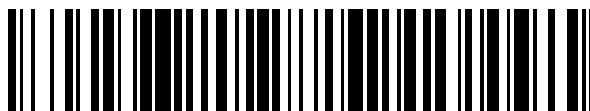


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 053**

51 Int. Cl.:

**A61L 24/10**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/EP2013/077674**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096354**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13821692 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2934612**

54 Título: **Composiciones sellantes**

30 Prioridad:

**21.12.2012 EP 12198839**

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 2 627 053 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 sellantes

5 La presente invención pertenece al campo de las composiciones sellantes.

## ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

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

15 La vía extrínseca de la cascada de coagulación se inicia tras la interacción del Factor VII (FVII), en su forma soluble e inactiva en plasma, con su receptor específico conocido como factor tisular (también denominado en el presente documento de aquí en adelante "FT"). En su forma nativa, el FT se encuentra predominantemente en la superficie de diversos tipos de células que rodean los vasos sanguíneos. Por lo tanto, en condiciones normales, únicamente entra en contacto con las moléculas plasmáticas en caso de producirse una lesión o una herida. Tras la ruptura de un vaso sanguíneo, se inicia la cascada de coagulación mediante la asociación del FT con FVII, lo que desencadena la posterior interacción entre los diversos factores de coagulación de la sangre. El resultado final es la formación de trombina (FIIa) que, a su vez, convierte el fibrinógeno (FI), que es muy abundante en el plasma, en fibras de fibrina. Estas fibras de fibrina son insolubles, y forman una malla que, junto con las plaquetas, produce lo que se conoce como un coágulo de fibrina.

25 Durante siglos, se han usado diversos procedimientos tales como la presión directa, el empaquetado con gasa, los hilos de sutura y el torniquete, con el objetivo de facilitar una hemostasis rápida en los casos de hemorragia masiva. Estas técnicas, aunque eficaces, se conocen como medios hemostáticos "no activos", y ayudan en el proceso hemostático cuando se usan con diferentes tipos de apósitos.

En un intento por mejorar los medios hemostáticos quirúrgicos, en las últimas décadas, se ha realizado un gran esfuerzo en el desarrollo de nuevos productos que contengan principios "activos" que, además de las técnicas tradicionales, puedan ayudar a mejorar la hemostasis. En este sentido, los pegamentos tisulares o sellantes de fibrina (también denominados en el presente documento de aquí en adelante SF), representan nuevas estrategias para una industria de productos hemostáticos/adhesivos que está evolucionando rápidamente. El concepto de uso de un SF para sellar los bordes de las heridas es una idea relativamente nueva. De hecho, la FDA aprobó el uso de los primeros SF aceptados (Tisseel, Baxter) en 1998. Desde entonces, los sellantes de fibrina preparados en el mercado, tales como Tiseel (Immuno, Viena, Austria), Beriplast (Behringwerke AG), Tissucol (Baxter) y BIOCOL (CRTS), se han usado ampliamente en todo el mundo durante casi 15 años.

Los SF tienen muchas aplicaciones quirúrgicas, y consisten, principalmente, en FI, FIIa, cloruro de calcio y, en ocasiones, Factor XIII activado (FXIIIa). En algunas preparaciones, o en indicaciones seleccionadas, se incluye un agente antifibrinolítico (aprotinina, ácido tranexámico), para prevenir la lisis del coágulo. Los SF están diseñados para imitar la etapa final de la cascada de coagulación durante la cual, debido a la acción catalítica de FIIa, FI se transforma en fibrina. Las fibras de fibrina formadas se asocian firmemente con las plaquetas, y dan lugar a la formación del coágulo de fibrina. En dicha interacción, FXIIIa desempeña un papel importante, ya que su presencia permite la disposición de la red de fibrina resultante para adquirir la configuración estructural óptima en términos de resistencia y elasticidad.

50 Los SF proporcionan FI y FIIa a concentraciones muy superiores a las que están presentes de forma natural en la sangre, permitiendo así una rápida formación de un coágulo sólido. Por lo tanto, se polimerizan independientemente de otros componentes de la sangre y funcionan incluso mejor en ausencia de sangre.

55 Dado que la polimerización de FI y FIIa es muy rápida (inferior a 5 segundos), ambos componentes se deben mantener en viales separados hasta su uso. Por lo tanto, los SF comercializados se presentan en dos jeringas independientes cuyos contenidos se mezclan en el sitio de aplicación.

El mecanismo de acción de los SF se apoya en la creación de un fuerte coágulo que actúa como una barrera de sellado en el lugar de aplicación. Los SF están indicados para su uso en zonas de heridas en las que se produce una pérdida de fluidos corporales tales como sangre, bilis, etc. También se pueden usar en la prevención de fugas de aire en heridas pulmonares. Además de su función como agentes sellantes, los SF se podrían usar en diversas

aplicaciones médicas, como: i) matriz para la curación de heridas; ii) sustrato para la adhesión de tejido; y iii) administración de fármacos.

Es bien conocido en el estado de la técnica que una composición sellante tiene que ser doble, mostrando una actividad tanto hemostática como sellante.

En contraste con los SF convencionales, que consisten en componentes aislados dobles (FIIa y FI), el documento WO97/29792 describe una composición de FI sellante de un solo componente exenta de FIIa. La combinación de FT y FI no induce la formación de un coágulo estable. Por lo tanto, además de FT y FI, se necesitan varios factores de coagulación. Dicho documento describe la necesidad de incluir FII, FV, FVII, FX y FXIII para inducir un coágulo. Por lo tanto, para que sea eficaz, la composición sellante descrita en el documento WO97/29792 se aplica sobre sangre sana o, alternativamente, también debe contener los factores de coagulación que faltan (FII, FV, FVII, FX y FXIII) a concentraciones fisiológicas. Por tanto, a pesar de los esfuerzos realizados, todavía existe la necesidad de nuevas composiciones capaces de prevenir eficazmente la migración de fluidos desde o en el interior de un tejido, que muestren una actividad tanto hemostática como sellante apropiada.

#### EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han encontrado que, mediante la adición de FT lipiado a composiciones de SF ya conocidas, que comprenden tanto trombina como fibrinógeno, se produce una mejora sustancial del perfil hemostático. Además, el coágulo resultante de la aplicación de la combinación de la invención muestra una consistencia superior, lo que indica su eficacia en el sellado de una herida/lesión sangrante. Esto se traduce en que una combinación que comprenda al menos trombina, fibrinógeno y FT lipiado, es una composición sellante prometedora que supera/mejora el efecto doble hemostático/sellante de las composiciones de SF ya conocidas.

Dicha mejora sustancial del perfil hemostático se debe principalmente a la capacidad de propagación de la combinación de coágulo cerca de su sitio de aplicación. Dicho efecto de propagación es muy importante no solo en la sangre sana, sino también en la sangre en la que la actividad de los componentes hemostáticos cruciales, tales como FIIa y FX, se ve afectada por la administración de ciertos fármacos ampliamente usados en cirugía, tales como las heparinas. Inesperadamente, la propagación del coágulo observada con la combinación de la invención supera la etapa anticoagulante de la sangre tratada con heparinas. Ninguno de los documentos de la técnica anterior que desvelan composiciones sellantes describe su eficacia basándose en la capacidad de propagación del coágulo en la zona cercana a su sitio de aplicación.

Esto significa que una combinación que comprenda al menos trombina (FIIa), fibrinógeno (FI) y FT lipiado es una composición sellante prometedora que supera/mejora el efecto doble hemostático/sellante de las composiciones de SF ya conocidas.

Así, en un aspecto, la presente invención proporciona una combinación que comprende factor tisular lipiado, trombina y fibrinógeno.

En la FIG. 1 (A), se muestra que, cuando se añade factor tisular lipiado a una composición sellante comercial, Tissucol® (que comprende trombina y fibrinógeno), la coagulación inducida en el plasma (a través de la propagación del coágulo en el plasma sano a una distancia de 3 cm de distancia desde el sitio de aplicación) tiene lugar en un período de tiempo sustancialmente inferior al necesario cuando solo se usa Tissucol®. De hecho, como se desprende de dichos datos, cuando, con la combinación de la invención, la coagulación es de aproximadamente el 50 % (triángulo negro), la combinación de la técnica anterior (Tissucol®, cuadrado gris) empieza a coagular la muestra de plasma. Cabe señalar, y se describe en primer lugar en el presente documento, que esta diferencia es aún mayor en el caso del plasma tratado con heparina a la dosis terapéuticamente más baja (FIG. 1 B) y la diferencia es máxima cuando se usa la dosis terapéuticamente superior de heparina (FIG. 1 C). En este último caso, el plasma tratado con heparina ni siquiera empieza a coagular a los 7 min de la aplicación del SF. Por lo tanto, mediante la adición de FT lipiado a un SF que comprende FIIa y FI, se obtiene una mejora sustancial del perfil hemostático.

Esto significa que con la administración de la combinación descrita en la invención, se requiere mucho menos tiempo para detener la hemorragia. Esto es de especial relevancia en el caso de los pacientes tratados con heparina, en los que las compresiones con trombina u otros productos hemostáticos no son lo suficientemente eficaces para detener la hemorragia, habiendo un alto riesgo de fallecimiento del paciente.

Además, los presentes inventores han encontrado que la combinación que comprende fibrinógeno, trombina y factor tisular muestra un sorprendente efecto sellante. Como se explica más abajo, en el Ejemplo 4, una combinación que comprende trombina, factor tisular lipiado y fibrinógeno, cuando se aplica a una muestra de plasma heparinizado, propaga sustancialmente más rápido que una combinación sellante que no incluya FT lipiado. Además, se ha observado que el coágulo obtenido con la combinación que incluye factor tisular, trombina y fibrinógeno tiene una

consistencia mucho mayor que el coágulo obtenido con Tissucol® (es decir, sin incluir el factor tisular lipídado). Sin quedar limitados a una teoría, los presentes inventores creen que el factor tisular se embebe en la red de fibrina formada (debido a la trombina y al fibrinógeno incluidos en la combinación) y que, debido a esta distribución del factor tisular dentro de la red de fibrina, se produce un efecto de expansión del coágulo que da lugar al sellado eficaz de la herida o la lesión. El hecho de que el coágulo obtenido con la combinación de la invención muestre una mejor consistencia con respecto al obtenido con Tissucol® significa que la combinación de la invención es más eficaz en la prevención de la migración de la sangre, y que es más eficaz en el sellado de la lesión/herida, reduciendo sustancialmente el riesgo de rotura del coágulo.

- 10 Cabe señalar que, a partir de las enseñanzas del documento WO97/29792, no se puede anticipar la propagación del coágulo formado por la composición ternaria de la presente invención tanto en plasma normal como en plasma tratado con heparina. En particular, este documento describe composiciones sellantes exentas de trombina que incluyen tromboplastina. En dicho documento, página 6, líneas 6-8, se afirma que la inclusión de tromboplastina como iniciador de la formación del coágulo de fibrina puede mejorar las cualidades hemostáticas del adhesivo. Sin embargo, los datos experimentales proporcionados en el Ejemplo II (también resumidos en la Tabla VI) muestran que el tiempo requerido para la hemostasis es sustancialmente igual o incluso superior al tiempo requerido para los adhesivos tisulares de la técnica anterior. Esto significa que se trata de un agente hemostático igual o peor que las composiciones de la técnica anterior. Por lo tanto, los datos experimentales proporcionados en el documento WO97/29792 no motivarían al experto en la materia a añadir factor tisular lipídado a una composición que comprendiera trombina y fibrinógeno con el fin de obtener una composición sellante con mejores propiedades hemostáticas. Al contrario, a partir de las enseñanzas de dicho documento, el experto no esperaría ninguna mejora sustancial en el efecto hemostático de una composición con la adición de tromboplastina.

