

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 191**

51 Int. Cl.:

A61K 38/55	(2006.01)	A61L 33/12	(2006.01)
A61K 38/57	(2006.01)	A61K 38/58	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)		
C07K 16/36	(2006.01)		
A61P 9/10	(2006.01)		
A61K 38/16	(2006.01)		
A61K 38/17	(2006.01)		
A61K 31/727	(2006.01)		
C07K 16/40	(2006.01)		
A61L 33/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2012 PCT/EP2012/054149**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12120128**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012 E 12707782 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2683397**

54 Título: **Inhibidores de Factor XII para la administración con procedimientos médicos que comprenden contacto con superficies artificiales**

30 Prioridad:

09.03.2011 EP 11157557
09.03.2011 US 201161450881 P
14.06.2011 US 201161496740 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.12.2017

73 Titular/es:

CSL BEHRING GMBH (100.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE

72 Inventor/es:

ZEITLER, STEFAN;
NOLTE, MARC.;
SCHULTE, STEFAN;
DICKNEITE, GERHARD. y
PRAGST, INGO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 646 191 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

Inhibidores de Factor XII para la administración con procedimientos médicos que comprenden contacto con superficies artificiales

Campo

5 La presente solicitud se refiere al uso de inhibidores de FXII/FXIIa en procedimientos médicos que comprenden poner sangre en contacto con superficies artificiales. Ciertas realizaciones se refieren a la terapia anticoagulante de pacientes que necesitan procedimientos quirúrgicos que requieren bombas de derivación cardiopulmonar (CPB, por sus siglas en inglés) donde el nuevo uso de inhibidores del factor de coagulación FXII/FXIIa reduce o reemplaza la necesidad de administrar heparina/bivalirudina durante procedimientos de CPB. En ciertas realizaciones, se recubre la superficie artificial con el inhibidor de FXII.

Antecedentes

15 Las lesiones de la pared vascular y las superficies artificiales desencadenan la adhesión y agregación repentinas de las plaquetas sanguíneas, seguidas de la activación del sistema de coagulación plasmática y la formación de trombos que contienen fibrina, que ocluyen el lugar de la lesión. Estos mecanismos son cruciales para limitar la pérdida sanguínea postraumática, pero pueden también ocluir vasos enfermos lo que conduce a isquemia e infarto de órganos vitales u oclusión de las membranas de CPB.

20 En el modelo de cascada clásico, la coagulación sanguínea tiene lugar mediante una serie de reacciones que implican la activación de zimógenos mediante proteólisis limitada que culmina con la generación de trombina, la cual convierte el fibrinógeno plasmático en fibrina y activa las plaquetas. A su vez, las plaquetas que se adhieren a colágeno o fibrina facilitan la generación de trombina en varios órdenes de magnitud mediante la exposición de fosfolípidos procoagulantes (principalmente fosfatidilserina) en su superficie exterior, lo que propaga el ensamblaje y la activación de complejos de proteasas de coagulación y mediante la interacción directa entre los receptores de plaquetas y los factores de coagulación.

25 Existen dos vías convergentes para la coagulación que están desencadenadas por componentes extrínsecos (pared vascular) o intrínsecos (transportados por la sangre) del sistema vascular. La vía "extrínseca" es iniciada por el complejo del factor VII plasmático (FVII) con la proteína integral de membrana factor tisular (TF), un cofactor de la coagulación esencial que se encuentra ausente en la superficie luminal pero fuertemente expresado en las capas subendoteliales del vaso y que es accesible o se libera a través de una lesión tisular. El TF expresado en microvesículas circulantes podría contribuir también a la propagación de trombos sustentando la generación de trombina en la superficie de las plaquetas activadas.

30 La vía "intrínseca" o "vía de activación por contacto" se inicia cuando el factor XII (FXII, factor Hageman) entra en contacto con superficies cargadas negativamente en una reacción que involucra al quinínogeno de alto peso molecular y la calicreína plasmática. El FXII puede ser activado por constituyentes macromoleculares de la matriz subendotelial tales como glicosaminoglicanos y colágenos, sulfátidos, nucleótidos y otros polianiones solubles o materiales no fisiológicos tales como vidrio o polímeros. Uno de los activadores por contacto más potentes es el caolín y esta reacción sirve como base mecánica para la principal prueba de coagulación clínica, el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT, por sus siglas en inglés), que mide la función de coagulación de la vía "intrínseca". En las reacciones propagadas por las plaquetas, el FXII activado (FXIIa) activa a continuación el FXI a FXIa y posteriormente el FXIa activa el FIX a FIXa. El complejo de FVIIIa, donde dicho FVIIIa ha sido activado previamente por trazas de FXa y/o trombina, y FIXa (el complejo tenasa) posteriormente activa el FX a FXa. A pesar de su elevada potencia para inducir la coagulación sanguínea *in vitro*, la importancia (patofisiológica) de la vía de coagulación intrínseca desencadenada por FXII viene cuestionada por el hecho de que las deficiencias hereditarias de FXII así como de quinínogeno de alto peso molecular y calicreína plasmática no están asociadas con complicaciones hemorrágicas graves. Esto, junto con la observación de que los humanos y ratones que carecen de constituyentes de la vía extrínseca tales como TF y FVII padecen hemorragias graves, ha conducido a la hipótesis actual de que para el cese de la hemorragia *in vivo* puede que se requiera exclusivamente la cascada extrínseca (Mackman, N. 2004. *Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 101 5-1 022).

50 En algunas afecciones patológicas, la cascada de coagulación se puede activar de forma inapropiada, lo que da lugar a continuación a la formación de tapones que actúan de forma hemostática en el interior de los vasos sanguíneos. Por ende, los vasos pueden ocluirse y el suministro de sangre a los órganos distales es limitado. Además, los trombos formados se pueden desprender y producir embolias en otras partes del cuerpo, lo que da lugar a oclusión isquémica. Este proceso se conoce como tromboembolismo y está asociado con una elevada mortalidad.

55 En el documento WO20061066878, se propone el uso de anticuerpos contra FXII/FXIIa o el uso de inhibidores de FXII/FXIIa para prevenir la formación y/o estabilización de trombos. Como inhibidores potenciales se han propuesto

antitrombina (AT III), inhibidor de la enzima convertora de angiotensina, inhibidor C1, aprotinina, inhibidor de la proteasa alfa-I, antipaína ([[(S)-I-carboxi-2-feniletil]carbamoil-L-Arg-L-Val-Arginal), acetal dimetilico del Z-Pro-Pro-aldehído, DX88 (Dyax Inc., 300 Technology Square, Cambridge, MA 02139, EE. UU.; citado en: Williams A y Baird LG.2003. *DX-88 and HAE: a developmental perspective. Transfus Apheresis Sci.* 29:255-258), leupeptina, inhibidores de proliloligopeptidasa tales como Fmoc-Ala-Pyr-CN, inhibidores de tripsina de maíz, mutaciones del inhibidor de tripsina pancreática bovina, ecotina, proteína anticoagulante de limanda japonesa, inhibidor v de tripsina de *Cucurbita maxima*, incluidos iso-inhibidores de *Curcubita maxima* y Hamadarina (según ha sido divulgado por Isawa H *et al.* 2002. *A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XI and high molecular weight kininogen. J. Biol. Chem.* 277:27651-27658).

10 Recientemente, se ha presentado la Infestina-4 como un nuevo inhibidor de FXIIa. Las infestinas son una clase de inhibidores de serínproteasas, derivados del intestino medio del insecto hematófago *Triatoma infestans*, un vector principal del parásito *Trypanosoma cruzi*, del que se tiene constancia que causa la enfermedad de Chagas (Campos ITN *et al.* 32 *Insect. Biochem. Mol. Bio.* 991-997, 2002; Campos ITN *et al.* 577 *FEBS Lett.* 512-516, 2004). Este insecto utiliza estos inhibidores para prevenir la coagulación de la sangre ingerida. El gen de Infestina codifica 4 dominios que dan como resultado proteínas que pueden inhibir diferentes factores de la vía de coagulación. En particular, el dominio 4 codifica una proteína (Infestina-4) que es un potente inhibidor de FXIIa. Se ha administrado Infestina-4 a ratones sin complicaciones hemorrágicas (WO 2008/098720).

20 Debido a que las superficies artificiales pueden desencadenar la vía de activación por contacto, los procedimientos médicos que conllevan poner en contacto sangre con tales superficies artificiales entrañan un riesgo médico considerable. Por lo tanto, el uso de dispositivos protésicos o hemodializadores, que entran en contacto con la sangre, está limitado en gran medida a causa de la activación de la cascada de coagulación intrínseca. Un recubrimiento adecuado de la superficie protésica podría evitar dicho problema en algunos casos, pero en otros podría comprometer su función. Algunos ejemplos de tales dispositivos protésicos son válvulas cardíacas, estents vasculares y catéteres permanentes.

25 En los casos donde se utilizan tales dispositivos, es necesario administrar anticoagulantes tales como heparina para prevenir la formación de fibrina en la superficie.

30 Sin embargo, algunos pacientes son intolerantes a la heparina, lo que puede causar trombocitopenia inducida por heparina (HIT, por sus siglas en inglés) lo que da como resultado agregación plaquetaria y trombosis potencialmente mortal. Además, una desventaja inherente a todos los anticoagulantes utilizados en clínicas es un mayor riesgo de episodios hemorrágicos serios. Por lo tanto, existe una gran necesidad de nuevos tipos de anticoagulantes que no estén asociados con tales complicaciones y que se puedan utilizar en pacientes afectados o como modelo de terapia superior que prevenga la trombosis sin mayores riesgos hemorrágicos (Renne T *et al.* 2005. *Defective thrombus formation in mice lacking factor XII. J. Exp. Med.* 202:271-281).

35 Un procedimiento médico que conlleva una activación por contacto masiva es la derivación cardiopulmonar (CPB). Actualmente, los dispositivos de CPB en cirugía cardíaca se utilizan por dos razones: a) mantenimiento artificial de la circulación sanguínea durante la cardioplegia de los pacientes que se están sometiendo a una cirugía cardíaca (función bombeadora) y b) oxigenación artificial de la sangre durante la cardioplegia de los pacientes que se están sometiendo a una cirugía cardíaca (función oxigenadora) mediante oxigenación con membrana semipermeable.

40 Debido al mantenimiento artificial del flujo sanguíneo mediante la función bombeadora, la sangre del paciente se hace pasar por una membrana semipermeable (~3 m², superficie artificial) que permite que el oxígeno pase a través de la membrana y se una a los eritrocitos a la vez que la sangre en sí se mantiene en el sistema cerrado de circulación artificial. Esta oxigenación artificial es vital para el paciente y requiere una estrategia de anticoagulación durante la CPB (H. P. Wendl *et al.* 1996; *Immunopharmacology*; C. Sperling *et al.*, *Biomaterials* 30 (2009)). Los dispositivos de DPB utilizados actualmente tienen hasta 3 m² de superficie artificial que conduce a una activación por contacto masiva del sistema de coagulación, el sistema inflamatorio, así como la activación del sistema del complemento. Con el fin de minimizar estos efectos en los sistemas de cascada mencionados, se utilizan biomateriales poliméricos de diferente tipo (p. ej., 2-metilacriloxietilfosforilcolina, MCP) (Yu J *et al.*; *Int J Artif Organs* 1994; 17: 499-504; C. Sperling *et al.* *Biomaterials* 30 (2009) 4447-4456). A pesar del hecho de que se utilizan nuevos materiales superficiales como la fosforilcolina polar que son menos trombogénicos, continúa siendo necesario anticoagular a los pacientes que se están sometiendo a un CPB con heparina/bivalirudina, ya que una reacción mediada por plaquetas conduciría inmediatamente a una oclusión del oxigenador de CPB con un desenlace fatal para el paciente.

Actualmente existen dos productos autorizados para la anticoagulación durante CPB:

55 a) Heparina:

La heparina se administra al paciente de manera ajustada al peso corporal (300-400 UI/kg de peso corporal (PC)

poco antes de conectar los dispositivos de CPB para prevenir que la sangre del paciente coagule. La CPB en sí también se carga con heparina antes de conectarla al paciente. Esta es la única estrategia de anticoagulación que permite operaciones de CPB con oxigenación artificial durante todo el procedimiento sin un desenlace fatal inmediato para el paciente. Durante este procedimiento, la capacidad de coagulación se monitoriza mediante el tiempo de coagulación activada (ACT, por sus siglas en inglés) durante la cirugía (valor normal 100-120 s; durante la operación 300-500 s). Mediante la medición del ACT el facultativo puede dirigir la dosificación de heparina de manera semicuantitativa. La heparina se une a AT (ATIII) y construye un complejo de inhibición rápida que inactiva el sistema de coagulación. Las heparinas de bajo peso molecular (LMWH, por sus siglas en inglés) inhiben principalmente el complejo protrombinasa (factor X, factor Va, Ca²⁺, fosfolípidos), mientras que las heparinas no fraccionadas (UFH, por sus siglas en inglés) también inhiben el factor II y, por tanto, reaccionan más deprisa que las LMWH. Además, los factores IX, XI, XII y la calicreína se inactivan mediante heparinas.

Tras la CPB, es necesario antagonizar el efecto de la heparina mediante protamina (1 mg/100 UI de heparina), ya que un potencial episodio hemorrágico podría tener un desenlace fatal para el paciente.

