20	Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser His His His His His His				
	260		265		

<210> 6

<211> 813

<212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DNA que codifica la TF humana madura con N124A y hexahistidina C-terminal

30 <400> 6

	atgtcaggca ctacaaatac tgtggcagca tataatttaa cttggaaatc aactaatttc	60
35	aagacaattt tggagtggga acccaaaccc gtcaatcaag tctacactgt tcaaataagc	120
	actaagtcag gagattggaa aagcaaatgc ttttacacaa cagacacaga gtgtgacctc	180
	accgacgaga ttgtgaagga tgtgaagcag acgtacttgg cacgggtctt ctctaccog	240
40	gcagggaatg tggagagcac cggttctgct ggggagcctc tgtatgagaa ctcccagag	300
	ttcacacctt acctggagac aaacctogga cagccaacaa ttcagagttt tgaacaggtg	360
	ggaacaaaag tggcagtgc cgtagaagat gaacggactt tagtcagaag gaacaacact	420
45	ttcctaagcc tccgggatgt ttttgcaag gacttaattt atacacttta ttattggaaa	480
	tcttcaagtt caggaaagaa aacagocaaa acaaacacta atgagttttt gattgatgtg	540
	gataaaggag aaaactactg tttcagtgtt caagcagtga ttccctcccg aacagttaac	600
50	cggaagagta cagacagccc ggtagagtgt atgggccagg agaaagggga attcagagaa	660
	atattctaca tcattggagc tgtggtatth gtggtcatca tccttgtcat catcctggct	720
	atatctctac acaagtgtag aaaggcagga gtggggcaga gctggaagga gaactcccca	780
55	ctgaatgttt cacatcacca tcacatcac tag	813

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 626 806 T3

<223> cebador dirección cadena arriba que codifica los primeros aminoácidos de TF maduro que carece del péptido señal y que contiene un codón de inicio ATG en marco con el ORF de TF, y un sitio de restricción BamHI

<400> 7

5 gggatccgca tgtcaggcac tacaataact gtg 33

<210> 8

<211> 50

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> cebador dirección cadena abajo que contiene los nucleótidos que codifican las histidinas y una señal de terminación TAG, ambos conteniendo un sitio de restricción BamHI

<400> 8

cggatccgtg tcgacctagt gatggtgatg gtgatgtgaa acattcagtg 50

20

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> cebador

<400> 9

30 gtgggaacaa aagtggcagt gaccgtagaa gat 33

<210> 10

<211> 27

35 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

40

<400> 10

atcttctacg gtcactgcca cttttgt 27

45 <210> 11

<211> 1374

<212> DNA

<213> Homo sapiens

50 <400> 11

ggggggcgccg cgggccccttt atagcgcgcg gggcaccgga tccccaaagac tgcgagctcc 60

cgcacacccc tgcactccc tctggccggc ccaggggcgc ttcagcccaa cctcccagc 120

55

cccacggggc ccacggaacc cgtctgatct cgcgcacaac tggtagacat ggagaccct 180

gcttgcccc gggteccgcg ccccagacc gcgctcctc ggacgctcct gctcggctgg 240

gtcttcgccc aggtggccgg cgttcaggc actacaaata ctgtggcagc atataattta 300

60

acttggaat caactaattt caagacaatt ttggagtggg aaccacaacc cgtcaatcaa 360

gtctacactg ttcaataag cactaagtca ggagattgga aaagcaaatg cttttacaca 420

ES 2 626 806 T3

	acagacacag agtgtgacct caccgacgag attgtgaagg atgtgaagca gacgtacttg	480
5	gcacgggtct tctcctaccc ggcaggaat gtggagagca ccggttctgc tggggagcct	540
	ctgtatgaga actccccaga gttcacacct tacctggaga caaacctcgg acagccaaca	600
	attcagagtt ttgaacaggt ggaacaaaa gtgaatgtga ccgtagaaga tgaacggact	660
10	ttagtcagaa ggaacaacac tttcctaagc ctcogggatg tttttggcaa ggacttaatt	720
	tatacacttt attattggaa atcttcaagt tcaggaaaga aaacagccaa aacaaacact	780
	aatgagtttt tgattgatgt ggataaagga gaaaactact gtttcagtg tcaagcagtg	840
15	attccctccc gaacagttaa ccggaagagt acagacagcc cggtagagtg tatgggccag	900
	gagaaagggg aattcagaga aatattctac atcattggag ctgtggtatt tgtggtcatc	960
	atccttgtca tcatcctggc tatatctcta cacaagtgtg gaaaggcagg agtggggcag	1020
20	agctggaagg agaactcccc actgaatggt tcataaagga agcactggtg gagctactgc	1080
	aatgctata ttgcactgtg accgagaact ttaagagga tagaatacat ggaacgcaa	1140
	atgagtattt cggagcatga agaccctgga gttcaaaaaa ctcttgatat gacctgttat	1200
25	taccattagc attotggttt tgacatcagc attagtoact ttgaaatgta acaaattgta	1260
	ctacaaccaa ttccaagttt taatttttaa caccatggca ccttttgac ataacatgct	1320
	ttagattata tattcgcgog tccccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	1374

30

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una combinación de factor tisular lipidado y trombina, en la que la cantidad de trombina está comprendida de 1 a 30 IU por gramo de composición, y la cantidad de factor tisular lipidado está
5 comprendida de 5 a 150 ng por gramo de composición.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el factor tisular lipidado está comprendido de 5 a 15
ng por gramo de composición.
- 10 3. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos uno de los sitios de N-glicosilación del factor tisular no es funcional.
4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicho factor tisular es una
proteína de fusión que comprende una primera porción que comprende la proteína factor tisular, y una segunda
15 porción que comprende otro péptido o proteína.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la segunda porción es una etiqueta.
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en la que la proteína de fusión tiene una
20 primera porción que comprende la proteína madura del factor tisular humano con al menos uno de los sitios de N-glicosilación siendo no funcional, y la segunda porción que comprende una etiqueta de His.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la proteína de fusión corresponde a la SEC ID N°: 5.
- 25 8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la proteína del TF está anclada en una microvesícula lipídica.
9. Una composición farmacéutica o veterinaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la
composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, junto con otros excipientes y/o portadores
30 adecuados aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.
10. Una composición hemostática que comprende la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones
1-8 o la composición farmacéutica o veterinaria de acuerdo con la reivindicación 9, y un material portador.
- 35 11. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición farmacéutica o veterinaria de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso como agente hemostático.
12. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición farmacéutica o
veterinaria de acuerdo con la reivindicación 9, o una composición hemostática de acuerdo con la reivindicación 10,
40 para su uso como medicamento.
13. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición farmacéutica o
veterinaria de acuerdo con la reivindicación 9, o una composición hemostática de acuerdo con la reivindicación 10,
para su uso en el tratamiento de hemorragias.
45
14. Un kit que comprende la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición
farmacéutica o veterinaria de acuerdo con la reivindicación 9 o la composición hemostática de la reivindicación 10, y
un aplicador que permite la aplicación simultánea de todos los componentes que forman la combinación.

50

FIG. 1