- Los inventores de la presente invención han tratado de reproducir el contenido del documento WO97/29792 para determinar cuál es el efecto del factor tisular lipídado cuando se añade a una composición sellante libre de trombina. Como se resume en la Tabla I que se presenta más adelante, las composiciones del documento WO97/29792 muestran valores de MFC y G muy bajos en comparación con los de algunas composiciones sellantes comerciales. Como el experto en la materia sabe, cuanto más altos son los valores de G y MFC, mejores perfiles hemostáticos y sellantes tiene la composición. Por lo tanto, a partir de los resultados resumidos en la Tabla I que se presenta más adelante, el experto llegaría a la conclusión de que la inclusión del factor tisular lipídado en una composición sellante exenta de trombina, como se desvela en el documento WO97/29792, no mejoraría el perfil hemostático de la dicha composición.

- Por último, el documento WO97/29792 no se pronuncia sobre el efecto de la adición de factor tisular lipídado en el perfil sellante de las composiciones sellantes de trombina.

- En conclusión, a partir del documento WO97/29792, el experto no tendría la motivación de añadir factor tisular lipídado a una composición sellante con la expectativa de lograr una mejora sustancial en los perfiles hemostáticos y sellantes.

- 40 Sorprendentemente, los inventores de la presente invención, como se ha indicado anteriormente, han encontrado que, con la inclusión de factor tisular lipídado en una composición que comprende trombina y fibrinógeno, se consigue una mejora sustancial de los perfiles hemostático y sellante.

- 45 Por lo tanto, debido a las excelentes propiedades hemostáticas y sellantes de la combinación que comprende trombina, fibrinógeno y factor tisular lipídado, dicha combinación se puede usar en la formulación de una composición sellante junto con un material de soporte apropiado.

- Así pues, en un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición sellante que comprende la combinación según lo definido en el primer aspecto de la invención y un material de soporte.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el uso de la combinación del primer aspecto de la invención como agente sellante.

- 55 Debido a las propiedades de la combinación y composición sellante de la invención, estas se pueden usar en forma de composiciones farmacéuticas o veterinarias.

- Por lo tanto, en un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica o veterinaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación como se ha definido anteriormente, junto con otros excipientes y/o vehículos apropiados veterinaria o farmacéuticamente aceptables.

Como se ha descrito anteriormente, la combinación y la composición de la invención, debido a sus efectos hemostáticos y sellantes, son útiles en el tratamiento de las hemorragias.

Por lo tanto, en un quinto aspecto la presente invención proporciona la combinación o composición como se ha definido anteriormente para su uso como medicamento. Dicho aspecto se puede formular como un método de tratamiento de una enfermedad que comprende la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación o composición como se ha definido anteriormente junto con otros excipientes y/o vehículos veterinaria o farmacéuticamente aceptables apropiados.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una combinación o composición como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de hemorragias.

Este aspecto se puede formular alternativamente como el uso de una combinación o composición como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las hemorragias. Este aspecto se puede formular, alternativamente, como un método de tratamiento de hemorragias, comprendiendo el método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación o composición de la invención a un sujeto que lo necesite.

La frecuencia de uso de los SF comerciales como adhesivos o sellantes en varios entornos quirúrgicos, abre la posibilidad de su uso como vehículo para la liberación lenta de los fármacos pertinentes.

En este sentido, se han ensayado varios SF que contienen antibióticos para reducir las infecciones oculares postoperatorias y para tratar infecciones peritoneales localizadas. Se ha encontrado que dichas composiciones mejoran el efecto terapéutico de la sustancia activa debido al tiempo prolongado que permanecen adheridas en el sitio. Por lo tanto, las combinaciones y composiciones de la invención que comprenden trombina, fibrinógeno y FT lipidado que también contienen otras moléculas activas tales como antibióticos, factores de crecimiento, agentes quimioterapéuticos, anestésicos tópicos o vectores a base de ADN podrían proporcionar un mayor efecto terapéutico.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de la combinación o composición de la presente invención como un sistema de liberación de fármacos.

También se ha descrito en el estado de la técnica el uso de SF para ayudar en la construcción de piel, cartílagos y huesos. Por lo tanto, la combinación propuesta de SF más FT lipidado también se podría usar como un almacén mejorado para la unión celular y el crecimiento de nuevo tejido. Este potencial podría ser ampliado por el conocido efecto angiogénico del FT.

Así pues, en un aspecto adicional la presente invención proporciona el uso de la combinación o composición de la presente invención como agente de curación de heridas. Finalmente, la combinación de la invención o cualquiera de las composiciones del segundo y tercer aspecto de la invención, se pueden proporcionar como un kit.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit que comprende la combinación como se ha definido en el primer aspecto de la invención y un aplicador que permite la aplicación simultánea de fibrinógeno, trombina y factor tisular lipidado.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra la progresión de la coagulación en muestras de plasma normal (A) o tratado con heparina (B y C) en diferentes momentos después de la adición de la composición de SF comercializada con la marca comercial Tissucol® (cuadrado gris) o una combinación de FT lipidado y Tissucol® (triángulo negro). La coagulación se determinó a 3 cm de distancia de la zona de aplicación del producto de ensayo. Eje Y = % de coagulación; Eje X = tiempo (A en segundos, B y C en minutos).

La FIG. 2 representa la pérdida de sangre en ml/kg para cada una de las ratas correspondientes a los grupos tratados con los diferentes productos: Tissucol® (SF), Tissucol® + FT lipidado y control (sin tratamiento). Cada punto (triángulo o cuadrado) representa el valor de pérdida de sangre de un solo animal, y cada una de las líneas horizontales representa la media de cada grupo.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se ha indicado anteriormente, la combinación de la presente invención contiene trombina, fibrinógeno y factor tisular lipidado.

En la presente invención, el concepto "factor tisular" (FT) se ha de entender como una glucoproteína de membrana integral que se encuentra ampliamente distribuida en el reino animal. El FT aparece en diferentes tipos de células,

predominantemente en el tejido subendotelial, y es necesario para la iniciación de la vía extrínseca de la cascada de coagulación que conduce a la producción de FIIa y a la formación de un coágulo de fibrina estable. Los ejemplos de proteínas FT que se pueden usar en la presente invención incluyen FT humano (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 148, noviembre de 2012, número de acceso P13726), FT de ratón (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 103, noviembre de 2012, número de acceso P20352), FT bovino (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 89, noviembre de 2012, número de acceso P30931), FT de conejo (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 90, noviembre de 2012, número de acceso P24055) y proteínas FT de diferentes animales.

La proteína FT humana con el número de acceso SwissProt P13726 tiene una estructura en dominios bien definida que comprende (1) un péptido señal o una región con una secuencia líder de 32 aminoácidos que se procesa post-traduccionalmente de la forma inmadura a la forma madura; (2) un dominio extracelular hidrofílico N-glicosilado que comprende 219 aminoácidos; (3) un fragmento altamente hidrofóbico de 23 aminoácidos que forma el dominio transmembrana; y (4) el extremo carboxilo de 21 aminoácidos que es el fragmento citoplasmático de la proteína.

En una realización particular, el FT corresponde al FT maduro.

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

En una realización, el FT está glicosilado.

Tal y como se usa en el presente documento, el concepto "glicosilado" incluye cualquier grado de glicosilación. Dado que el FT nativo contiene varios sitios de glicosilación, como se explica en detalle más adelante, la expresión "factor tisular" también engloba aquellas formas de la proteína que muestran diferentes grados de glicosilación, dichas formas siendo obtenidas mediante la expresión del FT en hospedadores capaces de llevar a cabo reacciones de N-glicosilación.

Además, el concepto "factor tisular" también engloba aquellas variantes producidas como consecuencia de la inserción, delección o sustitución de uno o más residuos aminoacídicos en la secuencia nativa de FT. Ensayos funcionales adecuados que se pueden usar para evaluar si un determinado polipéptido es una variante funcional de FT son aquellos ensayos basados en la determinación de la capacidad de la variante de FT para unirse específicamente a FVIIa, o en la determinación in vitro del tiempo de coagulación en plasma o sangre entera, 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. Los procedimientos para llevar a cabo estos ensayos se han descrito en la técnica anterior.

Dichas variantes de acuerdo con la presente invención incluyen secuencias de aminoácidos que son al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 96 % idénticas a las moléculas de FT nativas mencionadas anteriormente. Como se conoce en la técnica, la "identidad" entre dos proteínas se determina mediante la 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 por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente mediante el uso del algoritmo BLASTP.

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

En la presente solicitud, el concepto "totalmente glicosilado" significa que todos los sitios de glicosilación potenciales han sido glicosilados.

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

En la presente solicitud "no glicosilado" significa que ninguno de los sitios de N-glicosilación es funcional o, como alternativa, que el polipéptido FT ha sido expresado mediante un método de no glicosilación in vitro (es decir, sistema de expresión exento de células) o en un vector privado de las vías metabólicas de glicosilación (es decir, E. coli).

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

Todas las proteínas FT maduras contienen tres sitios potenciales de glicosilación N-ligadas que tienen la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr. En el caso del FT humano maduro, dichos tres sitios de glicosilación se encuentran en

Asn11 (secuencia Asn11-Leu12-Thr13), Asn124 (secuencia Asn124-Val125-Thr126) y Asn137 (secuencia Asn137-Asn138-Thr139), dichas posiciones siendo con respecto a SEC ID N°: 1.

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

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

15 La glicosilación variará dependiendo del sistema de expresión usado para la producción del FT. Por ejemplo, la proteína factor tisular puede incluir uno o más glicanos específicos de planta, glicanos específicos de levadura, glicanos específicos de insecto o glicanos específicos de animal.

20 Cuando el FT se produce en levadura, la glicosilación normalmente implicará un núcleo interno de aproximadamente diez residuos de manosa, ligado a la asparagina a través de dos residuos de GlcNAc, y una cadena ramificada exterior de 50-100 residuos de manosa. Por lo tanto, la glicosilación N-ligada podría añadir potencialmente hasta 300 residuos de manosa al FT, un aumento de la masa molecular de aproximadamente 60 kDa. Además, también es posible unir varios residuos de manosa a varios sitios de glicosilación O-ligada (más de 25). Por lo tanto, las moléculas de FT incluidas en las combinaciones y composiciones de la presente invención tienen un grado variable  
25 y la composición de glicosilación a N-ligada en uno o más sitios de N-glicosilación.

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

30 Dicha segunda porción puede estar unida al extremo N-terminal de la primera porción de dicho fragmento de proteína FT o, como alternativa, dicha segunda porción puede estar unida a la región del extremo C-terminal de dicho fragmento de proteína FT. Tanto la primera como la segunda porción pueden estar directamente unidas o estar unidas a través de un polipéptido engarce entre dichas primera y segunda región.

35 En otra realización, dicha segunda porción es un marcador. El marcador puede estar unido al dominio C-terminal o N-terminal de la primera porción de la proteína FT. En la presente invención, el término "marcador" se ha de entender como cualquier secuencia peptídica o aminoacídica, unida al dominio C-terminal o N-terminal de dicha proteína FT, que se puede usar en el aislamiento o purificación de la proteína de fusión. Por lo tanto, dicho marcador es capaz de unirse a uno o más ligandos tales como, por ejemplo, uno o más ligandos de una matriz de afinidad,  
40 tales como un soporte de cromatografía o una perla con alta afinidad. Un ejemplo de dicho marcador es un marcador de histidina (marcador de His o HT), tal como un marcador que comprende 6 residuos de histidina (His6 o H6), que se puede unir a una columna de níquel ( $Ni^{2+}$ ) o cobalto ( $Co^{2+}$ ) con alta afinidad. Los ejemplos adicionales ilustrativos, no limitativo, de marcadores útiles para aislar o purificar una proteína de fusión incluyen marcador Arg, marcador FLAG, marcador Strep, un epítipo capaz de ser reconocido por un anticuerpo, tal como marcador c-myc (reconocido  
45 por un anticuerpo anti-c-myc), marcador SBP, marcador S, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, marcador glutatión S-transferasa, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, marcador 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);  $\beta$ -galactosidasa y similares.