Las mayores limitaciones de este estándar de atención médica son:

- i) La cantidad de heparina en la sangre del paciente no se correlaciona con el ACT (Gruenwald *et al.*, 2010; *the Journal of Extra Corporeal Technology*), por lo tanto, continúa habiendo un riesgo de que el paciente se encuentre en un estado de hipo- o hipercoagulopatía.
- ii) La heparina puede inducir trombocitopenia (HIT 1, causada por heparina mediante activación directa de trombocitos, o HIT 2, causada por acumulaciones de heparina y factor plaquetario 4, y el sucesivo desarrollo de anticuerpos contra los complejos).
- iii) La ventana temporal entre la antagonización de heparina tras la CPB y el comienzo de la terapia anticoagulante de los pacientes en una unidad de cuidados intensivos (UCI) continúa siendo un factor de riesgo de episodios trombóticos o hemorrágicos.
- iv) La protamina, como antídoto para el efecto de la heparina, en sí aumenta el riesgo de episodios trombóticos, reacciones alérgicas graves y caídas de presión sanguínea fatales. Una segunda administración de protamina más adelante en caso de infradosis podría tener un desenlace fatal para el paciente.

b) Bivalirudina:

La bivalirudina (derivada de la hirudina) está registrada para su uso en pacientes con HIT conocida como alternativa a la anticoagulación mediante heparina. Las limitaciones de esta terapia alternativa son:

- i) No existe antídoto clínico registrado disponible por el momento en caso de hemorragia.
- ii) Mayor consumo de productos sanguíneos durante la CPB con los riesgos posoperatorios resultantes (C. Dyke *et al.*; *surgery for acquired cardiovascular disease* 2005).

En la presente solicitud se descubrió, sorprendentemente, que el uso de inhibidores de FXII/FXIIa previene la coagulación, a la vez que el riesgo hemorrágico durante y después de procedimientos de CPB no se potencia en los procedimientos médicos que comprenden poner en contacto la sangre de un paciente con superficies artificiales, que en ciertas realizaciones se encuentran fuera del cuerpo. Por lo tanto, es necesario administrar únicamente una cantidad reducida de otros anticoagulantes además del inhibidor de FXII/FXIIa. En una realización, la adición de otros anticoagulantes además del inhibidor de FXII/FXIIa se puede evitar por completo. Esto conduce a procedimientos médicos más seguros, al evitarse el mayor riesgo de hemorragia que es inherente a la terapia actual, así como complicaciones al revertir la anticoagulación.

Compendio de ciertas realizaciones

La solicitud proporciona un inhibidor de FXII/FXIIa para su uso en la prevención de la formación y/o estabilización de trombos durante y/o después de un procedimiento médico llevado a cabo en un sujeto humano o animal que comprende poner en contacto sangre de dicho sujeto humano o animal con superficies artificiales, donde dicho inhibidor de FXII/FXIIa se administra antes y/o durante y/o después de dicho procedimiento médico. En ciertas realizaciones, el contacto entre la sangre de dicho sujeto y la superficie artificial tiene lugar fuera del cuerpo del sujeto. En una realización de la invención, la superficie artificial se expone a al menos un 80%, 90% o 100% de la sangre del sujeto humano o animal. En otra realización, el volumen de un 80%, 90% o 100% de la sangre del sujeto humano o animal entra en contacto con la superficie artificial en menos de 30 minutos, menos de 15 minutos, menos de 10 minutos o menos de 5 minutos. En otra realización, la superficie artificial sirve como recipiente para la sangre fuera del cuerpo humano o animal, y dicha sangre puede encontrarse en una cantidad de al menos 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL o más. En una realización, la superficie artificial que se expone a la sangre del

paciente es de al menos 0.2 m². En algunas realizaciones, el área de superficie artificial es de al menos 0.1 m² o al menos 0.5 m². En otra realización, la superficie artificial excluye retractores, agujas, escalpelos y otro instrumental quirúrgico rutinario que solo entre en contacto con una fracción de la sangre del sujeto.

5 Otra realización incluye un inhibidor de FXII/FXIIa para su uso en la prevención de la formación y/o estabilización de trombos durante y/o después de un procedimiento médico llevado a cabo en un sujeto humano o animal que comprende poner en contacto la sangre de dicho sujeto humano o animal con superficies artificiales, donde dicho inhibidor de FXII/FXIIa se administra antes y/o durante y/o después de dicho procedimiento médico y, además, donde

- 10
- i) la superficie artificial se expone a al menos un 80% del volumen de sangre del sujeto y la superficie artificial es de al menos 0.2 m² o
 - ii) la superficie artificial es un recipiente para la recolección de la sangre fuera del cuerpo del sujeto o
 - iii) la superficie artificial es un estent, válvula, catéter intraluminal o un sistema para el bombeo de sangre asistido interno.

15 Otra realización se refiere a un inhibidor de FXII/FXIIa para su uso en la prevención de la formación y/o estabilización de trombos durante y/o después de un procedimiento médico llevado a cabo en un sujeto humano o animal que comprende poner en contacto la sangre de dicho sujeto humano o animal con superficies artificiales, donde dicho inhibidor de FXII/FXIIa se administra antes, durante y/o después de dicho procedimiento médico, y donde dicho sujeto humano o animal no presenta un mayor riesgo hemorrágico o donde dicho sujeto humano o animal presenta un riesgo hemorrágico reducido en comparación con el riesgo hemorrágico asociado con la

20 administración de heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta. Preferentemente, el riesgo hemorrágico no es mayor.

25 Otra realización se refiere a un inhibidor de FXII/FXIIa para su uso en la prevención de la formación y/o estabilización de trombos durante y/o después de un procedimiento médico llevado a cabo en un sujeto humano o animal que comprende poner en contacto la sangre de dicho sujeto humano o animal con superficies artificiales, donde dicho inhibidor de FXII/FXIIa se administra antes, durante y/o después de dicho procedimiento médico, y donde dicho sujeto humano o animal no presenta un mayor riesgo hemorrágico y donde en dicho sujeto humano o animal i) el tiempo de hemorragia según Duke en la oreja o en la yema del dedo no es más largo de 10 minutos o ii) el tiempo de hemorragia según el método de Ivy no es más largo de 10 minutos o iii) el tiempo de hemorragia según el método de Marx no es más largo de 4 minutos.

30 En ciertas realizaciones, el procedimiento médico es

- i) cualquier procedimiento que requiera una derivación cardiopulmonar o
- ii) la oxigenación y bombeo de sangre mediante oxigenación con membrana extracorpórea o
- iii) el bombeo de sangre asistido (interno o externo) o
- iv) la diálisis de sangre o
- 35 v) la filtración de sangre extracorpórea o
- vi) la recolección de sangre en cualquier depósito para su uso posterior en un sujeto humano o animal o
- vii) el uso de uno o varios catéteres intraluminales venosos o arteriales o
- viii) el uso de uno o varios dispositivos para cateterismo cardiaco intervencionista o diagnóstico, o
- 40 ix) el uso de uno o varios dispositivos intravasculares o
- x) el uso de injertos artificiales.

45 En otra realización, se proporciona un dispositivo médico, donde el dispositivo médico se recubre con un inhibidor de FXII/FXIIa. El dispositivo médico puede ser una máquina de derivación cardiopulmonar, un sistema de oxigenación con membrana extracorpórea para la oxigenación de sangre, un dispositivo para el bombeo asistido de sangre, un dispositivo de diálisis de sangre, un dispositivo para la filtración extracorpórea de sangre, un depósito para su uso en la recolección de sangre, un catéter intraluminal, un estent, una válvula cardíaca artificial y/o accesorios para cualquiera de estos dispositivos, incluidos tubos, cánulas, bomba centrífuga, válvulas, puertos de acceso venoso, desviadores, etc.

50 En una realización, el inhibidor de FXII/FXIIa se administra antes, después y/o durante un procedimiento médico que comprende la recolección de sangre en cualquier depósito para su uso posterior en un sujeto humano o animal. En una realización, el inhibidor de FXII/FXIIa se administra al donante de sangre antes y/o durante el proceso de donación de sangre.

55 En otra realización, el inhibidor de FXII/FXIIa se mezcla con la sangre en el depósito de recolección. En otra realización más, el inhibidor de FXII/FXIIa se dispone en el depósito de recolección antes de la recolección de la sangre y la superficie interna del depósito puede estar recubierta con él. En otra realización, el inhibidor de FXII/FXIIa se administra al receptor de la sangre antes, durante y/o después de que se administre la sangre al

receptor humano o animal.

En otras realizaciones, el inhibidor de FXII/FXIIa se administra con heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta, donde se añade una cantidad reducida de heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta además del inhibidor de FXII/FXIIa antes y/o durante y/o después del procedimiento médico en comparación con la cantidad de heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta que se administra normalmente antes y/o durante dicho procedimiento médico cuando no se administra inhibidor de FXII/FXIIa. La expresión “se administra con” indica que se administra al mismo tiempo (en una formulación única o dos formulaciones separadas) o se administra en el plazo de 1 minuto, 5, 10, 15, 30 o 45 minutos, o 1 hora, 2, 3, 4, 5 o 6 horas, o se administra en momentos diferentes, pero para los mismos procedimientos médicos. Cualquier agente se puede administrar en primer lugar.

Los derivados de heparina están integrados por un grupo de productos derivados de la heparina, producidos mediante una o más modificaciones químicas. Por ejemplo, la heparina sulfatada es un derivado en el que todos los grupos hidroxilo primarios en los residuos de glucosamina y una amplia proporción de grupos hidroxilo secundarios en las unidades de disacárido se han sustituido por ésteres O-sulfato; la heparina con carboxilo reducido es un derivado en el que los grupos carboxílicos de los residuos de ácido urónico de la heparina se han reducido a alcoholes; la heparina oxidada con peryodato es un derivado en el que todos los residuos de ácido urónico no sulfatados de la heparina se oxidan con ácido peryódico. Otros derivados de heparina incluyen, por ejemplo, heparina O-desulfatada, heparina 2-O-desulfatada, heparina completamente N-acetilada, heparina completamente N-sulfatada, heparina N-desulfatada, heparina N-deacetilada. Los derivados de hirudina también pueden contener modificaciones químicas, que son del péptido de hirudina, o los derivados pueden ser análogos sintéticos del péptido de hirudina y/o pueden comprender el péptido de hirudina conectado a, por ejemplo, una molécula portadora, que se puede utilizar, por ejemplo, para aumentar la semivida de la hirudina. Algunos ejemplos de derivados de hirudina incluyen lepirudina y desirudina. Los derivados de hirudina se caracterizan por que se unen al sitio catalítico activo de la trombina.

En una realización, la heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta que se administran con el inhibidor de FXII/FXIIa se administran en una cantidad reducida de modo que el ACT sin el inhibidor de FXII/FXIIa sea inferior a 500 segundos.

En otra realización, el inhibidor de FXII/FXIIa se administra en un procedimiento médico sin la administración de heparina o un derivado de esta y/o la administración de hirudina o un derivado de esta.

En una realización, el sujeto humano o animal tiene un riesgo protrombótico reducido o nulo después del procedimiento médico. En otra realización, el sujeto humano o animal tiene un riesgo protrombótico reducido o nulo a continuación del antagonismo posoperatorio de la heparina o derivados de esta y/o el antagonismo posoperatorio de la hirudina o derivados de esta se previene o reduce utilizando un inhibidor de FXII/FXIIa.

En otra realización, el riesgo protrombótico a continuación del antagonismo posoperatorio de la heparina o derivados de esta y/o el antagonismo posoperatorio de la hirudina o derivados de esta se previene o reduce administrando el inhibidor de FXII/FXIIa antes, durante y/o después de un procedimiento médico, donde se añade una cantidad reducida o nula de antagonista de heparina y/o antagonista de hirudina después del procedimiento médico en comparación con la cantidad de dicho antagonista que se administra normalmente después de dicho procedimiento médico cuando no se administra inhibidor de FXII/FXIIa.

En una realización, el inhibidor de FXII/FXIIa, que se utiliza de acuerdo con la invención actual, comprende

- i) la secuencia polipeptídica de Infestina-4 de origen natural (SEQ ID NO:1) o una variante de esta, donde una variante comprende
 - a) los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural y al menos una y hasta cinco mutaciones aminoacídicas fuera de dichos aminoácidos N-terminales que dan lugar a diferencias respecto a la secuencia de Infestina-4 de origen natural; y/o
 - b) seis residuos de cisteína conservados de la secuencia de Infestina-4 de origen natural y una homología de al menos un 70% respecto a la secuencia de Infestina-4 de origen natural.
- ii) el SPINK-1 (SEQ ID NO:2), que se muta para incluir los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural o una variante de dicho SPINK-1 mutado, donde una variante comprende
 - a) los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural y al menos una y hasta cinco mutaciones aminoacídicas fuera de dichos aminoácidos N-terminales que dan lugar a diferencias respecto a la secuencia de SPINK-1 de origen natural y que aumentan la homología de la variante respecto a la secuencia de Infestina-4 de origen natural; y/o

b) seis residuos de cisteína conservados de la secuencia de SPINK-1 de origen natural y una homología de al menos un 70% respecto a la secuencia de SPINK-1 de origen natural.

iii) un anticuerpo anti-FXII/FXIIa, donde el anticuerpo se une a FXII/FXIIa e inhibe su actividad y/o activación.

5 En una realización, el inhibidor de FXII/FXIIa, que se utiliza de acuerdo con la invención actual, se conecta a un polipéptido que aumenta la semivida, donde el péptido que aumenta la semivida es opcionalmente albúmina, afamina, alfa-fetoproteína o proteína de unión a la vitamina D, albúmina humana o una variante de esta, una inmunoglobulina o una variante de esta, un Fc de una IgG. En otra realización dicho polipéptido que aumenta la semivida está conectado al inhibidor de FXII/FXIIa a través de un conector.

Descripción de los dibujos

10 Figura 1: El tiempo de coagulación de sangre completa *ex vivo* (WBCT, por sus siglas en inglés) de sangre completa porcina se puede prolongar drásticamente tras añadirle el inhibidor de FXII/FXIIa rHA-Infestina-4. El volumen requerido de rHA-Infestina-4 se proporcionó en una jeringa. A continuación, la sangre completa porcina se añadió hasta un volumen total de 500 μ L, se mezcló con cuidado y después se proporcionó en un vial de vidrio precalentado. El tiempo de coagulación se determinó visualmente agitando con cuidado el vial de vidrio cada minuto (incubación a 37 °C en un baño de agua). Los datos se presentan en forma de media + error estándar de la media. N = sangre completa de 2-3 cerdos a cada concentración.

15 Figura 2: El WBCT *ex vivo* de sangre completa murina se puede prolongar tras añadirle un anticuerpo monoclonal anti-FXII/FXIIa (MAb, por sus siglas en inglés). El volumen requerido de un MAb anti-FXII/FXIIa se proporcionó en una jeringa. A continuación, la sangre completa murina se añadió hasta un volumen total de 500 μ L, se mezcló con cuidado y después se proporcionó en un vial de vidrio precalentado. El tiempo de coagulación se determinó visualmente agitando con cuidado el vial de vidrio cada minuto (incubación a 37 °C en un baño de agua). Los datos se presentan en forma de media + error estándar de la media. N = sangre completa de 3 ratones a cada concentración.

20 Figura 3: El WBCT *ex vivo* de sangre completa porcina se prolonga notablemente tras una única administración intravenosa (i.v.) de rHA-Infestina-4. En momentos específicos tras la administración, se tomó sangre de los animales y se proporcionó en un vial de vidrio precalentado. El tiempo de coagulación se determinó visualmente agitando con cuidado el respectivo vial de vidrio cada minuto (incubación a 37 °C en un baño de agua).

Figura 4: El aPTT de sangre porcina se prolongó notablemente después de la administración de rHA-Infestina-4 en comparación con el control negativo.

25 Figura 5: el PT de sangre porcina solo se prolongó marginalmente después de la administración de dosis más elevadas de rHA-Infestina-4 en comparación con la prolongación del aPTT.

Figura 6: El tiempo de hemorragia cutánea porcina permaneció en el intervalo normal (~2-5 min) después de que se administrara rHA-Infestina 4. Este efecto duró hasta el final del experimento.

Figura 7: La circulación extracorpórea en el modelo porcina se llevó a cabo según el gráfico mostrado en la figura 7.

30 Figura 8: Después de la administración de rHA-Infestina-4, el aPTT de la sangre porcina continuó siendo notablemente prolongado durante todo el experimento de circulación extracorpórea.

Figura 9: El PT de la sangre porcina solo fue afectado ligeramente después de la administración de rHA-Infestina-4 durante el experimento extracorpóreo.

35 Figura 10: El WBCT *ex vivo* de la sangre porcina se prolonga a lo largo de todo el experimento extracorpóreo tras una única administración i.v. de rHA-Infestina-4. En momentos específicos, se tomó sangre de este animal y se proporcionó en un vial de vidrio precalentado. El tiempo de coagulación se determinó visualmente agitando con cuidado el vial de vidrio cada minuto (incubación a 37 °C en un baño de agua).

40 Figura 11: Sitios de contacto del inhibidor de *R. prolixus* con trombina y de SPINK-1 con quimotripsina. # indica los aminoácidos que son sitios de contacto entre el inhibidor de *R. prolixus* y la trombina; + indica aminoácidos que son sitios de contacto entre SPINK-1 y la quimotripsina.

Figura 12: Similitud entre la secuencia de aminoácidos de Infestina-4 (14) y SPINK-1 (SP). * indica aminoácidos idénticos; | indica aminoácidos similares; los aminoácidos en negrita son cisteínas conservadas; los aminoácidos subrayados 2-13 de la secuencia de Infestina-4 son conservados.

45 Figura 13: Secuencias de aminoácidos de Infestina-4, SPINK1 y tres variantes de SPINK1 (K1, K2 y K3). * indica aminoácidos idénticos; | aminoácidos similares respecto a la secuencia de Infestina-4. La secuencia subrayada de 14 se utilizó para reemplazar 15 aminoácidos de SPINK-1 para generar K1. Las variantes K2 y K3 se generaron

mediante mutaciones puntuales adicionales (aminoácidos subrayados) en la secuencia de K1.

Descripción detallada

Un inhibidor de FXII/FXIIa se refiere a inhibidores de cualquiera de entre Factor XII y Factor XII activado (FXIIa) o ambos.

5 La solicitud proporciona un inhibidor de FXII/FXIIa para su uso en la prevención de la formación y/o estabilización de trombos durante y/o después de un procedimiento médico llevado a cabo en un sujeto humano o animal que comprende poner en contacto sangre de dicho sujeto humano o animal con superficies artificiales, donde dicho inhibidor de FXII/FXIIa se administra antes, durante y/o después de dicho procedimiento médico.

10 Una superficie artificial es cualquier superficie no humana o no animal que se pone en contacto con la sangre durante un procedimiento médico y que conduce a la activación por contacto del Factor XII al Factor XIIa. En ciertas realizaciones, el contacto entre la sangre del sujeto y la superficie artificial tiene lugar fuera del cuerpo del sujeto. A modo de ejemplo no limitante tales superficies artificiales pueden ser acero, cualquier tipo de plástico, vidrio, silicona, goma, etc. En una realización, la superficie artificial se expone a al menos un 80%, 90% o 100% de la sangre del sujeto humano o animal. En otra realización, el volumen de un 80%, 90% o 100% de la sangre del sujeto humano o animal entra en contacto con la superficie artificial en menos de 30 minutos, menos de 15 minutos, menos de 10 minutos o menos de 5 minutos. En otra realización, la superficie artificial sirve como recipiente para la sangre fuera del cuerpo humano o animal, y dicha sangre puede encontrarse en una cantidad de al menos 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL o más. En una realización, la superficie artificial que se expone a la sangre del paciente es de al menos 0.2 m². En una realización, el volumen total de la sangre del paciente se expone a la superficie artificial, que es de al menos 0.2 m². En algunas realizaciones, el área de superficie artificial es de al menos 0.1 m² o de al menos 0.5 m². En otra realización, la superficie artificial excluye retractores, agujas, escalpelos y otro instrumental quirúrgico rutinario que solo entra en contacto con una fracción de la sangre del sujeto.

25 En una realización, el inhibidor de FXII/FXIIa se administra antes, durante y/o después del procedimiento médico. En otra realización, el inhibidor de FXII/FXIIa se administra durante el procedimiento médico. En otra realización, se puede administrar también antes de que empiece el procedimiento médico. Puede incluso ser beneficioso que se administre después del procedimiento médico puesto que puede ocurrir una activación por contacto en las superficies artificiales que se han integrado en los vasos durante las operaciones.

30 Otra realización se refiere a un inhibidor de FXII/FXIIa para la prevención de la formación y/o estabilización de trombos durante y/o después de un procedimiento médico llevado a cabo en un sujeto humano o animal que comprende poner en contacto sangre de dicho sujeto humano o animal con superficies artificiales, donde el contacto entre la sangre y la superficie artificial tiene lugar fuera del cuerpo del sujeto, donde dicho inhibidor de FXII/FXIIa se administra antes, durante y/o después de dicho procedimiento médico y donde dicho sujeto humano o animal no tiene un mayor riesgo hemorrágico. En algunas realizaciones, el contacto entre la sangre de dicho sujeto y al menos una parte de la superficie artificial tiene lugar "fuera" del cuerpo del sujeto, que en ciertas realizaciones es al menos 1 cm, o 2 cm, o 3 cm, o 4 cm, o 5 cm, o 10 cm, o 15 cm, o 20 cm, o 50 cm o más lejos del cuerpo del sujeto.

35 Otra realización se refiere a un inhibidor de FXII/FXIIa para la prevención de la formación y/o estabilización de trombos durante y/o después de un procedimiento médico llevado a cabo en un sujeto humano o animal que comprende poner en contacto sangre de dicho sujeto humano o animal con superficies artificiales, donde dicho inhibidor de FXII/FXIIa se administra antes, durante y/o después de dicho procedimiento médico, y donde dicho sujeto humano o animal no tiene un mayor riesgo hemorrágico y donde en dicho sujeto humano o animal, i) el tiempo de hemorragia en la oreja o en la yema del dedo según Duke no es más largo de 10 minutos, no más largo de 8 minutos, no más largo de 6 minutos o no más largo de 5 minutos o ii) el tiempo de hemorragia de acuerdo con el método de Ivy no es más largo de 10 minutos, no más largo de 8 minutos, no más largo de 6 minutos o no más largo de 5 minutos o iii) el tiempo de hemorragia de acuerdo con el método de Marx no es más largo de 4 minutos, no más largo de 3 minutos o no más largo de 2 minutos. Dicho de otro modo: debido a la administración de un inhibidor de FXII/FXIIa.

40 La determinación del riesgo hemorrágico según Duke, Ivy o Marx son solo ejemplos no limitantes de métodos que se pueden utilizar para determinar el riesgo de hemorragia en sujetos humanos o animales. En animales el riesgo de hemorragia también se puede evaluar determinando el tiempo de hemorragia cutánea. Por ejemplo, en cerdos, el tiempo de hemorragia cutánea (SBT, por sus siglas en inglés) se puede definir como el tiempo hasta que cesa la pérdida de sangre desde una incisión estandarizada en el interior de la oreja de 5 mm de longitud por 1 mm de profundidad originada utilizando un dispositivo de corte Surgicutt® (International Technidyne Cop., Edison, Nueva Jersey, EE. UU.).

45 A continuación, se describen los métodos de prueba mencionados anteriormente para humanos, en comparación con esta prueba en animales.

55 El tiempo de hemorragia de acuerdo con el método de Duke se lleva a cabo en el borde del lóbulo de la oreja o en la

5 yema del dedo con un esfigmomanómetro alrededor del brazo superior (40 mm Hg) de un sujeto. El investigador perfora el borde del lóbulo de la oreja o la yema del dedo con una lanceta e induce una lesión tisular que es de ~3 mm de profundidad. A continuación, el investigador deja que la sangre salga de la lesión tisular por gravedad sin comprometer la lesión técnica o manualmente. La sangre que gotea se limpia con un papel de celulosa cada 15 o 30 segundos sin tocar la lesión. Este procedimiento se repite hasta que el investigador detecta un cese mediante inspección visual. Los valores normales para esta prueba de hemorragia evaluada visualmente son de hasta 5 minutos. Sin embargo, existen ciertas variaciones en función también del sujeto individual, de modo que el tiempo de hemorragia normal según Duke puede ser también de hasta 6 minutos, o hasta 8 minutos o hasta 10 minutos.

10 El tiempo de hemorragia de acuerdo con el método de Ivy se lleva a cabo con un corte definido en la piel del lado interno del antebrazo (p. ej., Surgicutt®), a la vez que se crea una presión tisular estandarizada con un esfigmomanómetro (40 mm Hg) en el brazo superior del sujeto. El investigador limpia la sangre que sale de la lesión por gravedad cada 30 segundos sin tocar la lesión. A continuación, se toma el tiempo hasta que se detiene la hemorragia. Los valores normales para esta prueba de hemorragia evaluada visualmente son de hasta 5 minutos. Sin embargo, existen ciertas variaciones en función también del sujeto individual, de modo que el tiempo de hemorragia normal según Ivy puede ser también de hasta 6 minutos, o hasta 8 minutos o hasta 10 minutos.

15 El tiempo de hemorragia subacuático según Marx se lleva a cabo mediante una lesión tisular realizada en la yema del dedo de un sujeto utilizando una lanceta. Después de que se haya producido la lesión tisular, es necesario introducir la yema del dedo en agua a 37 °C inmediatamente. A continuación, mientras el dedo permanece sumergido, el investigador inspecciona visualmente la hemorragia y monitoriza el tiempo hasta que la hemorragia se detiene sin comprometer la lesión tisular. Los valores normales para esta prueba de hemorragia evaluada visualmente son de hasta 2 minutos. Sin embargo, existen ciertas variaciones en función también del sujeto individual, de modo que el tiempo de hemorragia normal según Marx también puede ser de hasta 3 minutos o hasta 4 minutos.