50 Se ha descrito previamente que el marcador de His, que se usa para el aislamiento o la purificación de FT recombinante, tiene la característica deseable de que se puede unir a sus ligandos en condiciones que son desnaturizantes para la mayoría de las proteínas y que interrumpen la mayoría de las interacciones proteína-proteína. Por lo tanto, se puede usar para eliminar la proteína cebo marcada con H6 tras la interrupción de las  
55 interacciones proteína-proteína en las que el cebo ha participado.

Por lo tanto, en una realización, el marcador es un marcador de His. En otra realización, dicho marcador de His está unido al dominio C-terminal de la primera porción de proteína FT. En otra realización más, dicho marcador de His está unido al dominio N-terminal de la primera porción de la proteína FT.

60 En otra realización, la primera porción de la proteína de fusión comprende la proteína FT madura, preferentemente, la proteína FT madura humana. En otra realización más, la primera porción es la proteína FT madura humana.

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

Dicha proteína de fusión se puede obtener por medios convencionales, por ejemplo, por medio de expresión génica de la secuencia nucleotídica que codifica dicha proteína de fusión en una célula de levadura adecuada. El eventual marcador se puede usar, si se desea, para el aislamiento o la purificación de dicha proteína de fusión.

10

La expresión "factor tisular (FT) lipídado", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier fuente de FT, estando dicho FT total o parcialmente insertado en vesículas lipídicas o membranas celulares. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de fuentes de "FT lipídado" son: 1) extracto tisular que contiene FT lipídado (cuyo aislamiento se puede llevar a cabo a partir de varios tejidos tales como tejido cerebral, de placenta y pulmonar, tejidos de diferentes animales tales como ovejas, vacas, conejos, perros y seres humanos, entre otros); 2) componente proteico del FT purificado y (re)lipídado, es decir, lo que se ha añadido al componente lipídico (fosfolípidos) tras la purificación del FT; y 3) extracto celular que contiene FT lipídado donde la fracción lipídica procede de la célula hospedadora y el FT se ha expresado de forma recombinante.

15

El FT purificado y (re)lipídado se pueden preparar, a modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo, de acuerdo con el protocolo descrito previamente por Mimms L. T. et al., "Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside", *Biochemistry*, 1981, vol. 20(4), pág. 833-840. En dicho protocolo, el FT no lipídado se incorpora dentro de vesículas de fosfolípidos usando un detergente no iónico, tal como, por ejemplo, N-octil- $\beta$ -D-galactopiranosido. Los fosfolípidos que se pueden usar en el FT lipídado de acuerdo con la invención pueden tener cualquier origen (animal, vegetal o sintético). Se puede usar prácticamente cualquier fosfolípido en la preparación del FT lipídado de la presente invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de fosfolípidos que se pueden usar en la preparación de FT lipídado incluyen fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, etc. La relación de componente proteico FT:fosfolípido (molar, en peso o volumétrica) puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 1:50.000 a aproximadamente 1:3000. En una realización particular, el FT lipídado es un FT humano lipídado y consiste en el componente proteico de un FT aislado de tejido humano, o de células recombinantes, e insertado en una membrana lipídica en una proporción de componente proteico FT:fosfolípido adecuada. Las relaciones molares preferidas de la composición de lípidos (preferentemente fosfatidilcolina y fosfatidilserina) para lograr la actividad óptima de FT son bien conocidas en el estado de la técnica.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

En cuanto a la preparación de extracto celular que contiene FT lipídado donde la fracción lipídica procede de la célula hospedadora y el FT se ha expresado de manera recombinante, dado que la molécula de FT contiene un gran dominio hidrofóbico, es razonable suponer que la clonación del gen del FTr en cualquiera de los sistemas de expresión eucariotas disponibles daría lugar a la expresión de la proteína FT recombinante (FTr) asociada a las membranas lipídicas de las células hospedadoras. En esta asociación, sería posible que los componentes membranosos del hospedador pudieran imitar o proporcionar un armazón similar o idéntico a las moléculas de FTr como los que se encuentran en las células de mamífero con las que el FT se asocia normalmente. Por lo tanto, la purificación de estos componentes membranosos produciría una fuente disponible de FTr lipídado. Debido a su composición química, estos componentes membranosos lipídicos aislados se encontrarían predominantemente en forma de vesículas de diferentes tamaños. Además de esos FTr, las vesículas también contendrían proteínas o lípidos específicos que dependen del origen de la célula hospedadora. Por lo tanto, las membranas lipídicas procedentes de la levadura, bacterias, células de diferente origen, tales como de insecto, mamífero, planta, peces, algas, también podrían contener proteínas y lípidos característicos de dichas células hospedadoras.

El FT comprende una región hidrófoba (el dominio transmembrana), que está anclada en una membrana lipídica, mientras que las regiones hidrofílicas de los mismos (es decir, la región amino-terminal y la región carboxilo-terminal de dicha proteína FT) se enfrentan al lado exoplasmático de la membrana.

En la presente invención, el concepto de "membrana lipídica" se ha de entender como una capa organizada de unas cuantas moléculas (lípidos y proteínas) de espesor 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 se compone de dos capas de lípidos orientadas, en las que puede haber proteínas embebidas. Una bicapa lipídica, que es la estructura básica de las membranas de una célula, normalmente está formada por moléculas anfipáticas (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos, etc.) en un entorno acuoso, estando cada molécula orientada con el grupo hidrófilo en el exterior de la capa y el grupo hidrófobo en el interior de la capa. Preferentemente, el FT está anclado en una microvesícula lipídica.

En la presente invención, el concepto "microvesícula lipídica" se ha de entender como un compartimento pequeño y cerrado, que se compone sustancialmente de lípidos de una sola o dos capas. El tamaño de la microvesícula que

porta FT de la invención puede variar dentro de un intervalo relativamente amplio, siendo, por lo general, dicho tamaño igual o inferior a 10  $\mu\text{m}$ , normalmente igual o inferior a 0,5  $\mu\text{m}$ . En una realización particular, el tamaño de las microvesículas derivadas de levadura que portan FT de la invención varía de 10 a 0,01  $\mu\text{m}$ . Los microvesículas están formadas por membranas lipídicas, o fragmentos de las mismas, de células eucariotas. En una realización, la microvesícula puede estar enriquecida en fosfolípidos cargados negativamente, preferentemente, en fosfatidilserina. Métodos para enriquecer dichas microvesículas en fosfatidilserina se describen, por ejemplo, en el documento WO2011131658. Brevemente, dichas microvesículas que portan FT enriquecidas en fosfolípidos se pueden preparar mediante un proceso que comprende: a) someter un cultivo de células eucariotas recombinantes que expresan la proteína FT a fermentación en condiciones que permitan la expresión de dicha proteína FT o fragmento de la misma que tenga actividad procoagulante; b) aglomerar las células cultivadas derivadas de la fermentación de la etapa a), dando un producto de fermentación; c) someter dicho producto de fermentación de la etapa b) a homogenización, dando un homogenado de fermentación; y d) someter dicho homogenado de fermentación de la etapa c) a separación, dando un pellet y un extracto de levadura aclarado (CYE) que contiene dichas microvesículas derivadas que portan FT que tienen actividad procoagulante; e) recoger dicho extracto de levadura aclarado (CYE) que contiene dichas microvesículas derivadas de levadura que portan FT que tienen actividad procoagulante; y, opcionalmente, f) si se desea, aislar o purificar dichas microvesículas derivadas de levadura que portan FT que tienen actividad procoagulante mediante procedimientos de división por tamaño; y g) enriquecer las microvesículas obtenidas en fosfolípido cargado negativamente (es decir, fosfatidilserina) mediante la incubación de ambos componentes fosfatidilserina y microvesículas lipídicas que contienen FT como se describe en el documento WO2011131658. Como etapa previa a la incubación mencionada, se podría preparar fosfatidilserina en forma de vesículas multilaminares mediante la resuspensión de los lípidos en una solución tamponada seguida de tratamiento de ultrasonidos.

El método de producción de FT depende de la célula eucariota usada. En general, la célula eucariota se transforma con un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína FT unida operativamente a un promotor funcional en una célula que puede ser de: hongos, levadura, planta o animal (tal como pez, reptil, mamífero, insecto, etc.). El ADNc que codifica la proteína FT puede ser amplificado mediante reacción de la polimerasa en cadena (PCR) usando una biblioteca de ADNc como molde y los cebadores apropiados. El Ejemplo 1 describe la amplificación del ADNc que codifica la proteína FT humana madura con 18 nucleótidos adicionales (que codifican seis histidinas) en el extremo 3'.

En otra realización, la proteína FT se podría purificar de las etapas a) a d) anteriores, siguiendo procedimientos de purificación de cromatografía bien establecidos. Una vez purificada, la proteína FT se podría lipidar *in vitro* con concentraciones óptimas de fosfolípidos.

En una realización adicional, se podría obtener FT lipidado a partir de extractos de tejido animal, tal como tejido cerebral, de placenta y pulmonar, y tejidos de diferentes animales tales como ovejas, vacas, conejos, perros y seres humanos, entre otros. Preferentemente, el FT lipidado procede de un ser humano. Más preferentemente, el FT lipidado es recombinante humano.

En la presente invención, el término "trombina" (FIIa) se ha de entender como la proteasa serina clave que desempeña un papel fundamental en la hemostasis. La FIIa activa muchos de los factores de coagulación implicados en la cascada de coagulación entre los que se incluye fibrinógeno (FI), Factor V (FV), Factor VIII (FVIII), Factor XI (FXI) y Factor XIII (FXIII). FIIa también activa las plaquetas y las células de endotelio vascular. El precursor de trombina es el zimógeno protrombina (FII), que es secretada a la sangre desde el hígado. Durante la cascada de coagulación, FII se convierte en FIIa a diferentes velocidades, primero por FX activado (FXa), y en las últimas etapas de la cascada por el complejo de protrombinasa (FXa:FVa). La FIIa comercial se produce tras el aislamiento de FII del plasma de origen humano o bovino. Tras su aislamiento, FII se transforma *in vitro* en FIIa. Todos los SF que se encuentran actualmente en el mercado contienen FIIa de origen humano o bovino. Además, también se encuentra disponible la FIIa humana recombinante altamente purificada. Esta FIIa humana recombinante se obtiene tras la purificación de FII humana de células de ovario de hámster chino (CHO) recombinantes, seguida de su procesamiento a FIIa mediante procedimientos *in vitro*.

Ejemplos de proteínas FII que se pueden usar en la presente invención incluyen FII humana (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 182, noviembre de 2012, número de acceso P00734), FII bovina (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 153, noviembre de 2012, número de acceso P00735), FII de ratón (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 141, noviembre de 2012, número de acceso P19221), FII porcina (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 37, noviembre de 2012, número de acceso B3STX9) y proteínas FII de diferentes animales. Preferentemente, la trombina es de origen humano o bovino, aunque más preferentemente es trombina humana y aún más preferentemente trombina humana recombinante.