En ciertas realizaciones, el procedimiento médico es, a modo de ejemplos no limitantes:

- 25 i) cualquier procedimiento que utilice una derivación cardiopulmonar (CBP), incluido, por ejemplo, la revascularización coronaria (CABG, por sus siglas en inglés), reemplazo de válvulas, reemplazo aórtico y otras formas de cirugía cardíaca o vascular; o
- 30 ii) la oxigenación y bombeo de sangre mediante oxigenación con membrana extracorpórea (ECMO, por sus siglas en inglés), que se utiliza en pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, por sus siglas en inglés) o para el síndrome de dificultad respiratoria infantil (IRDS, por sus siglas en inglés) o en pacientes que hayan aspirado sustancias tóxicas, o para el síndrome de aspiración de meconio (MAS, por sus siglas en inglés) o infecciones pulmonares, o hipertensión pulmonar o fallo cardíaco por diversas razones como, por ejemplo, después de una cirugía cardíaca, como resultado de una cardiomiopatía o antes de un trasplante de corazón; o
- 35 iii) el bombeo de sangre asistido (interno o externo) incluidos los dispositivos asistidos ventriculares y corazones artificiales o
- 40 iv) la diálisis de sangre; o
- v) la filtración extracorpórea de sangre; o
- vi) la recolección de sangre en cualquier depósito para su uso posterior en un sujeto humano o animal; o
- 45 vii) el uso de uno o varios catéteres intraluminales venosos o arteriales que en teoría deben permanecer durante un cierto tiempo (p. ej. catéter de Swan-Ganz, catéter venoso central, etc.), o
- viii) el uso de catéteres, fascias, alambres guía u otro u otros equipos/dispositivos para cateterismo cardíaco intervencionista o diagnóstico; o
- 50 ix) el uso de uno o varios dispositivos intravasculares tales como uno o más estents, uno o más filtros de la vena cava, uno o más oclusores de defecto septal auricular (ASD, por sus siglas en inglés), defecto septal ventricular (VSD, por sus siglas en inglés) o del conducto arterioso persistente (PDA, por sus siglas en inglés, uno o varios serpentines; o
- x) el uso de una o varias válvulas cardíacas artificiales, incluidas por ejemplo válvulas aórticas, válvulas mitrales, válvulas tricúspides, válvulas pulmonares y donde una válvula cardíaca puede ser una válvula mecánica o una válvula bioprotésica, una válvula producida mediante ingeniería de tejidos o una válvula montada en un estent; o
- 55 xi) el uso de uno o varios injertos vasculares artificiales, incluidos, por ejemplo, uno o más injertos aórticos, uno o varios injertos pulmonares y una o más derivaciones de Blalock-Taussig (BT) modificadas Gore-tex.

En general, existen varias situaciones médicas en las que la sangre entra en contacto con superficies artificiales dentro y fuera del cuerpo humano, que después pueden dar como resultado la formación de coágulos como consecuencia de la activación de la coagulación en estas superficies.

60 El contacto externo (fuera del cuerpo humano) se puede resumir como los procedimientos que incluyen circulación

extracorpórea de modo que la sangre se saque fuera del cuerpo y al cabo de un tiempo se devuelva al cuerpo (baipás, ECMO, hemofiltración, diálisis, recolección de sangre, etc.).

5 El contacto interno (dentro del cuerpo humano) con superficies extrañas se da en todos los procedimientos que utilizan dispositivos intravasculares, tanto los que se implantan de forma permanente (estents de válvulas cardíacas, etc.) como aquellos que se emplean solo de forma temporal (catéteres, alambres guía, etc.).

10 En otra realización, se proporciona un dispositivo médico, donde el dispositivo médico se recubre con un inhibidor de FXII/FXIIa. El dispositivo médico puede ser una máquina de derivación cardiopulmonar, un sistema de oxigenación con membrana extracorpórea para la oxigenación de la sangre, un dispositivo para el bombeo asistido de sangre, un dispositivo de diálisis de sangre, un dispositivo para la filtración extracorpórea de sangre, un depósito para su uso en la recolección de sangre, un catéter intraluminal, un estent, una válvula cardíaca artificial y/o accesorios para cualquiera de estos dispositivos, incluidos tubos, cánulas, bomba centrífuga, válvulas, puertos de acceso venoso, desviadores, etc. Otra realización incluye métodos para preparar tales dispositivos recubriéndolos con inhibidores de FXII/FXIIa mediante inmersión, pulverización y otros métodos convencionales en la técnica de las tecnologías de recubrimiento.

15 En algunas realizaciones, la superficie artificial se recubre con el inhibidor de FXII/FXIIa, donde el inhibidor de FXII/FXIIa se encuentra en la superficie en una forma tal que esté disponible para unirse a FXII/FXIIa, es decir, se preserva la actividad biológica del inhibidor de FXII/FXIIa. En algunas realizaciones, el inhibidor de FXII/FXIIa se une covalentemente a la superficie artificial. En otras realizaciones, el inhibidor de FXII/FXIIa se une de forma no covalente a la superficie. En ciertas realizaciones, la superficie artificial se impregna con el inhibidor de FXII/FXIIa.
 20 La superficie artificial puede ser una superficie que eluye fármacos, donde el inhibidor de FXII/FXIIa se libera lentamente desde la superficie. El inhibidor de FXII/FXIIa puede estar embebido en la superficie, donde el inhibidor de FXII/FXIIa se disuelve lentamente a medida que la sangre entra en contacto con la superficie artificial. En algunas realizaciones, la superficie se derivatiza para que los inhibidores de FXII/FXIIa se adhieran a la superficie. En ciertas realizaciones, la concentración de inhibidor de FXII/FXIIa con la que se recubre la superficie puede ser similar a la
 25 cantidad que se administra a un sujeto sistémicamente. Las concentraciones de las disoluciones de inhibidor de FXII/FXIIa y/o la concentración final de inhibidor de FXII/FXIIa disponible en la superficie artificial se puede determinar antes y/o durante la fabricación. En algunas realizaciones, el inhibidor de FXII/FXIIa se administra aplicándolo como recubrimiento en la superficie artificial del dispositivo.

30 En otras realizaciones, el inhibidor de FXII/FXIIa se administra con heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta, donde la cantidad de heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta que se añade además del inhibidor de FXII/FXIIa antes y/o durante y/o después del procedimiento médico es reducida en comparación con la cantidad de heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta que se administra normalmente antes y/o durante dicho procedimiento médico cuando no se administra inhibidor de FXII/FXIIa.

35 La terapia estándar en los procedimientos médicos mencionados anteriormente es la administración de heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta. Estos fármacos se administran para prevenir la coagulación debida a la activación por contacto que tiene lugar donde la sangre entra en contacto con superficies artificiales. Para conseguir la prevención de la coagulación estos fármacos se dosifican de forma que el tiempo de coagulación activada (ACT) sea de entre 300-500 segundos. A valores de ACT inferiores a 300 segundos, llevar a cabo los procedimientos médicos mencionados anteriormente entrañaría un riesgo elevado de trombosis.

40 Se descubrió que la administración de inhibidores de FXII/FXIIa permitía llevar a cabo los procedimientos médicos mencionados anteriormente con cantidades reducidas de heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta que conducirían por sí solas, sin la administración de un inhibidor de FXII/FXIIa, a valores de ACT inferiores a 500 segundos.

45 Algunas realizaciones incluyen llevar a cabo los procedimientos médicos mencionados anteriormente con cantidades más reducidas de heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta, de modo que los valores de ACT serían inferiores a 400 segundos, inferiores a 300 segundos, inferiores a 250 segundos, inferiores a 200 segundos, inferiores a 150 segundos, inferiores a 100 segundos, inferiores a 50 segundos cuando la heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta se proporcionasen solos, sin la administración de un inhibidor de FXII/FXIIa. Tales cantidades reducidas de heparina pueden incluir de 1 a 400 UI/kg de peso corporal (PC), de 50 a 300 UI/kg de
 50 PC, de 100 a 200 UI/kg de PC y de 200 a 300 UI de PC. Las cantidades reducidas de heparina pueden incluir cantidades inferiores a 400 UI/kg de peso corporal (PC), cantidades inferiores a 300 UI/kg de peso corporal (PC), cantidades inferiores a 200 UI/kg de peso corporal (PC), cantidades inferiores a 100 UI/kg de peso corporal (PC), cantidades inferiores a 50 UI/kg de peso corporal (PC) o cantidades inferiores a 10 UI/kg de peso corporal (PC).

55 En una realización, el inhibidor de FXII/FXIIa se administra en un procedimiento médico según se ha descrito anteriormente sin la administración de heparina o un derivado de esta y/o sin la administración de hirudina o un derivado de esta.

Los pacientes tratados con los procedimientos médicos mencionados anteriormente sin la administración de

5 heparina o un derivado de esta y/o sin la administración de hirudina o un derivado de esta además de la administración de un inhibidor de FXII/FXIIa están protegidos contra la coagulación debida a la activación por contacto de la cascada de coagulación mientras que no padezcan de mayor riesgo hemorrágico, lo cual es un inconveniente de la terapia estándar actual. Esto es de suma importancia para pacientes y facultativos, ya que el estado de coagulación después de los procedimientos médicos mencionados no se refleja adecuadamente en las pruebas de coagulación generales (p. ej., aPTT, PT) y, por lo tanto, no se puede monitorizar ni tratar adecuadamente. El paciente en sí puede mostrar signos de hipercoagulopatía o hipocoagulopatía. Por consiguiente, en algunos países, los pacientes no se anticoagulan de manera oportuna después del procedimiento médico únicamente por potenciales razones médicas legales en caso de hemorragia grave después de la cirugía, mientras que el riesgo de coagulación está relacionado con los riesgos personales del paciente.

10 Debido a este mayor riesgo hemorrágico asociado con la administración de heparina o un derivado de esta después de que se lleve a cabo el procedimiento médico y la sangre del sujeto humano o animal ya no esté expuesta a las superficies artificiales, el efecto de la heparina o un derivado de esta se debe antagonizar tan pronto como sea posible para reducir el mayor riesgo hemorrágico tan pronto como sea posible. Normalmente se proporciona protamina para antagonizar el efecto de la heparina o derivados de esta; sin embargo, el antagonismo presenta sus propios riesgos según se describe más adelante. En caso de que se utilice hirudina o un derivado de esta en su lugar o combinada con heparina o un derivado de esta, sería también beneficioso antagonizar los efectos de la hirudina o un derivado de esta ya que el riesgo hemorrágico es también mayor, aunque aún no se ha autorizado un antagonista clínicamente útil y, por lo tanto, la hirudina, o un derivado de esta, no antagonizada restante presenta riesgos. De llegar a estar disponibles tales antagonistas de hirudina o derivados de esta es previsible que el uso de los antagonistas conllevara un riesgo protrombótico comparable al del uso de antagonistas de heparina.

15 Los riesgos asociados con la administración de protamina son una reacción alérgica grave inmediata causada por la molécula de protamina, el riesgo por hipotensión grave y el riesgo por coagulación debida al cese repentino del efecto de la heparina, que puede causar un exceso de generación de trombina.

20 Por lo tanto, en otra realización, el riesgo protrombótico a continuación del antagonismo posoperatorio de la heparina o derivados de esta y/o del antagonismo posoperatorio de hirudina o derivados de esta se previene o reduce utilizando un inhibidor de FXII/FXIIa.

25 En otra realización, el riesgo protrombótico a continuación del antagonismo posoperatorio de la heparina o derivados de esta y/o del antagonismo posoperatorio de hirudina o derivados de esta se previene o reduce administrando el inhibidor de FXII/FXIIa antes, durante y/o después de un procedimiento médico, donde se añade una cantidad reducida o nula del antagonista de heparina y/o antagonista de hirudina después del procedimiento médico en comparación con la cantidad de dicho antagonista que se administra normalmente después de dicho procedimiento médico cuando no se administra inhibidor de FXII/FXIIa.

30 De forma más general, en una realización, el sujeto humano o animal tiene un riesgo protrombótico reducido o nulo después del procedimiento médico.

35 Según se ha discutido anteriormente, "FXII/FXIIa" se refiere a cualquiera de entre Factor XII y Factor XII activado (FXIIa) o ambos. Por tanto, "inhibidor de FXII/FXIIa" incluye inhibidores de cualquiera de entre Factor FXII y FXIIa o ambos. Además, los anticuerpos anti-FXII/FXIIa incluyen anticuerpos que se unen e inhiben cualquiera de entre FXII y FXIIa o ambos. Se pretende que la expresión "inhibidor de FXII/FXIIa" también incluya un inhibidor de FXII/FXIIa que está conectado a un polipéptido que prolonga la semivida que, en una realización, incluye un conector.

40 En una realización, el inhibidor de FXII/FXIIa se refiere a un inhibidor de FXII/FXIIa específico, preferentemente un inhibidor de FXIIa específico.

45 Un inhibidor de FXII/FXIIa específico se refiere a un inhibidor que inhibe las serínproteasas plasmáticas distintas de FXII y/o FXIIa en un porcentaje inferior o igual a un 25% si se utiliza en una relación molar 1:1. Dicho de otro modo: un inhibidor de FXII/FXIIa específico inhibe las serínproteasas plasmáticas distintas de FXII y/o FXIIa en un porcentaje inferior o igual a un 25% cuando dicho inhibidor se utiliza en una relación molar 1:1 de la respectiva serínproteasa plasmática respecto a dicho inhibidor. Por ejemplo, un mAb de FXII/FXIIa específico inhibe la serínproteasa plasmática FXIa solamente en un 5%, donde la relación molar de FXIa respecto a dicho mAb es 1:1, mientras que el mismo mAb de FXII/FXIIa inhibe FXIIa en al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%.

50 En una realización de la invención, otra serínproteasa plasmática se inhibe en más de un 50% si se utiliza en una relación molar 1:1 de la respectiva serínproteasa plasmática respecto a dicho inhibidor.

En otra realización de la invención, otras dos serínproteasas plasmáticas se inhiben en más de un 50% si se utilizan en una relación molar 1:1 de la respectiva serínproteasa plasmática respecto a dicho inhibidor.

En otra realización más, el inhibidor de FXII/FXIIa es un inhibidor de FXII/FXIIa humano, incluido un anticuerpo

monoclonal humanizado, preferentemente un anticuerpo monoclonal completamente humanizado.

El término “homología” según se utiliza en la presente se refiere al número porcentual de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas. La homología se puede determinar utilizando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Deveraux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395), que se incorpora a la presente por referencia. De esta forma, se podrían comparar secuencias de longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en la presente mediante inserción de huecos en el alineamiento, donde dichos huecos se determinan, por ejemplo, mediante el algoritmo de comparación utilizado por el GAP.

Infestina-4

En una realización, la solicitud proporciona un inhibidor de FXII/FXIIa que comprende el dominio 4 de Infestina, Infestina-4. En una realización el inhibidor de FXII/FXIIa comprende una variante de Infestina-4. En otra realización, los inhibidores de FXII/FXIIa comprenden el dominio 4 de Infestina y, opcionalmente, los dominios 1, 2 y/o 3 de Infestina; se tiene constancia de que estas proteínas son potentes inhibidores de FXII/FXIIa (remítase al documento WO 2008/098720; remítase también a Campos ITN *et al.* 577 *FEBS Lett.* 512-516, 2004). Se proporciona la secuencia polipeptídica de Infestina-4 de origen natural (SEQ ID NO: 1). Según se utiliza en la presente, el término “variante” se refiere a un polipéptido con una mutación aminoacídica, donde se define una “mutación” como una sustitución, una delección o una adición a la secuencia de Infestina-4 de origen natural, donde tales cambios no alteran la habilidad funcional del polipéptido para inhibir FXII/FXIIa. El término “variante” incluye fragmentos de la secuencia de Infestina-4 de origen natural o mutada. A continuación, se proporcionan ejemplos adicionales de tales variantes.

En una realización, una variante de Infestina-4 comprende los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural (remítase a la secuencia subrayada en la Figura 12) y al menos una y hasta cinco mutaciones aminoacídicas fuera de los aminoácidos N-terminales que dan lugar a diferencias respecto a la secuencia de Infestina-4 de origen natural, o seis residuos de cisteína conservados (remítase a los aminoácidos en negrita en la Figura 12) y una homología de al menos un 70% respecto a la secuencia de Infestina-4 de origen natural. Los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 pueden ser importantes para unirse a FXII/FXIIa, tomando como base análisis de datos estructurales para un inhibidor relacionado *Rhodnius prolixus* (PDB: 1 TSO) que se une a la trombina y análisis de SPINK-1 que se une a la quimotripsina, que comparten ambos el rasgo común de la acumulación de sitios de contacto en la región N-terminal, según se muestra en la Figura 11. Por lo tanto, en una realización, una variante de Infestina-4 comprende la región N-terminal conservada de los aminoácidos 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural y al menos una y hasta cinco mutaciones aminoacídicas fuera de estos aminoácidos N-terminales conservados que dan lugar a diferencias respecto a la secuencia de Infestina-4 de origen natural. Una mutación puede ser una sustitución, una delección o una adición. Según se utiliza en la presente, la expresión “fuera de dichos aminoácidos N-terminales” se refiere a cualquier aminoácido a lo largo de la cadena polipeptídica de la variante distinto del tramo contiguo de aminoácidos que comprende la secuencia VRNPCACFRNYV, es decir, los aminoácidos 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural. En otra realización, una variante de Infestina-4 comprende seis residuos de cisteína conservados y tiene una homología de al menos un 70% respecto a la secuencia de Infestina-4 de origen natural. En una realización, los seis residuos de cisteína conservados son los aminoácidos en las posiciones 6, 8, 16, 27, 31 y 48 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural (remítase a la Figura 12). En una realización, la variante comprende la cisteína conservada final. En otras realizaciones, las posiciones exactas de los residuos de cisteína y las posiciones relativas entre sí pueden cambiar de las posiciones 6, 8, 16, 27, 31 y 48 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural debido a inserciones o delecciones en la variante de Infestina-4. No obstante, en estas realizaciones, una variante de Infestina-4 comprende todas las seis cisteínas y puede compartir una homología de un 70%, 75%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de Infestina-4 de origen natural.

En algunas realizaciones, una variante de infestina-4 se caracteriza por que inhibe FXII/FXIIa. La actividad funcional de la inhibición de FXII/FXIIa se puede evaluar, por ejemplo, mediante caracterización *in vitro* y/o *in vivo*, incluidos ensayos directos para evaluar la inhibición de la actividad enzimática de FXII/FXIIa, el tiempo de coagulación prolongado, es decir, el tiempo de la tromboplastina parcial activada (aPTT), o métodos *in vivo* para evaluar la coagulación. Algunos ejemplos adicionales de variantes de Infestina-4 son mutaciones de SPINK-1, que se describen a continuación.

Mutaciones de SPINK-1

Una realización involucra inhibidores de FXII/FXIIa para uso terapéutico en seres humanos. Se puede emplear una proteína humana con una elevada similitud respecto a la Infestina-4. Por ejemplo, la proteína humana con la similitud más elevada respecto a la Infestina-4 es SPINK-1, un inhibidor de serinproteasas de tipo Kazal expresado en el páncreas (también conocido como inhibidor de tripsina de secreción pancreática, PSTI, por sus siglas en inglés). La familia de inhibidores de serinproteasas de tipo Kazal es una de las numerosas familias de inhibidores de serinproteasas. Se han descrito muchas proteínas de diferentes especies (Laskowski M y Kato I, 49 *Ann. Rev. Biochem.* 593-626, 1980). Las similitudes de la secuencia de aminoácidos entre Infestina-4 y SPINK-1 se exponen

en la Figura 12.

Tomando como base la secuencia de SPINK-1 de origen natural (SEQ ID NO: 2) se pueden generar diversas variantes para aumentar la homología de la secuencia de SPINK-1 respecto a la Infestina-4. La frase “mayor homología respecto a la Infestina-4” se refiere al proceso donde se realizan mutaciones aminoacídicas al SPINK-1 para hacer que la secuencia de SPINK-1 se parezca más a la secuencia de Infestina-4.

En una realización, el SPINK-1 se muta para que comprenda los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural; se proporciona la secuencia polipeptídica y se denomina K1 (SEQ ID NO: 3). Según se ha descrito anteriormente, se cree que la parte N-terminal de la secuencia de Infestina-4 es importante para la función inhibidora de FXII/FXIIa.

Por lo tanto, en una realización, una variante del SPINK-1 mutado comprende también los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural y al menos una y hasta cinco mutaciones aminoacídicas fuera de dichos aminoácidos N-terminales, que dan lugar a diferencias respecto a la secuencia de SPINK-1 de origen natural y que aumentan la homología de la variante con la secuencia de Infestina-4 de origen natural. En otra realización, una variante de SPINK-1 mutado comprende seis residuos de cisteína conservados y tiene una homología de al menos un 70% respecto a la secuencia de SPINK-1 de origen natural. Una mutación puede ser una sustitución, una delección o una adición. Según se ha definido anteriormente, la expresión “fuera de dichos aminoácidos N-terminales” se refiere a cualquier aminoácido a lo largo de la cadena polipeptídica de la variante distinto del tramo contiguo de aminoácidos que está compuesto por la secuencia VRNPCACFRNYV, es decir, los aminoácidos 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural. El término “variante” incluye fragmentos de dicha secuencia de SPINK-1 mutado. En una realización, los seis residuos de cisteína conservados pueden ser los aminoácidos en las posiciones 9, 16, 24, 35, 38 y 56 de la secuencia de SPINK-1 de origen natural (remítase a la Figura 12). En una realización, la variante comprende la cisteína conservada final. En otra realización, las posiciones exactas de las cisteínas y las posiciones relativas entre sí pueden cambiar de las posiciones 9, 16, 24, 35, 38 y 56 de la secuencia de SPINK-1 de origen natural debido a inserciones o delecciones en la variante de SPINK-1. No obstante, en estas realizaciones, una variante de SPINK-1 comprende todas las seis cisteínas. En algunas realizaciones, una variante de SPINK-1 también se caracteriza por que inhibe FXII/FXIIa.

Se proporcionan algunos ejemplos de tales variantes de SPINK-1 y se denominan K2 y K3 (SEQ ID NO: 4 y 5 respectivamente). En las variantes K2 y K3 de SPINK-1, se realizaron sustituciones aminoacídicas adicionales fuera del extremo N para aumentar la homología respecto a la Infestina-4, donde las variantes también se caracterizan por que inhiben la actividad de FXII/FXIIa. Remítase al documento WO 2008/098720. La Figura 13 muestra la secuencia de aminoácidos de estas variantes y el grado de cambios respecto a la secuencia de SPINK-1 de origen natural. En el caso de la variante K3 de SPINK-1, se realizaron cinco sustituciones aminoacídicas para aumentar la homología respecto a la Infestina-4. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una variante de SPINK-1 puede compartir un 70%, 75%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la secuencia de SPINK-1 de origen natural.

Otros inhibidores de FXII/FXIIa

En una realización, se administran otros inhibidores de FXII/FXIIa a un paciente que recibe un procedimiento médico. En el documento WO 2006/066878, se propone el uso de anticuerpos contra FXII/FXIIa o el uso de inhibidores de FXII/FXIIa. De forma específica, los inhibidores de FXII/FXIIa incluyen antitrombina III (AT III), inhibidor de la enzima convertora de angiotensina, inhibidor de C1, aprotinina, inhibidor de la proteasa alfa-1, antipaina ([[(S)-1-carboxi-2-feniletil]carbamoil-L-Arg-L-Val-Arginal), acetal dimetilico del Z-Pro-Pro-aldehído, DX88 (Dyax Inc., 300 Technology Square, Cambridge, MA 02139, EE. UU.; citado en: Williams A y Baird LG, 29 *Transfus Apheresis Sci.* 255-258, 2003), leupeptina, inhibidores de proliloligopeptidasa tales como Fmoc-Ala-Pyr-CN, inhibidores de tripsina de maíz (CTI, por sus siglas en inglés), mutaciones del inhibidor de tripsina pancreática bovina, ecotina, proteína anticoagulante de limanda japonesa (YAP, por sus siglas en inglés), inhibidor V de tripsina de *Cucurbita maxima*, incluidos isoinhibidores de *Cucurbita maxima* y Hamadarina (según ha sido divulgado por Isawa H *et al.* 277 *J. Biol. Chem.*, 27651-27658, 2002) y Pro-Phe-Arg-clorometilcetona (PCK, por sus siglas en inglés).

El inhibidor de FXII/FXIIa puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de este, o un mimético que retienen la actividad inhibidora, por ejemplo, análogos del dominio inhibidor de proteasas de tipo Kunitz de la proteína precursora de amiloide según se ha divulgado en la patente de EE. UU. N.º 6 613 890, en las columnas 4 a 8. Otros inhibidores adecuados pueden ser Hamadarina, según se ha divulgado en Isawa H *et al.* 277 *J. Biol. Chem.* 27651-27658, 2002. En Chen Z *et al.* 65 *Applied and Environmental Microbiology*, 1320-1324, 1999 y en Wen L *et al.* 18 *Plant Mol. Biol.* 813-814, 1992 se divulgan un inhibidor de tripsina de maíz adecuado y métodos para su producción.

En otra realización, el inhibidor de FXII/FXIIa puede ser un anticuerpo anti-FXII/FXIIa que se una a FXII/FXIIa e inhiba la activación y/o actividad de FXII/FXIIa. Un anticuerpo de este tipo se ha descrito, por ejemplo, en el documento WO 2006/066878 y en Ravon *et al.*, 1 *Blood* 4134-43, 1995. Según se ha discutido anteriormente, un

“anticuerpo anti-FXII/FXIIa” incluye anticuerpos que se unan e inhiban cualquiera de entre FXII y FXIIa o ambos. Algunos anticuerpos anti-FXII/FXIIa se describen en más detalle más adelante.

Inhibidores de FXII/FXIIa conectados a polipéptidos que aumentan la semivida

5 Otro aspecto de la solicitud proporciona inhibidores de FXII/FXIIa conectados a un polipéptido que aumenta la semivida (HLEP, por sus siglas en inglés). En una realización, los inhibidores de FXII/FXIIa son proteínas de bajo peso molecular. Por lo tanto, se puede esperar una depuración renal rápida, según se ha publicado para otras proteínas de bajo peso molecular (Werle M y Bernkop-Schmurch A, *30 Amino Acids* 351-367, 2006). Una forma de abordar la semivida plasmática corta de un compuesto polipeptídico es inyectarlo repetidamente o mediante infusión continua. Otra estrategia es aumentar la semivida plasmática intrínseca del polipéptido en sí. Por ejemplo, en una
10 realización, los inhibidores de FXII/FXIIa están conectados a proteínas que prolongan la semivida.