En la presente invención, el término "fibrinógeno" (FI) corresponde a la penúltima proteína de la hemostasis. El FI muestra una estructura compleja, ya que consiste en dos cadenas  $\alpha$  (66 kDa), dos  $\beta$  (52 kDa) y dos  $\gamma$  (46,5 kDa), unidas por 29 puentes disulfuro. El FI se sintetiza en el hígado, y circula en el plasma a una concentración de 2-4

mg/ml. Durante la última etapa de la cascada de coagulación, el FI se activa a fibrina por FIIa. La fibrina se agrega formando una red reticulada de fibras que, en colaboración con las plaquetas, forma el coágulo. Los SF actuales contienen fibrinógeno derivado de plasma, que se purifica a partir de sangre humana. Este procedimiento tiene riesgos asociados con la contaminación por patógenos. Estos riesgos se podrían minimizar mediante la producción de una versión recombinante de fibrinógeno humano. El FI recombinante humano se ha producido en E coli, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS-1) y células CHO. Recientemente, el FI humano se ha producido en vacas transgénicas, de las que el FI recombinante se obtiene de la leche.

Ejemplos de proteínas FI que se pueden usar en la presente invención incluyen FI humano: cadena  $\alpha$  (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 174, noviembre de 2012, número de acceso P02671), cadena  $\beta$  (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 163, noviembre de 2012, número de acceso P02675), cadena  $\gamma$  (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 171, noviembre de 2012, número de acceso P02679); FI bovino: cadena  $\alpha$  (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 104, noviembre de 2012, número de acceso P02672), cadena  $\beta$  (UniProtKB/Swiss-Prot. Versión 102, noviembre de 2012, número de acceso P02676) y proteínas FI de diferentes animales. Preferentemente, el fibrinógeno incluido en la combinación de la invención es de origen humano, y más preferentemente es FI humano recombinante.

En una realización del primer aspecto de la invención, la combinación comprende además un agente de reticulación.

En otra realización del primer aspecto de la invención, la combinación comprende además un inhibidor de la fibrinolisis.

En otra realización más del primer aspecto de la invención, la combinación comprende además  $\text{CaCl}_2$ .

En una realización adicional del primer aspecto de la invención, la combinación comprende además un agente de reticulación y un inhibidor de la fibrinolisis.

En una realización adicional del primer aspecto de la invención, la combinación comprende además un agente de reticulación, un inhibidor de la fibrinolisis y  $\text{CaCl}_2$ .

Preferentemente, dicho agente de reticulación es FXIII.

Preferentemente, dicho inhibidor de la fibrinolisis se selecciona de aprotinina, ácido tranexámico y ácido aminocaproico.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones sellantes hemostáticas que comprenden las combinaciones de la invención y un material de soporte.

En la presente invención, el término "hemostático" referido a composiciones, al efecto y al uso, se ha de entender como una sustancia que potencia la hemostasis, es decir, que detiene la hemorragia. También se puede denominar "antihemorrágico" y "procoagulante".

La expresión "material de soporte" se ha de entender como un sustrato de material adecuado que permite depositar las combinaciones de la invención sobre el mismo, su transporte y su liberación en el sitio deseado, por ejemplo, en el sitio donde las composiciones de la invención tienen que ejercer su efecto terapéutico. Dicho material de soporte puede ser un soporte sólido o un soporte no sólido, por ejemplo, un soporte líquido, un soporte en polvo o un soporte gaseoso. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de soportes sólidos incluyen apósitos, tiritas, compresas, emplastos, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de soportes líquidos incluyen geles, sprays, enjuagues bucales, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de soportes gaseosos incluyen aire, propulsores, etc. La fabricación de dichas composiciones se puede realizar mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante la mezcla de las combinaciones de la invención y el material de soporte. La interacción entre los componentes de la combinación y el material sólido puede ser una interacción física o química.

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

En otra realización, el material de soporte es un spray, un aerosol o un dispositivo para la dispensación de un polvo.

En una realización del segundo aspecto de la invención, la composición sellante comprende además un agente de reticulación.

En otra realización del segundo aspecto de la invención, la composición sellante comprende además un inhibidor de la fibrinolisis.

En todavía otra realización del segundo aspecto de la invención, la composición sellante comprende además  $\text{CaCl}_2$ .

En una realización adicional del segundo aspecto de la invención, la composición sellante comprende además un agente de reticulación y un inhibidor de la fibrinólisis.

5

En una realización adicional del segundo aspecto de la invención, la composición sellante comprende además un agente de reticulación, un inhibidor de la fibrinólisis y  $\text{CaCl}_2$ .

Preferentemente, dicho agente de reticulación es FXIII.

10

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

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 las combinaciones de la invención, junto con excipientes y/o vehículos veterinaria o farmacéuticamente aceptables adecuados.

15

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de la combinación que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo de, o aliviar en cierta medida, uno o más de los síntomas de la enfermedad que se trata. Como es evidente, la dosis particular de las combinaciones administradas de acuerdo con la presente invención se determinará por las circunstancias particulares que rodeen el caso, incluyendo el compuesto administrado, la vía de administración, la condición que se esté tratando en particular y consideraciones similares.

20

25 Los procesos de preparación de dichas composiciones sellantes son bien conocidos en el estado de la técnica.

La composición farmacéutica o veterinaria de la invención se debería aplicar por vía tópica en el sitio de la hemorragia, bien directamente o en un material de soporte, tal como una gasa. Ejemplos de aplicación tópica incluyen, pero no se limitan a, externa, cutánea, intranasal, intravesicular, intravaginal, bucal, rectal, oftálmica, aplicación tópica endoscópica e instilación. Preferentemente, la combinación y las composiciones de la presente invención se aplican por vía tópica.

30

La composición farmacéutica o veterinaria puede adoptar la forma de gel blando o duro, líquido, loción, crema, pomadas, pastas, formulaciones de roll-on, pulverizados, aerosoles, formulaciones aplicadas en rellenos y formulaciones filmógenas.

35

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

40

Cuando la composición farmacéutica 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, gel blando o duro, líquido, loción, crema, pomadas, pastas, formulaciones de roll-on, pulverizados, sprays, formulaciones aplicadas en rellenos y formulaciones filmógenas. Estas composiciones farmacéuticas tópicas se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos en el estado de la técnica. Los excipientes y/o vehículos farmacéuticos apropiados, y sus cantidades, pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la materia de acuerdo con el tipo de formulación que se esté preparando.

45

Las composiciones de la invención, se pueden usar como complemento de la hemostasis en pacientes sometidos a cirugía en el control de la hemorragia mediante técnicas quirúrgicas convencionales (tales como sutura, ligadura y cauterización), así como complemento en las técnicas quirúrgicas convencionales (tales como sutura y ligadura) para evitar fugas.

50

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de la combinación del cuarto aspecto de la invención como agente sellante.

55

Como se ha indicado anteriormente, la combinación de la invención, debido a la alta consistencia del coágulo producido y a la propagación con la que se expande puede sellar eficazmente cualquier herida o lesión en un período muy corto de tiempo, impidiéndose la migración de fluidos de una manera segura y eficaz, porque el riesgo de rotura se reduce sustancialmente. Esta aplicación es de interés en el sellado de lesiones o heridas de la piel, órganos, y tras un traumatismo interno, entre otros.

60

En una realización, la combinación o las composiciones definidas anteriormente se usan para sellar un tejido mediante la sutura de tejidos entre sí, cuando sea posible, y la aplicación de la combinación o la composición en los tejidos.

5

En otra realización, la combinación o las composiciones definidas anteriormente se usan para fijar un injerto a un tejido, mediante la aplicación de la combinación o la composición en el tejido antes de colocar el injerto sobre el mismo.

10 Debido a las propiedades señaladas en detalle anteriormente, las combinaciones y las composiciones de la invención se pueden usar como un sistema de administración de fármacos o como un agente de curación de heridas.

15 La expresión "curación de heridas" se refiere a un proceso complejo en el que la piel (o algún otro órgano) se repara tras una lesión; curando la herida de cualquier tipo y en cualquier sitio. Se puede tratar de una curación de heridas normal o lenta. Esta última se da en particular en el caso de enfermedades tales como diabetes mellitus, vasculitis, enfermedad oclusiva arterial, úlcera venosa y/o infectada crónica, así como una mala curación de una úlcera gástrica. La curación de heridas lenta también se encuentra en el caso del deterioro de inervaciones tales como paraplejia, lepra, neuropatía, etc., y gangrena de decúbito de personas que necesitan cuidados. La curación de  
20 heridas lenta también se dará si se producen suturas débiles y problemas de cicatrización tras operaciones, en particular de los intestinos y los trasplantes de piel y otros órganos, respectivamente.

La curación de heridas lenta también se encuentra en el caso de fracturas óseas, quemaduras y tratamientos usando esteroides.

25

Como se usa en el presente documento, el término "herida" incluye una lesión de cualquier tejido, incluyendo, por ejemplo, el retraso o la dificultad de curación de las heridas y las heridas crónicas. Ejemplos de heridas pueden incluir heridas abiertas y cerradas. El término "herida" también puede incluir, por ejemplo, lesiones de la piel y del tejido subcutáneo iniciadas de diferentes maneras (por ejemplo, úlceras por presión debidas a períodos de reposo  
30 en cama prolongados y heridas provocadas por traumatismos) y con características variables. Las heridas se pueden clasificar en uno de los cuatro grados en función 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 total), en las que los huesos quedan al descubierto (por ejemplo, un punto de presión óseo tal como el trocánter mayor o el sacro).

35

La expresión "herida crónica" se refiere, en general, a una herida que no ha cicatrizado. 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.

40

Las combinaciones y las composiciones de la invención también se pueden usar en el tratamiento de hemorragias. Dichas hemorragias se pueden deber a coagulopatías, lesiones, heridas o trastornos plaquetarios, entre otros.

45 Como se muestra a continuación, las combinaciones de la invención actúan como agente antihemorrágico y, por consiguiente, se pueden usar para tratar o corregir trastornos hemorrágicos, en particular, aquellos trastornos hemorrágicos asociados con la diátesis hemorrágica.

La expresión "diátesis hemorrágica" se refiere al proceso que provoca un trastorno hemostático y que, como resultado de ello, da lugar a la aparición de un síndrome hemorrágico que puede ocurrir de vez en cuando con  
50 hemorragia prolongada y excesiva.

El término "coagulopatía" se refiere a un trastorno de los factores de coagulación. Este trastorno se puede deber a una deficiencia o un déficit de un factor de coagulación específico, cuya consecuencia será la aparición de un síndrome hemorrágico, o se puede deber a un trastorno del factor de coagulación. La coagulopatía puede ser, en  
55 general, una coagulopatía congénita o una coagulopatía adquirida. Como ejemplos ilustrativos, no limitativos, de coagulopatías congénitas, caben mencionar las 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 provoca la hemofilia A, factor de coagulación IX (FIX) cuyo déficit o deficiencia provoca la hemofilia B, factor de coagulación X (FX), factor de coagulación XI (FXI), cuyo déficit o deficiencia provoca la hemofilia C, factor de  
60 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 factores de coagulación en la insuficiencia hepática grave, el tratamiento anticoagulante (tal como la 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 hemorragia. Este mecanismo se produce en el síndrome de coagulación intravascular diseminada o coagulopatía debida al consumo que se produce en múltiples enfermedades tales como en la sepsis grave que daña la microcirculación de endotelio que activa las plaquetas y los factores de coagulación con la formación de múltiples microtrombos; en la

5 invasión de sangre por FT, tal como la liberación de la placenta; en la retención de un feto muerto; en múltiples traumatismos con el aplastamiento de tejidos; en las mordeduras de serpientes venenosas, 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 debidos a la acción de la plasmina, que son antiplaquetarios y anticoagulantes.