Un “polipéptido que aumenta la semivida” amplía la semivida del inhibidor de FXII/FXIIa *in vivo* en un paciente o en un animal. Por ejemplo, se ha descrito que la albúmina e inmunoglobulinas y sus fragmentos o derivados son polipéptidos que aumentan la semivida (HLEP): Ballance *et al.* (WO 2001/79271) han descrito polipéptidos de fusión de una multitud de polipéptidos terapéuticos diferentes, de los cuales se predice que, cuando se fusionan con seroalbúmina humana, tienen una semivida funcional mayor *in vivo* y un periodo de conservación extendido.
15

Los términos “albúmina” y “seroalbúmina” engloban la albúmina humana (HA, por sus siglas en inglés) y variantes de esta, de la cual se proporciona la forma madura completa (SEQ ID NO: 6), así como albúmina de otras especies y variantes de esta. Según se utiliza en la presente “albúmina” se refiere a una secuencia de aminoácidos o polipéptido de albúmina, o a una variante de albúmina, que tiene una o más actividades funcionales (p. ej., actividades biológicas) de albúmina. Según se utiliza en la presente, la albúmina puede estabilizar o prolongar la actividad terapéutica de un inhibidor de FXII/FXIIa. La albúmina puede derivarse de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, mono, vaca, oveja o cerdo. Las albúminas que no proceden de mamíferos incluyen, sin carácter limitante, albúmina de gallina y de salmón. La parte de albúmina del polipéptido conectado a albúmina puede ser de un animal diferente que la parte polipeptídica terapéutica. Remítase al documento WO2008/098720 para consultar ejemplos de proteínas de fusión de albúmina.
20
25

En una realización, una variante de albúmina tiene una longitud de al menos 10, 20, 40 o al menos 70 aminoácidos, o puede incluir 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de HA (SEQ ID NO 6) o puede incluir parte o todos los dominios específicos de HA. Una variante de albúmina puede incluir una sustitución, delección o adición aminoacídica, ya sea una sustitución conservativa o no conservativa, donde tales cambios no alteran sustancialmente el sitio activo o dominio activo que confiere las actividades terapéuticas de los polipéptidos que aumentan la semivida. Estas variantes pueden compartir un 70%, 75%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología.
30

En una realización, la variante de albúmina incluye fragmentos y puede estar compuesta o, como alternativa, comprender al menos un dominio completo de albúmina o fragmentos de dichos dominios, por ejemplo, los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de la SEQ ID NO 6), 2 (aminoácidos 195-387 de la SEQ ID NO 6), 3 (aminoácidos 388-585 de la SEQ ID NO 6), 1 + 2 (1-387 de la SEQ ID NO 6), 2 + 3 (195-585 de la SEQ ID NO 6) o 1 + 3 (aminoácidos 1-194 de la SEQ ID NO 6 + aminoácidos 388-585 de la SEQ ID NO 6). Cada dominio en sí está formado por dos subdominios homólogos, concretamente 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones conectoras intersubdominio flexibles que comprenden los residuos de Lys106 a Glu119, Glu292 a Val315 y Glu492 a Ala511.
35
40

En otra realización, se pueden utilizar otras proteínas que están relacionadas estructural o evolutivamente con la albúmina como HLEP, incluidas, sin carácter limitante, alfa-fetoproteína (WO2005/024044; Beattie y Dugaiczky, *20 Gene* 415-422, 1982), afamina (Lichenstein *et al.*, *269 J. Biol. Chem.* 18149-18154, 1994) y proteína de unión a la vitamina D (Cooke y David, *76 J. Clin. Invest.* 2420-2424, 1985). Sus genes representan un agrupamiento multigénico con similitudes estructurales y funcionales asignadas a las mismas regiones cromosómicas en seres humanos, ratones y ratas. La similitud estructural de los miembros de la familia de las albúminas sugiere su usabilidad como HLEP. Por ejemplo, se ha reivindicado que la alfa-fetoproteína prolonga la semivida de un polipéptido terapéutico unido *in vivo* (WO 2005/024044). Se pueden utilizar tales proteínas o variantes de estas, que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica, y pueden derivar de cualquier vertebrado, especialmente de cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, mono, vaca, oveja o cerdo, o no mamífero, incluidos, sin carácter limitante, gallina o salmón. Remítase al documento WO 2008/098720. Tales variantes pueden ser de una longitud de 10 o más aminoácidos o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos de la respectiva secuencia proteica, o pueden incluir parte de los dominios específicos de las respectivas proteínas o todos ellos. Las proteínas de fusión de los miembros de la familia de las albúminas pueden incluir variantes polimórficas presentes en la naturaleza.
45
50
55

En otra realización, se puede utilizar una inmunoglobulina (Ig) o variantes de esta como HELP, donde una variante incluye fragmentos. En una realización, se utilizan el dominio Fc o partes de la región constante de la

inmunoglobulina. La región constante puede ser la de una inmunoglobulina IgM, IgG, IgD, IgA o IgE. La parte polipeptídica terapéutica se conecta a la Ig a través de la región bisagra del anticuerpo o de un conector peptídico, que puede ser escindible. Varias patentes y solicitudes de patente describen la fusión de proteínas terapéuticas a regiones constantes de inmunoglobulina para extender la semivida de la proteína terapéutica *in vivo* (US 2004/0087778, WO 2005/001025, WO 2005/063808, WO 2003/076567, WO 2005/000892, WO 2004/101740, US 6 403 077). Por ejemplo, un Fc fusionado a la citocina IFN- β logró una actividad biológica de la IFN- β aumentada, semivida en circulación prolongada y mayor solubilidad (WO 2006/000448).

Por lo tanto, otra realización es utilizar tales secuencias de inmunoglobulina, por ejemplo, fragmentos Fc de inmunoglobulinas y variantes de estos, como HLEP. Los inhibidores de FXII/FXIIa se pueden fusionar a dominios Fc o al menos a partes de las regiones constantes de inmunoglobulinas como HLEP y se pueden producir como moléculas recombinantes en células hospedadoras procarióticas o eucarióticas, tales como líneas celulares de bacterias, levaduras, plantas, animales (incluidos insectos) o seres humanos, o en animales transgénicos (WO 2008/098720). Una proteína de fusión SPINK-K2-Fc se muestra de forma ilustrativa en la SEQ ID NO: 7.

Conectores

En una realización, se puede introducir un conector peptídico de intervención entre el polipéptido terapéutico y la HLEP. En una realización, se introduce un conector escindible, particularmente si la HLEP interfiere con la actividad específica del polipéptido terapéutico, p. ej., por impedimento estérico. En ciertas realizaciones, el conector se escinde con enzimas tales como las proteasas de coagulación de la vía de coagulación intrínseca, extrínseca o común. Las proteasas de coagulación de la vía intrínseca son proteasas de la vía de activación por contacto, incluidas, por ejemplo, FXIIa, FXIa o FIXa. En una realización, el conector se escinde con FXIIa. Las proteasas de la vía extrínseca incluyen las proteasas de la vía del factor tisular, por ejemplo, FVIIa. Las proteasas de la vía común incluyen las proteasas implicadas en la conversión de fibrinógeno a fibrina, por ejemplo, FXa, FIIa y FXIIIa.

Formulación y administración terapéutica

El inhibidor de FXII/FXIIa o variante de este puede tener una pureza superior a un 80%, o una pureza superior a un 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. En una realización, la variante puede tener un estado farmacéuticamente puro que sea superior a un 99.9% puro con respecto a las macromoléculas contaminantes tales como otras proteínas y ácidos nucleicos, y exento de agentes infecciosos y pirogénicos.

El inhibidor de FXII/FXIIa purificado se puede disolver en disoluciones de tampón acuoso fisiológicamente compatibles convencionales a las que se pueden añadir, opcionalmente, excipientes farmacéuticos con el fin de proporcionar preparados farmacéuticos para tratar SBI en un paciente. Tales excipientes y portadores farmacéuticos, así como formulaciones farmacéuticas adecuadas, son muy conocidos en la técnica. Remítase, por ejemplo, a Kibbe *et al. Handbook of Pharmaceutical Excipients* (3.^a edición, Pharmaceutical Press), 2000. La composición farmacéutica se puede formular en forma soluble estable o liofilizada. El polipéptido se puede liofilizar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes de su uso mediante la adición de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

Las formulaciones del inhibidor de FXII/FXIIa se suministran al paciente mediante cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen y se pueden utilizar varios sistemas de suministro para administrar la composición por cualquier vía conveniente. Las composiciones se pueden administrar sistémicamente, tal como parenteralmente. El término "parenteral" según se utiliza en la presente incluye técnicas de inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial e intratraqueal, instilación, aplicación por pulverización e infusión. Las formulaciones parenterales se pueden administrar por vía intravenosa, en forma de bolo o como infusión constante, o por vía subcutánea, de acuerdo con procedimientos conocidos. Los portadores líquidos, que son muy conocidos para uso parenteral, incluyen agua estéril, solución salina, dextrosa acuosa, disoluciones de azúcares, etanol, glicoles y aceites. Para uso sistémico, las proteínas terapéuticas se pueden formular para una línea intravenosa o una línea arterial. Las formulaciones se pueden administrar de forma continua mediante infusión o mediante inyección de bolo. Algunas formulaciones comprenden sistemas de liberación lenta. En una realización, la formulación se administra en forma de parche. Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, rellenos, lubricantes o agentes humectantes, etc. Los preparados líquidos orales pueden estar en forma de suspensiones acuosas u oleosas, disoluciones, emulsiones, jarabes, elixires o similares, o se pueden presentar como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado para su uso. Tales preparados líquidos pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsificantes, vehículos no acuosos y conservantes.

La dosis del inhibidor de FXII/FXIIa puede depender de muchos factores tales como, p. ej., la indicación, formulación o modo de administración y se puede determinar en ensayos preclínicos y clínicos para cada respectiva indicación. La dosis de inhibidor de FXII/FXIIa se puede administrar a un paciente antes, durante y/o después de un procedimiento médico. En una realización, el inhibidor de FXII/FXIIa se puede administrar 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 o

96 horas antes y/o después de un procedimiento médico. Un inhibidor de FXII/FXIIa se puede administrar en una única dosis o en múltiples dosis, o repetidamente en intervalos de 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 o 48 horas antes, durante y/o después de un procedimiento médico. A causa de la propiedad ventajosa de no aumentar el riesgo hemorrágico, en una realización, el inhibidor de FXII/FXIIa se administra durante el procedimiento. La composición farmacéutica se puede administrar sola o junto con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden coformular o se pueden administrar como formulaciones separadas conjunta o separadamente y mediante la misma vía de administración o diferentes vías de administración. El esquema de administración o la dosis de un inhibidor de FXII/FXIIa también pueden variar entre pacientes individuales con la misma indicación o diferentes indicaciones en función de factores tales como otras terapias o afecciones médicas.

10 Otra realización son inhibidores de FXII/FXIIa para la prevención o el tratamiento del síndrome posperfusión.

El síndrome posperfusión es una disfunción del sistema nervioso central o deterioro cognitivo o declive cognitivo después de procedimientos de baipás como CABG. Entre otras cosas, se asume que está causado por microtrombos generados por la activación por contacto en las superficies artificiales utilizadas en el CABG u otro procedimiento médico donde la sangre entra en contacto con superficies artificiales. Actualmente, no existe una terapia conocida para el síndrome posperfusión (Newman *et al.*, NEJM (2001) Vol. 344, N.º 6, págs. 394 a 402).

15 Otra realización es el uso de los inhibidores de FXII/FXIIa mencionados anteriormente para prevenir el bloqueo del flujo de sangre humana en un dispositivo médico extracorpóreo, que puede ser, a modo de ejemplo no limitante, un dispositivo de derivación cardiopulmonar o un dispositivo utilizado para la diálisis de sangre o la filtración extracorpórea de sangre. Por "bloqueo" nos referimos a una reducción del flujo sanguíneo en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 99% o un cese completo del flujo sanguíneo.

Ejemplos

1. Resultados de laboratorio

25 Durante una evaluación de laboratorio se proporcionó Infestina-4 fusionada con albúmina recombinante (rHA-Infestina-4; según se ha descrito en el documento WO2008/098720) en una jeringa y posteriormente se añadió sangre completa de un cerdo. Después, esta disolución se proporcionó en un vial de vidrio y se determinó el tiempo de coagulación visualmente agitando con cuidado el vial de vidrio cada minuto (incubación a 37 °C en un baño de agua). Sorprendentemente, a pesar de la activación por contacto masiva mediante la superficie de vidrio, la sangre no mostró ningún signo de coagulación durante hasta 3 horas (mientras que las muestras de control coagularon después de aproximadamente 3 minutos, Fig. 1). Además, las evaluaciones sucesivas del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) de esta sangre no coagulada demostraron valores visiblemente prolongados. Estos resultados alentaron investigaciones *ex vivo* adicionales. En estas investigaciones, se pudo demostrar que la rHA-Infestina-4 prolongaba el tiempo de coagulación de sangre completa (WBCT) de forma dependiente de la dosis (Fig. 1). Se pudo obtener un perfil comparable cuando se utilizó sangre completa murina de forma ilustrativa.

35 En un experimento adicional, se probó un anticuerpo anti-FXII/FXIIa específico en el mismo diseño de estudio, según se ha explicado anteriormente. Sin embargo, puesto que este anticuerpo no reacciona con el sistema porcino, se utilizó sangre completa de ratones. Curiosamente, aunque se esperaba que la actividad de FXII se inhibiese por completo a las dosis probadas, el WBCT se prolongó un máximo de aproximadamente 3 veces (Fig. 2). Esto lleva a la conclusión de que el notorio efecto de la rHA-Infestina-4 en el WBCT no se podía explicar únicamente por su potencial inhibitorio de FXII/FXIIa. En cambio, otros mecanismos, quizá su más débil potencial inhibitorio de FXa, conducen a este hallazgo extraordinario.

2. Estudios preclínicos en animales

2.1. Datos en animales y anestesia

Animales:

45 Se adquirieron cerdos machos castrados (Large white x German noble) que pesaban 24-40 kg de un criadero local (Willi Schlosser, Schwalmthal, Alemania) a los 3-4 meses de edad. Los animales se alojaron a 18-21 °C en establos con lecho de paja en ciclos ambientales día-noche y se alimentaron a voluntad con alimento para cerdos Deuka V (Deutsche Tiermahrung Cremer GmbH & Co. KG Düsseldorf, Alemania). Se suministró agua del grifo a voluntad. La crianza de ganado y los procedimientos de estudio cumplieron con la ley de bienestar animal alemana y las regulaciones de la Unión Europea.

Anestesia:

Después del ayuno durante la noche con acceso no restringido al agua, los animales se sedaron con una premedicación intramuscular utilizando una mezcla de 2 mg·kg⁻¹ de azaperona (Stresnil®, Janssen-Cilag GmbH,

Neuss, Alemania), 15 mg·kg⁻¹ de ketamina (Ketavet, Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Alemania) y 0.02 mg·kg⁻¹ de sulfato de atropina (Atropinsulfate, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Alemania), los cerdos se anestesiaron a continuación con 10 mg·kg⁻¹ de tiopental sódico a través de una vena de la oreja. Tras la preparación quirúrgica de la tráquea los animales se entubaron, la respiración se soportó con un ventilador Heyer Access. La anestesia inhalada se mantuvo con un 1-2% de isoflurano (Isofluran CP®, CP Pharma GmbH, Burgdorf, Alemania). Se hizo avanzar un catéter de 1.4 x 2.1 mm dentro de una arteria carótida para la recolección de muestras de sangre y un catéter de 0.5 x 0.9 mm dentro de una arteria femoral para las mediciones de presión sanguínea continuas. Se infundieron disolución de Ringer a 4 mL·kg⁻¹·h⁻¹ para satisfacer los requerimientos de fluido basal y fluidos de prueba a través de un catéter permanente de 1.4 x 2.1 mm en una vena yugular externa. La temperatura corporal se monitorizó mediante termometría rectal.

2.2. Investigaciones farmacocinéticas en cerdos

Tras los resultados de laboratorio iniciales mencionados anteriormente, se evaluaron las cinéticas de una única aplicación intravenosa (i.v.) de rHA-Infestina-4 en cerdos. Descubrimos que el WBCT *ex vivo* se prolongó notablemente después de las administraciones i.v. únicas de rHA-Infestina-4 y disminuyó de nuevo durante la eliminación de rHA-Infestina-4 de la circulación (Fig. 3). Además, la administración i.v. de rHA-Infestina-4 en cerdos condujo a una drástica prolongación del aPTT, así como, en dosis elevadas, a un tiempo de protrombina (PT) ligeramente prolongado (Fig. 4 y 5). Estos resultados demostraron que la rHA-Infestina-4 influye principalmente en la vía de coagulación intrínseca (aPTT), así como, en dosis elevadas, ligeramente en la vía de coagulación extrínseca (PT). Además, se pudo detectar una prolongación del tiempo de coagulación en una tromboelastografía.

Curiosamente, aunque el WBCT y aPTT se prolongaron notablemente, el tiempo de hemorragia cutánea (es decir, hemostasia fisiológica) no se vio afectado (Fig. 6).

2.3. Cirugía de derivación cardiopulmonar en el cerdo:

Con el fin de evaluar y probar el efecto anticoagulante de la rHA-Infestina-4 durante los procedimientos de derivación cardiopulmonar (CPB), se llevó a cabo un ensayo de CPB preclínico en un modelo porcino. Esencialmente, se cargó la CPB con rHA-Infestina-4 (correspondiente a 50 mg/kg de peso corporal (PC)) y el animal en sí se trató con rHA-Infestina-4 en una dosis de 200 mg/kg de PC antes de conectarlo al dispositivo de CPB para prevenir la coagulación y sucesiva oclusión de la membrana oxigenadora del dispositivo de CPB. No se utilizaron otras sustancias tales como heparina o bivalirudina (A. Koster *et al. Am J Cardio* 2004; 93: 356-359) como sustancias anticoagulantes.

2.3.1. Diseño del estudio de CPB:

Remítase a la Fig. 7 para una visión general sobre el diseño del estudio.

Después de inducir la anestesia (2.1), se llevó a cabo una esternotomía con una sierra oscilante, y se expuso el corazón. El pericardio se abrió longitudinalmente y se aseguró mediante suturas a la pared torácica. Se situó una sutura de jareta en la aurícula derecha y la punta del corazón. Se administró una infusión i.v. de 200 mg/kg de PC de rHA-Infestina-4. Después de ~10 min, un catéter arterial de 5.2 mm de diámetro y un catéter venoso de 32 Fr se colocaron en la aurícula derecha y el ventrículo izquierdo y se aseguraron con el torniquete. Ambos catéteres se conectaron a un oxigenador de fibra hueca para adultos pequeño con un reservorio venoso rígido (D905 EOS, Sorin SpA, Milán, Italia). El circuito extracorpóreo se acondicionó con una disolución compuesta por 500 mL de solución salina isotónica, 1000 mL de hidroxietilalmidón al 6% 200/0.5 (Infukoll, Schwarz Pharma AG, Mannheim, Alemania), 2 mL·kg⁻¹ de manitol al 15% (Osmofudin®, B. Braun) y 50 mg/kg de PC de rHA-Infestina-4. Las líneas venosa y arterial se abrieron en sucesión y se dejó fluir la sangre venosa en el reservorio venoso por gravedad. Una bomba transportó la sangre al oxigenador. La sangre oxigenada se equilibró hasta la temperatura objetivo y se devolvió a través de la línea arterial al ventrículo izquierdo. Se mantuvo la hipotermia a 25 °C durante 2 horas, seguida de 1 hora de recalentamiento hasta la normotermia (37 °C).

Tras la finalización de la CPB, la sangre que quedaba en el oxigenador se devolvió al animal. La anticoagulación no se revirtió tras el procedimiento de CPB.

Las muestras sanguíneas para los ensayos de laboratorio se tomaron (1) al inicio, (2) después de la infusión de rHA-Infestina-4 pero antes del comienzo de la CPB, (3) inmediatamente después del comienzo de la CPB y (4) posteriormente cada 5 min hasta el final del experimento. También se investigó el tiempo de hemorragia cutánea (SBT), definido como el tiempo hasta el cese de pérdida sanguínea a partir de una incisión estandarizada en el interior de la oreja de 5 mm de longitud por 1 mm de profundidad creada utilizando un dispositivo de corte Surgicutt® (International Technidyne Corp., Edison, Nueva Jersey, EE. UU.).

2.3.2. Resultados de laboratorio durante la CPB:

Durante la CPB, los valores de aPTT fueron marcadamente prolongados durante todo el periodo de estudio en comparación con los valores iniciales (Fig. 8), mientras que los valores de PT aumentaron solo levemente durante el

periodo de estudio (Fig. 9). Además, el WBCT *ex vivo* también aumentó visiblemente durante el periodo de estudio (Fig. 10).

2.3.3. Resultados clínicos durante la CPB:

5 En el ámbito médico es de conocimiento general que el contacto directo de la sangre con una superficie artificial conduce inmediatamente a una activación de la coagulación (vía intrínseca), así como a una activación directa de las plaquetas con el cierre sucesivo de la membrana oxigenadora. Por lo tanto, el uso de heparina durante la CPB es actualmente el mejor estándar de atención médica disponible.

10 Los experimentos con animales (porcinos) internos con el uso de 300 UI/kg de PC de heparina tienen un riesgo hemorrágico más elevado como se refleja en la prolongación del SBT, así como en la hemorragia a través de los bordes de la herida.

En contraposición a estos resultados con la heparina, el SBT como prueba global para el riesgo hemorrágico permaneció inalterado cuando se utilizó rHA-Infestina-4 en la CPB y, además, la hemostasia no se vio afectada al inspeccionar los bordes de la herida en busca de una mayor hemorragia. Sin embargo, el hallazgo más importante fue que el oxigenador de CPB no se coaguló y permaneció completamente funcional durante el periodo de prueba.

15 La combinación de los resultados de laboratorio indirectos (aPTT, PT), los resultados clínicos de CPB y SBT muestra, sorprendentemente, que la rHA-Infestina-4 cubre la necesidad médica no satisfecha de un nuevo fármaco anticoagulante que no comprometa la capacidad global de los pacientes de formar un coágulo estable, a la vez que la sangre permanece completamente no coagulada durante los procedimientos que requieren de superficies artificiales.

20 3. Conclusión

La rHA-Infestina-4 pudo prevenir la coagulación del oxigenador de CPB influyendo principalmente en la vía de coagulación intrínseca, lo que se refleja en el aPTT, mientras que la vía extrínseca (evaluaciones de PT) permanece inalterada hasta un cierto grado/dosis de rHA-Infestina-4. Estos resultados fueron sorprendentes y ofrecen una nueva estrategia en la terapia anticoagulante durante la CPB, ya que no es necesario inhibir el sistema de coagulación extrínseco e intrínseco mediante heparina/bivalirudina, con el mayor riesgo hemorrágico. Más adelante, se podría disminuir el riesgo restante de procesos de microtrombosis y embolización durante y después de procedimientos de CPB hasta un cierto nivel. Este nuevo tratamiento en los procedimientos de CPB muestra por primera vez que un inhibidor de FXII/FXIIa como la rHA-Infestina-4 podría reemplazar o al menos reducir la heparina/bivalirudina en el futuro uso clínico dando como resultado una oportunidad terapéutica significativamente mejorada.

30 4. Investigaciones adicionales

4.1. Los inhibidores de FXII/FXIIa se prueban en un nuevo planteamiento de estudio donde se hace pasar sangre completa de conejo por un circuito de derivación cardiopulmonar (CPB) *ex vivo*. En la presente, la sangre circula constantemente a través del circuito (y sin volver al conejo) donde se encuentra con una activación (contacto) masiva del sistema de coagulación si no se anticoagula. Este modelo se utiliza para probar la eficacia de los inhibidores de FXII/FXIIa o combinaciones de inhibidores de FXII/FXIIa y heparina para prevenir la oclusión del circuito de la CPB.

40 Las lecturas son, entre otras: la presión previa y posterior al paso por el oxigenador, el recuento de la sangre completa, que incluye tamaño y recuento de plaquetas, permeabilidad del oxigenador y los filtros, lecturas adicionales de la función del sistema de coagulación, sistema del complemento y sistema de cinina-caliceína.

Asumimos que los inhibidores de FXII/FXIIa pueden prevenir la oclusión/coagulación de la CPB en este montaje *ex vivo* y además pueden reducir la activación del sistema del complemento y del sistema de cinina-caliceína.

45 4.2 En otro conjunto de estudios, se estudia el efecto de los inhibidores de FXII/FXIIa (rHA-Infestina-4 y el MAb de FXII/FXIIa) en la coagulación de sangre completa humana *ex vivo* (a partir de donantes sanos). Aquí, se mide el WBCT según se ha descrito anteriormente (es decir, para sangre completa de cerdo/ratones) tras añadir diferentes concentraciones de los inhibidores de FXII/FXIIa. Adicionalmente, se puede medir el WBCT utilizando un dispositivo de ACT (tiempo de coagulación activada). Asumimos que, acorde con los resultados en otras especies mencionados anteriormente, observamos una inhibición de los tiempos de coagulación de sangre completa *ex vivo* dependientes de la dosis. Se determinará la dosis de inhibidores de FXII/FXIIa que se requiere para lograr una eficacia equivalente en los parámetros nombrados anteriormente (WBCT), en comparación con una dosis estándar de heparina no fraccionada. Adicionalmente, también se prueban combinaciones de inhibidores de FXII/FXIIa y dosis baja de heparina (u otros fármacos anti-trombóticos).

50 4.3 Además, se prueban los efectos de los inhibidores de FXII/FXIIa, así como combinaciones de inhibidores de

- 5 FXII/FXIIa y heparina (u otros fármacos antitrombóticos) en un sistema de circuito *ex vivo* (se hace pasar sangre completa humana de donantes sanos exentos de fármaco por el sistema mientras que los fármacos ya se han proporcionado en el sistema) compuesto por un sistema de CPB estándar, un sistema de ECMO estándar u otro circuito *ex vivo* clínicamente relevante. En la presente, la sangre circula constantemente en el circuito (y no se devuelve al donante) donde encuentra una activación (contacto) masiva del sistema de coagulación. Las lecturas son, entre otras: presión previa y posterior al paso por el oxigenador, recuento de sangre completa que incluye tamaño y recuento de plaquetas, permeabilidad del oxigenador y los filtros, lecturas adicionales de la función del sistema de coagulación, sistema del complemento y sistema de cinina-caliceína. Se asume que los inhibidores de FXII/FXIIa o combinaciones de inhibidores de FXII/FXIIa y dosis bajas de heparina (u otros fármacos antitrombóticos) también pueden prevenir la coagulación del circuito. Además, se asume que los inhibidores de FXII/FXIIa pueden reducir la activación del sistema del complemento y del sistema de cinina-caliceína dentro de este circuito *ex vivo*. Se determinará la dosis de los inhibidores de FXII/FXIIa que se requiere para lograr una eficacia equivalente en los parámetros y lecturas nombrados anteriormente, en comparación con una dosis estándar de heparina no fraccionada.
- 10
- 15 Esta nueva estrategia para el tratamiento de pacientes antes, durante y/o después de la activación por contacto del sistema de coagulación proporciona protección frente a la trombosis antes, durante y/o después de ciertos procedimientos, a la vez que no se pone al paciente en riesgo de eventos hemorrágicos al mismo tiempo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CSL Behring GmbH

5 <120> Inhibidores del Factor XII para la administración con procedimientos médicos que comprenden contacto con superficies artificiales

<130> 2011_M002_A177

<150>US61/496740
< 151> 2011-06-14

10 <150>EP11157557.7
< 151> 2011-03-09

<150>US61/450881
< 151> 2011-03-09

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210>1
<211>48
<212>PRT
< 213> Trioma infestans

<400>1
Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn Tyr Val Pro Val Cys
1 5 10 15

Gly Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Gly Asn Pro Cys Met Leu Asn Cys Ala
20 25 30

20 Ala Gln Thr Lys Val Pro Gly Leu Lys Leu Val His Glu Gly Arg Cys
35 40 45

<210>2
<211>56
<212>PRT
< 213> Homo sapiens

25 <400>2
Asp Ser Leu Gly Arg Glu Ala Lys Cys Tyr Asn Glu Leu Asn Gly Cys
1 5 10 15