10

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 particular, dicho trastorno plaquetario es un trastorno plaquetario congénito. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de trastornos plaquetarios congénitos incluyen la enfermedad de

15 Glanzmann, la enfermedad de Bernard Soulier, el síndrome de Bolin-Jamieson, el síndrome de Wiskott-Aldrich, el síndrome de Paris-Trousseau-Jacobsen, trombocitopenia del cromosoma X, síndrome plaquetario de Gray, síndrome de Sebastian y anemia de Fanconi. En otra realización particular, dicho trastorno plaquetario es un trastorno plaquetario adquirido. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de trastornos plaquetarios adquiridos incluyen trastornos mieloproliferativos tales como trombocitemia, policitemia, leucemia mielocítica crónica, etc.; en la

20 metaplasia mieloide existen trastornos plaquetarios funcionales con aumento del tiempo de sangrado, defectos de retención en perlas de vidrio, defecto de agregación plaquetaria, liberación anormal y defecto del factor III plaquetario. Se han encontrado defectos funcionales plaquetarios en las disproteinemias en el escorbuto, y en la enfermedad cardíaca congénita y en la cirrosis

25 En una realización del séptimo aspecto de la invención, se proporciona la combinación o las composiciones definidas anteriormente para su uso en el tratamiento tópico de hemorragias mediante su aplicación en el sitio de la lesión.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, incluye cualquier miembro de una especie animal, incluyendo la especie humana; a modo ilustrativo, no limitativo, dicho sujeto puede ser un mamífero, tal como un

30 primate, un animal doméstico, un roedor, etc. Preferentemente, dicho sujeto es un hombre o una mujer de cualquier edad y raza. En una realización particular, dicho sujeto es un ser humano sin historial de trastornos de la hemostasis, tal como un individuo que no tiene coagulopatías ni trastornos plaquetarios. En otra realización particular, dicho sujeto es un ser humano que tiene un historial de trastornos de la hemostasia, tal como un individuo

35 que tiene una diátesis hemorrágica, por ejemplo, una coagulopatía tal como una coagulopatía congénita o adquirida, o un trastorno plaquetario, tal como un trastorno plaquetario congénito o adquirido.

Dado que el FT es una molécula proangiogénica conocida, las combinaciones y las composiciones de la invención también se pueden usar en el tratamiento de una enfermedad asociada a una angiogénesis deficiente.

40

La expresión "enfermedad asociada a una angiogénesis deficiente", como se usa en el presente documento, se refiere a enfermedades que se pueden curar mediante la activación de la formación de vasos. La expresión "formación de vasos" se refiere a una formación de vasos de cualquier tipo y en cualquier lugar. La promoción de la formación de vasos puede ser útil en una serie de afecciones clínicas. Por ejemplo, las combinaciones de la

45 invención se pueden usar para potenciar la angiogénesis de la vasculatura colateral en el tejido del miocardio durante o después de la enfermedad isquémica, infarto de miocardio o tras la cirugía de derivación coronaria. Otras enfermedades o afecciones que se pueden tratar mediante el suministro de las combinaciones y las composiciones de la invención incluyen la enfermedad vascular y/o la enfermedad isquémica que provoca la patología del sistema nervioso periférico o central. Dichas afecciones/enfermedades pueden incluir accidentes cerebrovasculares, por

50 ejemplo, los causados por oclusiones de coágulos o por rotura de aneurismas, o isquemia general/localizada causante de muerte neuronal o el deterioro funcional periférico, tal como en las funciones motoras o sensoriales, o deterioro del lenguaje, cardiomiopatía isquémica o enfermedad arterial periférica, tal como claudicación por isquemia crónica de las extremidades (músculo esquelético), dolor en reposo/ulceración isquémica/gangrena. Por otra parte, la promoción de la formación de vasos es adecuada para reemplazar los vasos sanguíneos deteriorados, por

55 ejemplo, viejos. Pueden estar presentes, por ejemplo, en el cerebro o el corazón, de modo que se pueda prevenir o tratar una apoplejía o un infarto. También se pueden tomar precauciones contra la presbifrenia. Además, se refiere a una formación de vasos para el tratamiento de la arteriosclerosis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, retinopatía diabética y trombosis venosa profunda de las piernas/ulcus cruris, así como la prevención de recaídas.

60 Finalmente, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona kits que comprenden las combinaciones y las composiciones de la invención junto con un aplicador.

El kit puede adoptar la forma de (a) tres partes, de manera que cada parte contiene cada uno de los componentes que forman la combinación de la invención, es decir, una parte del kit contiene la trombina, otra contiene el fibrinógeno y la otra contiene el factor tisular lipiado; o, como alternativa, (b) dos partes, de manera que dos de los componentes de la combinación (ya sea la trombina y el factor tisular lipiado o el fibrinógeno y el factor tisular lipiado) comparten una parte, y el tercer componente está contenido, por separado, en una segunda parte.

Por lo tanto, en una realización, el kit comprende: a) una primera parte que comprende trombina; b) una segunda parte que comprende fibrinógeno; y c) una tercera parte que comprende el factor tisular recombinante lipiado; y d) un aplicador para aplicar simultáneamente todos los componentes incluidos en el kit.

En otra realización, el kit comprende: a) una primera parte que comprende trombina y factor tisular lipiado; b) una segunda parte que comprende fibrinógeno; c) un aplicador para aplicar simultáneamente todos los componentes incluidos en el kit.

En otra realización, la presente invención proporciona un kit que comprende a) una parte que comprende trombina; b) una segunda parte que comprende fibrinógeno y factor tisular lipiado; y c) un aplicador para aplicar simultáneamente todos los componentes incluidos en el kit.

En otra realización, la presente invención proporciona un kit que comprende una sola parte que contiene la trombina, el fibrinógeno y el factor tisular lipiado.

La trombina, el fibrinógeno y el factor tisular lipiado contenidos en el kit pueden estar en cualquier forma adecuada, tal como en solución, suspensión o en polvo, junto con los excipientes y/o vehículos veterinaria o farmacéuticamente aceptables apropiados.

Además, el kit puede incluir instrucciones para su uso en cualquiera de las aplicaciones mencionadas anteriormente.

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

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

En todavía otra realización, el kit comprende además  $\text{CaCl}_2$ .

En todavía otra realización, el kit comprende además un agente de reticulación y un inhibidor de la fibrinólisis.

En una realización adicional, el kit comprende un agente de reticulación, un inhibidor de la fibrinólisis y  $\text{CaCl}_2$ .

El agente de reticulación, el inhibidor de la fibrinólisis y el  $\text{CaCl}_2$  pueden incluirse en cualquiera de las partes identificadas anteriormente para la trombina, el fibrinógeno y el factor tisular lipiado o, como alternativa, cada uno puede estar en otras partes separadas o pueden estar compartiendo la misma parte del kit.

El kit puede incluir cualquier componente adicional siempre que no afecte negativamente a los perfiles hemostáticos y sellantes de la combinación incluida en el mismo. Dichos componentes adicionales se pueden incluir en cualquiera de las partes identificadas anteriormente para la trombina, el fibrinógeno y el factor tisular lipiado. Como alternativa, cada uno de los "componentes adicionales" del kit puede estar en otras partes separadas o pueden compartir la misma parte del kit.

Preferiblemente, dicho agente de reticulación es FXIII.

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

Ejemplos ilustrativos no limitativos de aplicadores que permiten aplicar simultáneamente todos los componentes incluidos en el kit son jeringas cilíndricas, aplicadores de spray o un dispositivo para dispensar los componentes cuando están en forma de polvo, entre otros.

Un ejemplo de dispositivo dispensador de polvo es el descrito en WO2010/07033.

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. Los signos numéricos relativos a

los dibujos y colocados entre paréntesis en una reivindicación, son solamente para intentar aumentar la comprensión de la reivindicación, y no deben ser interpretados como limitantes del alcance de la protección de la reivindicación. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

5

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Producción de factor tisular recombinante basado en la expresión de la proteína FT de longitud completa modificada con marcador de histidina en levadura (también denominada de aquí en adelante "TT-173")

10

El vector de levadura episomal pTT-10301, descrito en el Ejemplo 1 de WO2008080989 que comprende el gen URA3, el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación de levadura 2  $\mu$ , el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y la señal de terminación de la transcripción de levadura de la fosfoglicerato quinasa, se usó para clonar, bajo el control del promotor GPD, un ADNc de SEC ID N°: 6 que codifica la proteína FT humana madura (aa 33 a 295 de SEC ID N°: 1) con el marcador de His en el extremo 3' y una mutación Asn124Ala que inactiva uno de los posibles sitios de N-glicosilación de la secuencia del FT humano nativa (SEC ID N°: 5).

15

La SEC ID N°: 6 se obtuvo de la siguiente manera. Se amplificó la secuencia de ADNc humano del FT (número de acceso de Genbank BC011029, SEC ID N°: 11) usando los cebadores de secuencia SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8. La secuencia de ADN amplificada resultante fue modificada adicionalmente por mutagénesis dirigida, usando los cebadores de secuencia SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10. Para ello, se usó el kit de mutagénesis dirigida Quick Change (Stratagene), siguiendo el método descrito en los manuales de Stratagene. Con dicha última mutagénesis, se generó la secuencia del FT que contenía la mutación puntual de Asn a Ala en el residuo aminoacídico 124 de la secuencia de la proteína FT.

25

Después de la transformación, se recogieron las cepas de levadura capaces de crecer en un medios libre de uracilo y se analizaron los extractos de levadura para determinar su capacidad para expresar el FT humano mediante el análisis de transferencia Western de los extractos de levadura esencialmente como se describe en WO2008080989. Brevemente, las levaduras, que contenían el plásmido de expresión episomal con una versión modificada del gen codificante de FT (SEC ID N°: 6), se cultivan en un fermentador, y las células resultantes se recogen por centrifugación. Se vuelven a suspender las células recogidas en un tampón de lisis adecuado (fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4) y se someten a lisis a alta presión haciéndolas pasar tres veces a través de un homogeneizador a 1.000 bares de presión, obteniéndose el lisado de fermentación (homogenado de fermentación). Se mantiene fría la suspensión celular sumergiendo el recipiente en un baño de hielo. Tras ello, se elimina el material más pesado del lisado de fermentación mediante centrifugación, obteniéndose así un sobrenadante de extracto de levadura aclarado (CYE). El CYE obtenido de la etapa de homogenización se diluye con tampón de lisis hasta que el contenido total de proteína alcanza una concentración de entre 5-6 mg/ml, y se filtra a través de filtros consecutivos de 0,45  $\mu$ m, 0,2  $\mu$ m y 0,1  $\mu$ m respectivamente para reducir la cantidad de proteínas derivadas de células hospedadoras (HCP) no membranosas y para la obtención de un material más homogéneo en vesículas de FT recombinante.

40

Las vesículas retenidas por microfiltración de 0,1  $\mu$ m tienen diámetros por debajo de 0,2  $\mu$ m. A continuación, para eliminar las trazas de ADN, se trata lo retenido por microfiltración de 0,1  $\mu$ m con 10 U/ml de la endonucleasa Benzonase (Merck) y cloruro de magnesio a una concentración final de 1 mM, se incuba durante 12 horas a 4 °C en un recipiente de vidrio en oscilación a aproximadamente 20 rpm, y se usa para las etapas de enriquecimiento adicionales.

45

Para fraccionar más las diferentes subpoblaciones de vesículas de acuerdo a su tamaño, y eliminar el material celular residual no deseado, se aplica el extracto de levadura aclarado por filtración a una columna de cromatografía de exclusión por tamaño Sephacryl. Tras la separación, las fracciones 2 a 22, correspondientes a las vesículas enriquecidas en FT recombinante, se combinan y se esterilizan por filtración. Tras ello, se añade fosfatidilserina (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 la PS a las vesículas. Como etapa previa, la PS se podría preparar como vesículas multilaminares mediante la resuspensión de los lípidos en una solución tamponada seguida de tratamiento de ultrasonidos, siguiendo el protocolo de Lab Morrissey para la preparación de vesículas de fosfolípidos (SUV) por ultrasonidos. Brevemente: (1) Se dispensan 2,6  $\mu$ mol totales de fosfolípidos (PL) en un tubo de ensayo de vidrio (siendo un tubo de 13 x 100 mm de un tamaño conveniente); (2) En la campana de humos, se seca la mezcla de PL bajo una corriente suave de nitrógeno o argón. Una vez seco, se aplica el sistema de vacío speed-vac durante 60 minutos bajo un alto vacío. (Esto es para eliminar cualquier cloroformo residual); (3) A los PL inferiores secos, se añaden 2,6 ml de una solución HBS a temperatura ambiente y se cubre el extremo del tubo con parafilm. Se deja reposar durante 1 hora a temperatura ambiente; (4) Se somete el tubo a vigorosos movimientos vorticiales para resuspender por completo los PL. El resultado debería ser una suspensión lechosa, uniforme; (5) Se llena el baño de ultrasonidos con agua a temperatura ambiente. Usando un soporte anular y una abrazadera de tubo de ensayo, se

60

suspende el tubo que contiene la suspensión de PL en el baño. El nivel del interior del tubo debe ser igual al del exterior del tubo. Se aplican ultrasonidos hasta que la suspensión cambia de un aspecto lechoso a casi transparente (es decir, un aspecto solo muy ligeramente turbio). Se comprueba cada 10 minutos; y, por lo general, el tiempo de sonicación durará entre 10 y 30 min en total. (Hay que asegurarse de no dejar que el baño se caliente demasiado y de no drenar el baño hasta que se haya enfriado por completo); (6) Se almacena el producto final a 4 °C. El resultado es una suspensión de pequeñas vesículas unilaminares (SUV) que contienen un total de fosfolípidos 1 mM en HBS.

Tras 2 h de incubación, el producto estéril, que contiene vesículas enriquecidas en PS, se divide en alícuotas y se liofiliza. Este material liofilizado se corresponde con el FT<sub>r</sub> usado en los ensayos que se presentan más adelante y consiste en una proteína de SEC ID N°: 5 anclada a una vesícula lipídica altamente enriquecida en PS.

#### Ejemplo 2: Efecto de la adición de FT al SF en la propagación del coágulo en plasma normal y en plasma heparinizado

El SF usado como referencia en el presente ensayo es el comercializado como Tissucol®. 1 ml de Tissucol® contiene: 500 U de trombina humana, 115 mg de fibrinógeno, 3.000 U de aprotinina y 40 µmol de cloruro de calcio.

La combinación de la invención se preparó mediante la adición de 2 ml de Tissucol y 300 ng del FT lipidado obtenido siguiendo el Ejemplo 1.

Para estos estudios, se dispusieron 2,5 ml de plasma normal (plasma combinado de cinco donantes sanos) en un carril de 4 cm de longitud. A continuación, se aplicó 1 ml de la combinación sellante que se iba a ensayar, bien la de referencia (Tissucol®) o la de la presente invención (Tissucol® más FT lipidado), sobre uno de los extremos.

Cada 15 segundos después de la aplicación del producto de ensayo, durante 5 minutos, se determinó el grado de coagulación, a 3 cm de distancia del sitio de aplicación, con la ayuda de un espectrofotómetro. Para ello, se midió la densidad óptica del plasma con un espectrofotómetro (Biotek) a 340 nm. La FIG. 1 muestra el porcentaje de coagulación del SF de referencia (Tissucol®) (cuadrado gris) y el de la combinación de la invención (SF + FT) (triángulo negro), a diferentes momentos después de la aplicación de cada producto, a 3 cm de distancia del sitio de aplicación.

Como se muestra, la combinación de SF + FT ya ha proporcionado el 50 % de la coagulación en el plasma normal tras 105 segundos de la aplicación (FIG. 1A). Sin embargo, cuando se administra el SF solo, es solamente en este punto temporal (105 segundos), cuando se inicia la coagulación. Estas diferencias son más pronunciadas cuando se lleva a cabo un experimento similar con plasma tratado con heparina (Clexane®) a ambos límites de su concentración terapéutica: 0,5 U/ml (FIG 1B) y 1 U/ml (FIG. 1C).

A partir de estos resultados, se puede concluir que la adición de FT lipidado a un SF que comprende FIIa y FI mejora el perfil hemostático a través de la propagación del coágulo.

#### Ejemplo 3: Mejora del efecto hemostático in vivo de un SF tras la adición de FT lipidado

El ensayo realizado es el descrito por Kemal Karakaya et al en The Journal of Trauma Injury, Infection, and Critical Care, 2000, vol. 49 (2), pág. 246-250.

Brevemente, en este estudio, se usaron cincuenta y dos ratas macho (HsdHan WIST, Harlan Interfauna) (380-400 g). Los animales se alojaron en una instalación climatizada (jaulas: 25 x 50 cm. Dos animales por jaula). Se les ofreció alimento (Dieta Global 2014, Harlan Tekland) y agua a voluntad. Los animales se mantuvieron en la Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Unidad Experimental de Investigación con Animales (CEREMET). El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético de Animales Experimentales (CEEa) de la Universidad de Barcelona y el Departamento de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de la Generalitat de Cataluña. Referencia de aprobación: DAAM 5996. Todos los animales recibieron cuidado humano de conformidad con los requisitos de las normativas de bienestar animal de la UE.

Los animales fueron asignados al azar en tres grupos para recibir: ningún tratamiento (n = 15), Tissucol® (n = 21) o Tissucol® más FT lipidado (200 ng/ml) obtenido siguiendo el Ejemplo 1 (Tissucol® + FT, n = 16).

Se anestesiaron los animales con una inyección intramuscular de 100 mg/kg de ketamina. Tras realizar una laparotomía media, se limpió en seco la cavidad abdominal con esponjas de algodón. Se extirpó una parte del hígado con unas tijeras. Como se observó fácilmente una superficie hepática que sangró rápidamente, no se manipuló la superficie sangrante. Se trató la superficie seccionada bien con Tissucol® o con Tissucol® más FT lipidado, o no se trató de acuerdo con la asignación al azar. Tras ello, se dejó que se acumulara la sangre en la

cavidad peritoneal en todos los grupos, y se recogió con pequeñas esponjas de algodón con el fin de evitar que se derramara fuera de la cavidad abdominal. Una vez finalizado el período de estudio, se recogió la sangre derramada en la cavidad abdominal con pequeñas esponjas de algodón. Se calculó la pérdida total de sangre como el peso de las esponjas de algodón empapadas de sangre menos el peso de las esponjas de algodón secas previamente pesadas usadas para cada animal. Los animales se monitorizaron durante 30 min después de la lesión hepática.

Como se muestra en la FIG. 2, la aplicación de Tissucol® (SF) genera una reducción de la pérdida de sangre en comparación con los animales no tratados. Sin embargo, la adición de FT lipídado a Tissucol® (SF) produce un aumento de aproximadamente el 50 % de eficacia con respecto al SF solo.

Se confirmó la significación estadística de los resultados mediante la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls, dan los siguientes valores de p: Tissucol® frente a ausencia de tratamiento: valor de  $p < 0,001$ , Tissucol® frente a Tissucol® + FT lipídado: valor de  $p < 0,01$  y Tissucol® + FT lipídado frente a ausencia de tratamiento: valor de  $p < 0,001$ .

#### Ejemplo 4: Consistencia del coágulo

Se aplicaron cada uno de los SF de referencia y la combinación usada en el Ejemplo 2 sobre uno de los extremos de un carril de 4 cm de longitud que contenía 2,5 ml de plasma tratado con heparina (Clexane®).

Cuando se aplicó la combinación de la invención, se observó que se extendió sustancialmente más rápido por el carril que el sellante de referencia. Además, con la ayuda de una pipeta de punta, se retiraron los coágulos obtenidos con cada una de las combinaciones: el coágulo obtenido con el SF comercial resultó ser frágil y se rompió fácilmente, mientras que el coágulo producido por la aplicación de la combinación de la invención no lo hizo. Esto indicaba que el coágulo obtenido con la combinación de la invención tenía una consistencia mucho mayor que el coágulo obtenido con el Tissucol® de referencia. El hecho de que el coágulo obtenido con la combinación de la invención mostrara una consistencia mucho mejor que el obtenido con la referencia comercial (Tissucol®) significa que se reduce sustancialmente el riesgo de rotura del coágulo asociado a los sellantes derivados de los SF comerciales y, por lo tanto, que es absolutamente eficaz en el sellado de la lesión/herida.

Sin quedar vinculados a la teoría, los presentes inventores creen que el factor tisular se embebe en la red de fibrina formada (debido a la trombina y el fibrinógeno incluidos en la combinación) y que, debido a esta distribución del factor tisular dentro de la red de fibrina, se produce un efecto de expansión del coágulo, dando lugar a un sellado eficaz de la herida o lesión.

#### Ejemplo 5: Perfil hemostático y sellante de las composiciones sellantes exentas de trombina que incluyen factor tisular lipídado

En un intento por determinar las propiedades hemostáticas y sellantes de las composiciones descritas en WO97/29792, se prepararon y analizaron algunas composiciones sellantes libres de trombina por TEM siguiendo las recomendaciones del fabricante (manual de instrucciones de ROTEM®). Se registraron los parámetros MFC (firmeza máxima del coágulo) y G (resistencia del módulo elástico), relacionados con la resistencia global del coágulo.

Para comparar la resistencia del coágulo obtenido con esas composiciones, con el coágulo inducido el coágulo con SFs que contenían FIIa, también se determinaron los mismos parámetros para un SF comercial (Tissucol) y en un SF no comercial.

Las muestras analizadas fueron:

**1:** FII, FV, FVII, FX, FXIII, FI (fuente: plasma combinado obtenido de cinco donantes sanos diferentes) + 200 ng/ml de FT lipídado (fuente: TT-173) + cloruro de calcio 5 mM.

**2:** FII, FV, FVII, FX, FXIII, FI (fuente: plasma combinado obtenido de cinco donantes sanos diferentes) + 200 ng/ml de FT lipídado (fuente: TT-173). + 3 mg/ml de FI (fuente SIGMA ref. F4129) + cloruro de calcio 5 mM.

**3:** FII, FV, FVII, FX, FXIII, FI (fuente: plasma combinado obtenido de cinco donantes sanos diferentes) + 200 ng/ml de FT lipídado (American Diagnostica ref. 4500L) + cloruro de calcio 5 mM.

**4:** FII, FV, FVII, FX, FXIII, FI (fuente: plasma combinado obtenido de cinco donantes sanos diferentes) + 200 ng/ml de FT lipídado (American Diagnostica ref. 4500L) + 3 mg/ml de FI (fuente SIGMA. Ref. F4129) + cloruro de calcio 5 mM.

5: FII: 100 µg/ml, FV: 10 µg/ml, FVII: 0,5 µg/ml, FX: 8 µg/ml, FXIII: 10 µg/ml, FI: 6 mg/ml (fuente: FI (ref. F4129 SIGMA), FII: (ref. HCP-0010 CellSystems), FXIII: (ref. HCXIII-0160 CellSystems), FX (ref. HCX-0050 CellSystems), FV (ref. HCV-0100 CellSystems), FVII (ref. HCVII 0030 CellSystems)) + 200 ng/ml de FT lipídado (fuente: TT-173) + cloruro de calcio 5 mM. La mezcla de los componentes se preparó nueva 10 minutos antes de su uso.

6: FII: 100 µg/ml, FV: 10 µg/ml, FVIIa: 0,5 µg/ml, FX: 8 µg/ml, FXIII: 10 µg/ml, FI: 6 mg/ml (fuente: FI (ref. F4129 SIGMA), FIIa: (ref. HCP-0010 CellSystems), FXIII: (ref. HCXIII-0160 CellSystems), FX (ref. HCX-0050 CellSystems), FV (ref. HCV-0100 CellSystems), FVII (ref. HCVII 0031 CellSystems)) + 200 ng/ml de FT lipídado (fuente: TT-173) + cloruro de calcio 5 mM. La mezcla de los componentes se preparó nueva 10 minutos antes de su uso.

También se determinaron los valores de MFC y G para dos composiciones de SF: Tissucol® comercial y SF no comercial:

SF no comercial, composición por ml:

Fibrinógeno (FI) (ref. F4129. SIGMA): 115 mg  
Trombina (FIIa) (ref. T4648 SIGMA): 500 UI  
Cloruro de calcio: 40 µmol.

Los resultados, que corresponden a los análisis de 400 µl de cada combinación se muestran en la Tabla I (n = 3):

TABLA I

|                           | 1  | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | Tissucol® | SF |
|---------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|----|
| MFC (mm)                  | 29 | 42  | 32  | 40  | 4   | 9   | 94,3      | 83 |
| G (Kdin/cm <sup>2</sup> ) | 2  | 3,6 | 2,3 | 3,3 | 0,2 | 0,5 | 90        | 24 |

De los datos resumidos en la Tabla I, se puede ver que la inclusión del factor tisular lipídado a composiciones sellantes exentas de trombina proporciona composiciones sellantes con valores de MFC (firmeza máxima del coágulo) y G (resistencia del módulo elástico) sustancialmente inferiores a los de las composiciones sellantes de trombina comerciales. En particular, el MFC es al menos un 200 % inferior al MFC de las composiciones de referencia. Por otro lado, el valor G es al menos aproximadamente un 2.000 % inferior al de las composiciones sellantes de trombina comerciales.

Como el experto en la materia sabe, cuanto menores son los valores de MFC y G, peor es el perfil sellante del coágulo. Por lo tanto, mediante la adición de factor tisular lipídado a las composiciones libre de trombina, no se obtiene ninguna mejora en la actividad sellante, y, por lo tanto, el efecto sellante encontrado por los presentes inventores cuando se añade el factor tisular lipídado a las composiciones sellantes de trombina no se puede desprender de las enseñanzas del documento WO97/29792.

#### Ejemplo 6: Análisis del tiempo de coagulación

Otro parámetro relevante para el análisis de la eficacia de un SF es el tiempo requerido por sus diferentes componentes para crear un coágulo estable. Esto se puede cuantificar fácilmente con la ayuda de un coagulómetro. También se incluyó en el ensayo una composición ternaria correspondiente a la presente invención SF + TT-173 (fibrinógeno (FI) (ref. F4129. SIGMA): 115 mg/ml, trombina (FIIa) (ref. T4648 SIGMA): 500 UI/ml, TT-173 (200 ng de FT/ml), 40 µmol/ml de cloruro de calcio).

Los análisis coagulométricos se llevaron a cabo de la siguiente manera: se añadieron alícuotas (200 µl) de las composiciones ensayadas en el Ejemplo 5 o SF + TT-173 a cubetas que contenía una esfera de acero inoxidable. Un agitador magnético incorporado en el coagulómetro (Diagnostica Stago, Inc. NJ, EE.UU.) mueve la esfera de acero hasta que se detiene por el coágulo. Se registró este tiempo, denominado tiempo de coagulación (en segundos). El experimento se detuvo transcurridos 300 segundos. Los resultados se muestran en la Tabla II.

Tabla II

| Muestras  | Tiempo de coagulación |
|-----------|-----------------------|
| SF +TT173 | < 5                   |

|                                     |      |
|-------------------------------------|------|
| Plasma +TT173                       | 14,8 |
| Plasma +TT173+3 mg/ml de FI         | 16,2 |
| Plasma + FTr lipidado               | 24,5 |
| Plasma +FTr lipidado +3 mg/ml de FI | 31,3 |
| FV+FII +FX+FXIII+ FVII +TT173       | 26,5 |
| FV+FII+FX+FXIII+ FVIIa+TT173        | 17,8 |

Como se puede observar en la Tabla II, el tiempo de coagulación inducido por el SF que contenía FIIa muestra un tiempo de coagulación inferior a 5 segundos, mientras que las combinaciones del documento WO97/29792 necesitaron entre 15 y 31 segundos, es decir, al menos un 300 % más de tiempo, para producir suficientes fibras de fibrina que fueran detectadas por el coagulómetro.

En vista de los datos anteriores se puede concluir que la composición de SF ternaria descrita en la invención muestra un coágulo más rápido y resistente en comparación con las composiciones descritas en el documento WO97/29792.

10

#### Ejemplo 7: Capacidad hemostática de la combinación de la invención en muestras de plasma heparinizado

Se añadió un coágulo producido por:

- 15 (a) 30  $\mu$ l de un SF no comercial (véase la composición del Ejemplo 5);  
 (b) 30  $\mu$ l de una combinación ternaria SF + TT173 (véase la composición del Ejemplo 6) o  
 (c) 30  $\mu$ l de una combinación ternaria similar pero que contenía FTr lipidado (200 ng/ml. Fuente: American Diagnostica Ref.4500L) en lugar de TT-173 como fuente de FT.
- 20 a 300  $\mu$ l de plasma heparinizado (0,6 U/ml). A continuación, se determinaron los parámetros de tiempo de coagulación (TC = tiempo desde la aplicación del coágulo hasta la aparición de las primeras redes de fibrina), tiempo de formación del coágulo (TFC = tiempo desde la formación de las primeras redes de fibrina hasta la formación de todo el coágulo) y máxima formación del coágulo (MFC = firmeza del coágulo) por TEM, siguiendo las recomendaciones del fabricante (manual de instrucciones de ROTEM®).

25

Los resultados se resumen en la siguiente Tabla III:

Tabla III

|     | SF    | SF+TT-173 | SF+FTr |
|-----|-------|-----------|--------|
| TC  | 171,6 | 41,3      | 37,5   |
| TFC | --    | 159,6     | 356,5  |
| MFC | 7     | 33,6      | 34,5   |

30

Cabe señalar el hecho de que cuando se usó SF solo, no se obtuvo un coágulo estable en el ensayo. De hecho, tras 40 minutos (que fue el tiempo empleado en el ensayo) solo se detectó el inicio de la formación del coágulo (que requirió 171 segundos).

- 35 Por el contrario, con la inclusión del factor tisular lipidado, la combinación ternaria comenzó la coagulación antes y, en ambos casos, se generó un coágulo estable, mostrando dicho coágulo una alta consistencia (valor de MFC).

El hecho de que la combinación ternaria de la invención sea capaz de generar coágulos consistentes estables en tan breve periodo de tiempo es de gran importancia en situaciones médicas críticas.

40

#### REFERENCIAS CITADAS EN LA SOLICITUD

WO2008080989;

WO2010/07033;

- 45 WO2011131658;

WO97/29792;

Mimms L. T. *et al.*, "Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside", *Biochemistry*, 1981, vol. 20(4), págs. 833-840; y

Kemal Karakaya *et al.*, "Evaluation of a New Hemostatic Agent Ankaferd Blood Stopper in Experimental Liver laceration", *The Journal of Trauma Injury, Infection, and Critical Care*, 2000, vol. 49 (2), pág. 246-250.

LISTADO DE SECUENCIAS

5  
 <110> Thrombotargets Europe SL  
 <120> Composición Sellante  
 10 <130> P2530PC00  
 <150> EP12198839.8  
 <151> 2012-12-21  
 15 <160> 11  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 20 <211> 263  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 25 <221> SOURCE  
 <222> 1..263  
 <223> /mol\_type= "proteína"  
 /organism= "Homo sapiens"  
 30  
 <400> 1  
 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  
 35 20 25 30  
 Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys  
 35 40 45  
 Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val  
 50 55 60  
 40 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  
 Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr  
 100 105 110  
 45 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  
 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  
 165 170 175  
 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val  
 180 185 190  
 55 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu  
 195 200 205  
 Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile  
 210 215 220  
 Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile  
 225 230 235 240  
 60 Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu  
 245 250 255  
 Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser  
 260

```

    <210> 2
5  <211> 6
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
10 <221> SOURCE
    <222> 1..6
    <223> /mol_type= "proteína"
    /note= "epítipo AHGHRP"
    /organism= "secuencias artificiales"
15
    <400> 2

    Ala His Gly His Arg Pro
    1             5

20

    <210> 3
    <211> 14
    <212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <221> SOURCE
    <222> 1..14
30 <223> /mol_type= "proteína"
    /note= "epítipo"
    /organism= "secuencias artificiales"

    <400> 3
35
    Pro Ile His Asp His Asp His Pro His Leu Val Ile His Ser
    1             5             10

40 <210> 4
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

45 <220>
    <221> SOURCE
    <222> 1..7
    <223> /mol_type= "proteína"
    /note= "X puede ser cualquier aminoácido natural"
50 /organism= "secuencias artificiales"

    <400> 4

    Gly Met Thr Cys Xaa Xaa Cys
55 1             5

    <210> 5
    <211> 269
60 <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

    <220>

```

<221> SOURCE

<222> 1..269

<223> /mol\_type= "proteína"

/note= "TF humano maduro con una mutación N124A y una hexahistidina en C terminal"

5 /organism= "secuencias artificiales"

<400> 5

```

    Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
      20      25      30
10 Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
    35      40      45
    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
15 Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
    85      90      95
    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
20 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
    130     135     140
    Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
    145     150     155     160
25 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
    165     170     175
    Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
    180     185     190
    Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
    195     200     205
30 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     240
    Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu
    245     250     255
35 Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser His His His His His His
    260     265

```

<210> 6

<211> 813

40 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> SOURCE

45 <222> 1..813

<223> /mol\_type= "DNA"

/note= "DNA codificante del TF humano maduro con N124A y hexahistidina C-terminal"

/organism= "secuencias artificiales"

50 <400> 6

```

    atgtcaggca ctacaaatac tgtggcagca tataatttaa cttggaaatc aactaatttc      60
    aagacaattt tggagtggga acccaaaccg gtcaatcaag tctacactgt tcaaataagc      120
55 actaagtcag gagattggaa aagcaaatgc ttttacacaa cagacacaga gtgtgacctc      180
    accgacgaga ttgtgaagga tgtgaagcag acgtacttgg cacgggtctt ctctacccg      240
    gcagggaatg tggagagcac cggttctgct ggggagcctc tgtatgagaa ctcccagag      300
60 ttcacacctt acctggagac aaacctcgga cagccaacaa ttcagagttt tgaacaggtg      360
    ggaacaaaag tggcagtgc cgtagaagat gaacggactt tagtcagaag gaacaacact      420
    ttcctaagcc tccgggatgt ttttggcaag gacttaattt atacacttta ttattggaaa      480
    tcttcaagtt caggaaagaa aacagccaaa acaaacacta atgagttttt gattgatgtg      540

```

gataaaggag aaaactactg tttcagtgtt caagcagtga ttccctcccg aacagttaac 600

5 cggaagagta cagacagccc ggtagagtgt atgggccagg agaaagggga attcagagaa 660

atattctaca tcattggagc tgttggtattt gtggtcatca tccttgtcat catcctggct 720

atatctctac acaagtgtag aaaggcagga gtggggcaga gctggaagga gaactcccca 780

10 ctgaatgttt cacatcacca tcaccatcac tag 813

<210> 7  
<211> 33  
15 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> SOURCE  
20 <222> 1..33  
<223> /mol\_type= "DNA"  
/note= "cebador dirección cadena arriba que codifica los primeros aminoácidos del TF maduro que carece del péptido señal y contiene un codón de inicio en marco el ORF de TF, y un sitio de restricción BamHI"  
/organism= "secuencia artificial"

25 <400> 7  
gggatccgca tgtcaggcac taaaatact gtg 33

30 <210> 8  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<221> SOURCE  
<222> 1..50  
<223> /mol\_type= "DNA"  
/note= "cebador dirección cadena abajo que contiene los nucleótidos que codifican la histidina y una nueva señal de terminación TAG, ambos conteniendo un sitio de restricción BamHI"  
40 /organism= "secuencia artificial"

<400> 8  
cggatccgtg tcgacctagt gatggtgatg gtgatgtgaa acattcagtg 50

45 <210> 9  
<211> 33  
<212> DNA  
50 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> SOURCE  
<222> 1..33  
55 <223> /mol\_type= "DNA"  
/note= "cebador"  
/organism= "secuencia artificial"

<400> 9  
60 gtgggaacaa aagtggcagt gaccgtagaa gat 33

<210> 10

```

<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
  <221> SOURCE
  <222> 1..27
  <223> /mol_type= "DNA"
  /note= "cebador"
10 /organism= "secuencia artificial"

  <400> 10
  atcttctacg gtcactgccca cttttgt                27

15
  <210> 11
  <211> 1374
  <212> DNA
  <213> Homo sapiens
20
  <220>
  <221> SOURCE
  <222> 1..1374
  <223> /mol_type= "DNA"
25 /organism= "Homo sapiens"

  <400> 11

  ggggggcgcgcg ccggcccttt atagcgcgcg gggcacccggc tccccaagac tgcgagctcc      60
30 ccgcaccccc tcgcactccc tctggccggc ccaggcgccc ttcagcccaa cctccccagc      120
  ccacgggcg ccacggaacc cgctcgatct cgccgccaac tggtagacat ggagaccct      180
35 gcctggcccc gggtcccgcg ccccgagacc gccgtcgctc ggacgctcct gctcggttg      240
  gtcttcgccc aggtggccgg cgcttcaggc actacaaata ctgtggcagc atataattta      300
  acttggaat caactaatat caagacaatt ttggagtggg aaccctaaacc cgtcaatcaa      360
40 gtctacactg ttcaaataag cactaagtca ggagattgga aaagcaaatg cttttacaca      420
  acagacacag agtgtgacct caccgacgag attgtgaagg atgtgaagca gacgtacttg      480
  gcacgggtct tctcctaccc ggcaggaat gtggagagca ccggttctgc tggggagcct      540
45 ctgtatgaga actccccaga gttcacacct tacctggaga caaacctcgg acagccaaca      600
  attcagagtt ttgaacaggc gggaacaaaa gtgaatgtga ccgtagaaga tgaacggact      660
  ttagtcagaa ggaacaacac tttcctaagc ctccgggatg tttttggcaa ggacttaatt      720
50 tatacacttt attattgaa atcttcaagt tcaggaaaga aaacagccaa aacaaacact      780
  aatgagtttt tgattgatgt ggataaagga gaaaactact gtttcagtgt tcaagcagtg      840
55 attccctccc gaacagttaa ccggaagagt acagacagcc cggtagagtg tatgggccag      900
  gagaaagggg aattcagaga aatattctac atcattggag ctgtggtatt tgtggtcatc      960
  atccttgtca tcctcctggc tatatctcta cacaagtgtg gaaaggcagg agtggggcag      1020
60

```

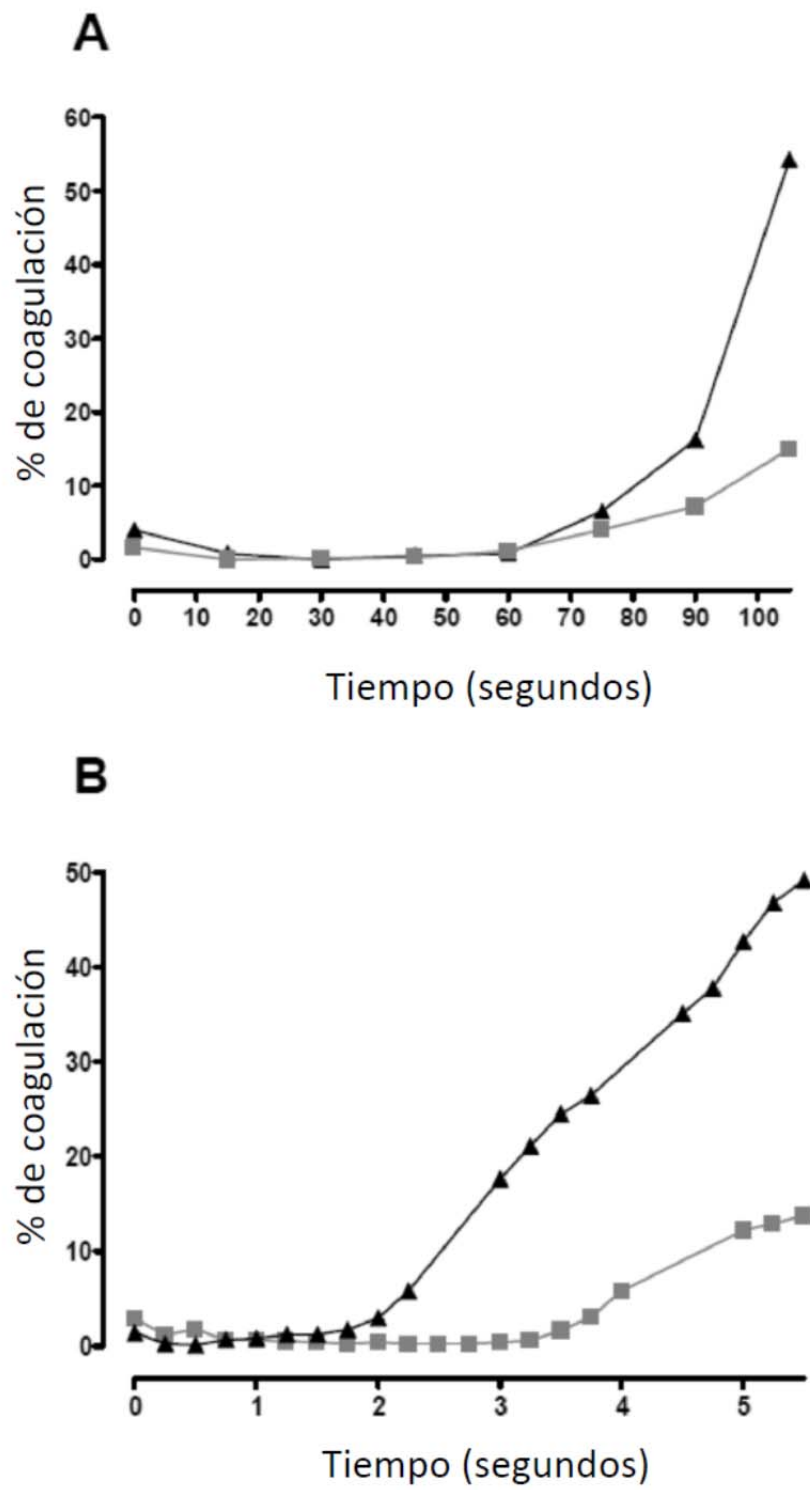
# ES 2 627 053 T3

|    |                                                                   |      |
|----|-------------------------------------------------------------------|------|
|    | agctggaagg agaactcccc actgaatggt tcataaagga agcactgttg gagctactgc | 1080 |
|    | aaatgctata ttgcactgtg accgagaact tttaagagga tagaatacat ggaaacgcaa | 1140 |
| 5  | atgagtattt cggagcatga agaccctgga gttcaaaaaa ctcttgatat gacctgttat | 1200 |
|    | taccattagc attctgggtt tgacatcagc attagtcact ttgaaatgta acaaatggta | 1260 |
|    | ctacaaccaa ttccaagttt taatttttaa caccatggca ccttttgcac ataacatgct | 1320 |
| 10 | ttagattata tattccgccg tcccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa       | 1374 |

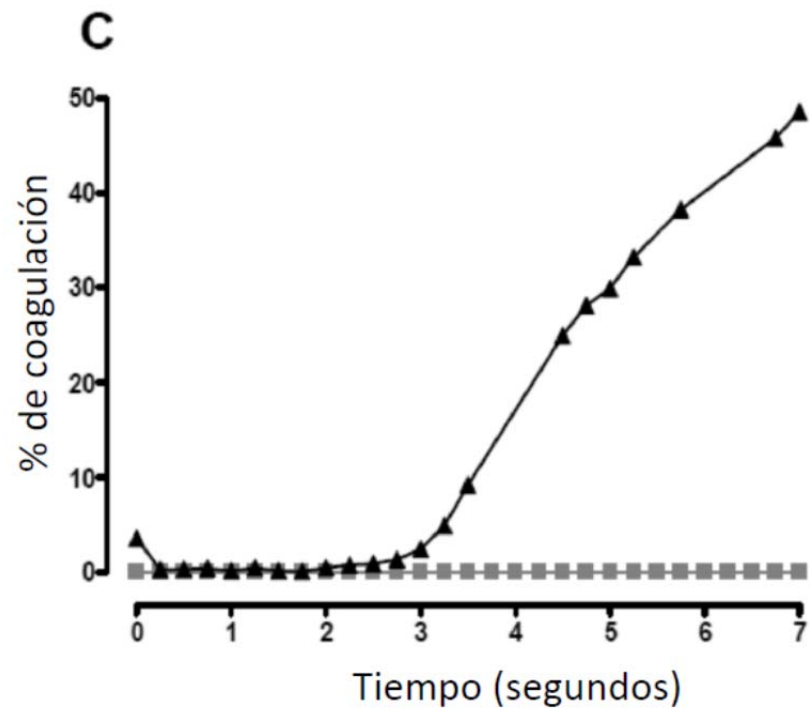
**REIVINDICACIONES**

1. Una combinación que comprende factor tisular lipidado, trombina y fibrinógeno.
- 5 2. La combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos uno de los sitios de N-glicosilación del factor tisular no es funcional.
3. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que dicho factor tisular es una
- 10 proteína de fusión que comprende una primera porción que comprende la proteína de factor tisular y una segunda porción que comprende otro péptido o proteína.
4. La combinación de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la segunda porción es un marcador.
- 15 5. La combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la proteína de fusión tiene una primera porción que comprende la proteína de factor tisular humana madura, con al menos uno de los sitios de N-glicosilación no funcional, y una segunda porción que comprende un marcador de histidina.
6. La combinación de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la proteína de fusión corresponde a SEC ID N° 5.
- 20 7. La combinación de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el FT lipidado está insertado en una microvesícula.
8. La combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la trombina es trombina humana.
- 25 9. La combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el fibrinógeno es fibrinógeno humano.
10. Una composición sellante que comprende la combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un material de soporte.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, junto con otros excipientes y/o portadores veterinaria o farmacéuticamente aceptables apropiados.
- 35 12. Uso de la combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o de la composición de acuerdo con la reivindicación 10 como agente sellante.
13. La combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o de la composición de acuerdo con la reivindicación 10-11 para su uso como un medicamento.
- 40 14. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-11 para su uso en el tratamiento de hemorragias.
15. Un kit que comprende la combinación según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un aplicador
- 45 que permite la aplicación simultánea de todos los componentes que forman la combinación.

**FIG.1**



**FIG. 1 (Continuación)**



**FIG. 2**