Thr Lys Ile Tyr Asp Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro
20 25 30

Asn Glu Cys Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile
35 40 45

Leu Ile Gln Lys Ser Gly Pro Cys
50 55

<210>3
<211>53
<212>PRT
30 < 213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 646 191 T3

< 223> SPINK-1 humano mutado

<400>3

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro Asn Glu Cys
20 25 30

Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
35 40 45

Lys Ser Gly Pro Cys
50

5 <210>4

<211>53

<212>PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> SPINK-1 humano mutado

10 <400>4

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
20 25 30

Met Leu Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
35 40 45

Lys Glu Gly Pro Cys
50

<210>5

<211>54

<212>PRT

15 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> SPINK-1 humano mutado

<400>5

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
20 25 30

Met Leu Asn Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile
35 40 45

Gln Lys Glu Gly Pro Cys
50

20 <210>6

<211>585

<212>PRT

ES 2 646 191 T3

< 213> Homo sapiens

<400>6

```

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1          5          10          15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
          20          25          30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
          35          40          45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
          50          55          60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65          70          75          80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
          85          90          95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
          100          105          110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
          115          120          125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
          130          135          140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145          150          155          160

```

ES 2 646 191 T3

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415

ES 2 646 191 T3

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585

<210>7

<211>294

<212>PRT

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Proteína de fusión

<400>

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
 1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
 20 25 30

7

ES 2 646 191 T3

Met Leu Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
 35 40 45

Lys Glu Gly Pro Cys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Pro
 50 55 60

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 65 70 75 80

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 85 90 95

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 100 105 110

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 115 120 125

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 130 135 140

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 145 150 155 160

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 165 170 175

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 180 185 190

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 195 200 205

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 210 215 220

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 225 230 235 240

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 245 250 255

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 260 265 270

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 275 280 285

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290

REIVINDICACIONES

- 5 1. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso en la prevención de la formación y/o estabilización de trombos durante y/o después de un procedimiento médico llevado a cabo en un sujeto humano o animal que comprende poner en contacto sangre de dicho sujeto humano o animal con superficies artificiales, donde dicho inhibidor de FXII/FXIIa se administra antes y/o durante y/o después de dicho procedimiento médico y además donde
- 10 (i) la superficie artificial se expone a al menos un 80% del volumen de sangre del sujeto y la superficie artificial es de al menos 0.2 m² o
(ii) la superficie artificial es un recipiente para la recolección de sangre fuera del cuerpo del sujeto o
(iii) la superficie artificial es un estent, válvula, catéter intraluminal o un sistema para el bombeo de sangre asistido interno,
- donde el inhibidor de FXII/FXIIa comprende
- 15 (i) la secuencia polipeptídica de Infestina-4 de origen natural (SEQ ID NO: 1) o una variante de esta, donde una variante comprende
- 20 (a) los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural y al menos una y hasta cinco mutaciones aminoacídicas fuera de dichos aminoácidos N-terminales que dan lugar a diferencias respecto a la secuencia de Infestina-4 de origen natural;
y/o
(b) seis residuos de cisteína conservados de la secuencia de Infestina-4 de origen natural y una homología de al menos un 70% respecto a la secuencia de Infestina-4 de origen natural.
- (ii) el SPINK-1 (SEQ ID NO: 2), que se muta para incluir los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural, o una variante de dicho SPINK-1 mutado, donde una variante comprende
- 25 (a) los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de origen natural y al menos una y hasta cinco mutaciones aminoacídicas fuera de dichos aminoácidos N-terminales que dan lugar a diferencias respecto a la secuencia de SPINK-1 de origen natural y que aumentan la homología de la variante respecto a la secuencia de Infestina-4 de origen natural;
y/o
- 30 (b) seis residuos de cisteína conservados de la secuencia de SPINK-1 de origen natural y una homología de al menos un 70% respecto a la secuencia de SPINK-1 de origen natural.
- (iii) un anticuerpo anti-FXII/FXIIa, donde el anticuerpo se une a FXII/FXIIa e inhibe su actividad y/o activación.
- 35 2. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicho sujeto humano o animal tiene un riesgo hemorrágico que no es mayor y que se determina
- a) mediante el tiempo de hemorragia en la oreja o yema del dedo según Duke y donde dicho tiempo de hemorragia en la oreja o yema del dedo no es más largo de 10 minutos o
b) según el método de Ivy y donde el tiempo de hemorragia no es más largo de 10 minutos o
c) según el método de Marx y el tiempo de hemorragia no es más largo de 4 minutos.
- 40 3. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 donde el procedimiento médico es
- 45 i) cualquier procedimiento que requiera una derivación cardiopulmonar o
ii) la oxigenación y bombeo de sangre mediante oxigenación con membrana extracorpórea o
iii) el bombeo de sangre asistido (interno o externo) o
iv) la diálisis de sangre o
v) la filtración extracorpórea de sangre o
vi) la recolección de sangre en cualquier depósito para su uso posterior en un sujeto humano o animal
o
- 50 vii) el uso de uno o varios catéteres intraluminales venosos o arteriales o
viii) el uso de uno o varios dispositivos para cateterismo cardiaco intervencionista o diagnóstico, o
ix) el uso de uno o varios dispositivos intravasculares o
x) el uso de una o varias válvulas cardiacas artificiales o
xi) el uso de uno o varios injertos artificiales.

4. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, donde el inhibidor de FXII/FXIIa se administra antes, después y/o durante un procedimiento médico que requiere una derivación cardiopulmonar.
- 5 5. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, donde el inhibidor de FXII/FXIIa se administra antes, después y/o durante un procedimiento médico que comprende la recolección de sangre en cualquier depósito para su uso posterior en un sujeto humano o animal.
6. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el inhibidor:
 - 10 i) se administra al donante de sangre antes y/o durante el proceso de donación de sangre o
 - ii) se mezcla con la sangre en el depósito de recolección o
 - iii) se administra al receptor de la sangre antes, durante y/o después de que se administre la sangre al receptor humano o animal
7. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, donde el inhibidor de FXII/FXIIa se administra aplicándolo como recubrimiento en la superficie artificial.
- 15 8. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 donde se añade una cantidad reducida de heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta además del inhibidor de FXII/FXIIa antes y/o durante y/o después del procedimiento médico en comparación con la cantidad de heparina o derivados de esta y/o hirudina o derivados de esta que se administra normalmente antes y/o durante dicho procedimiento médico cuando no se administra inhibidor de FXII/FXIIa.
- 20 9. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 donde no se utiliza heparina ni un derivado de esta, ni hirudina ni un derivado de esta además del inhibidor de FXII/FXIIa.
10. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9 donde dicho sujeto humano o animal tiene un riesgo protrombótico reducido o nulo después del procedimiento médico.
- 25 11. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10 donde dicho sujeto humano o animal tiene un riesgo protrombótico reducido o nulo a continuación de un antagonismo posoperatorio de heparina o derivados de esta y/o un antagonismo posoperatorio de hirudina o derivados de esta y, opcionalmente, donde el riesgo protrombótico está causado por la administración de protramina.
12. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11 donde a dicho sujeto humano o animal se le añade una cantidad reducida o nula de antagonista de heparina y/o antagonista de hirudina después del procedimiento médico, en comparación con la cantidad de dicho antagonista que se administra normalmente después de dicho procedimiento médico cuando no se administra inhibidor de FXII/FXIIa.
- 30 13. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12 para la prevención o el tratamiento del síndrome posperfusión.
- 35 14. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13, donde el inhibidor de FXII/FXIIa comprende SPINK K1, K2 o K3 (SEQ ID NO: 3, 4 o 5).
15. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 14, donde el inhibidor de FXII/FXIIa se conecta a un polipéptido que aumenta la semivida, donde el péptido que aumenta la semivida es opcionalmente albúmina, afamina, alfa-fetoproteína o proteína de unión a la vitamina D, albúmina humana o una variante de esta, una inmunoglobulina o una variante de esta, un Fc de una IgG.
- 40 16. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde el polipéptido que aumenta la semivida se conecta al inhibidor de FXII/FXIIa mediante un conector.
17. Inhibidor de FXII/FXIIa para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, donde el conector es al menos uno de entre:
 - 45 i) escindible;
 - ii) escindible mediante una proteasa de coagulación de la vía de coagulación intrínseca, extrínseca o común; y
 - iii) escindible mediante FXIIa.
- 50 18. Inhibidor de FXII/FXIIa según se ha definido en las reivindicaciones 1 a 17 para su uso para prevenir el bloqueo del flujo de sangre humana en un dispositivo médico extracorpóreo, donde el dispositivo médico es opcionalmente un dispositivo de derivación cardiopulmonar o un dispositivo utilizado para la diálisis de

sangre o la filtración extracorpórea de sangre.

- 5
19. Un dispositivo médico recubierto con un inhibidor de FXII/FXIIa según se ha definido en las reivindicaciones 1 a 18, donde el dispositivo es una máquina de derivación cardiopulmonar, un sistema de oxigenación con membrana extracorpórea para la oxigenación de la sangre, un dispositivo para el bombeo asistido de sangre, un dispositivo de diálisis de sangre, un dispositivo para la filtración extracorpórea de sangre, un depósito para su uso en la recolección de sangre, un catéter intraluminal, un estent, una válvula cardíaca artificial y/o accesorios para cualquiera de dichos dispositivos, incluidos tubos, cánulas, bomba centrífuga, válvula, puerto de acceso venoso y/o desviador.

Figura 1 – WBCT de sangre completa porcina *ex vivo*:

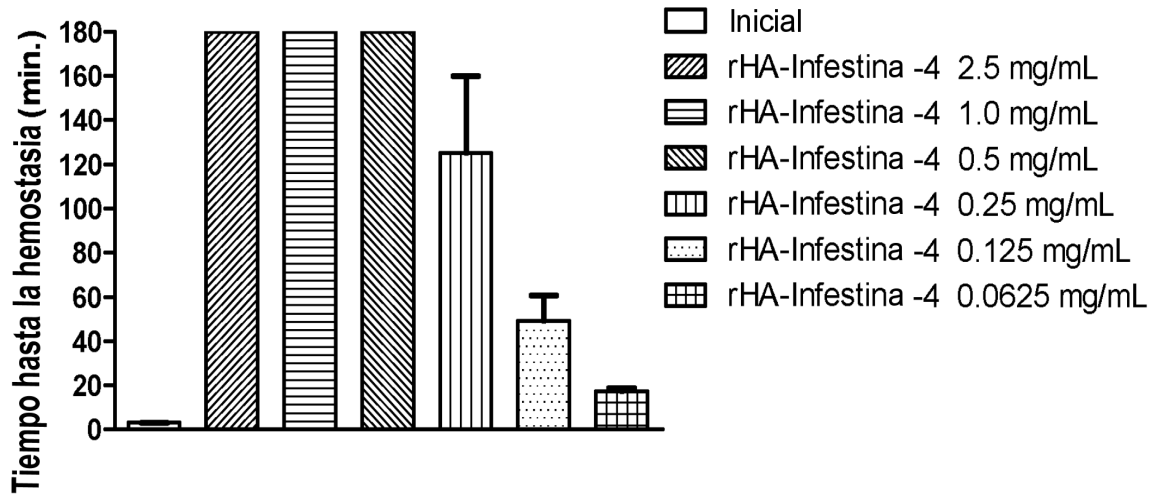


Figura 2 – WBCT de sangre completa murina *ex vivo*:

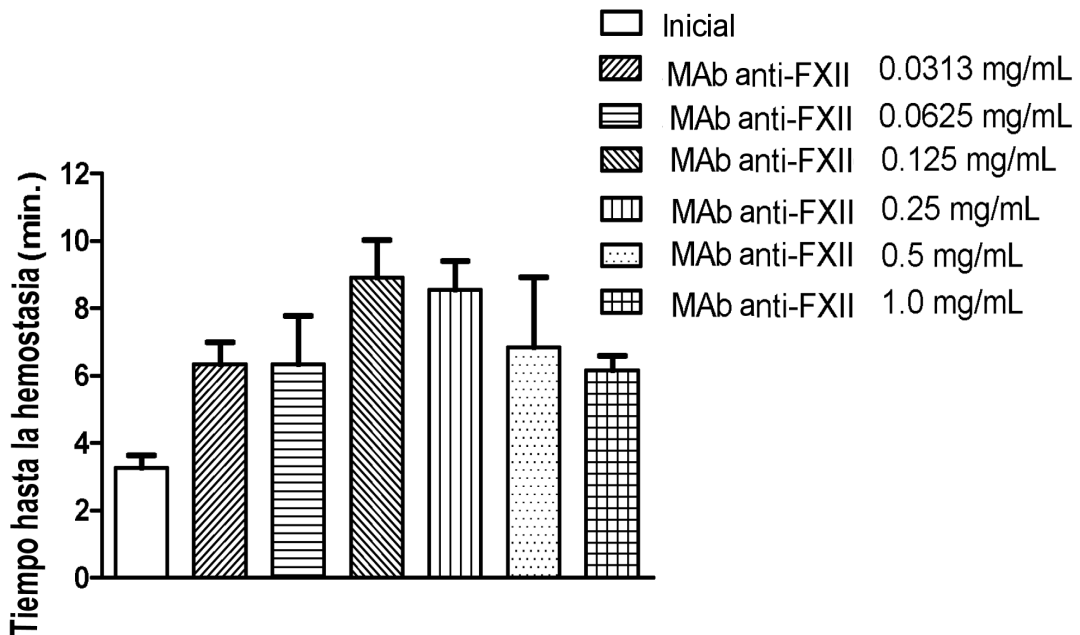
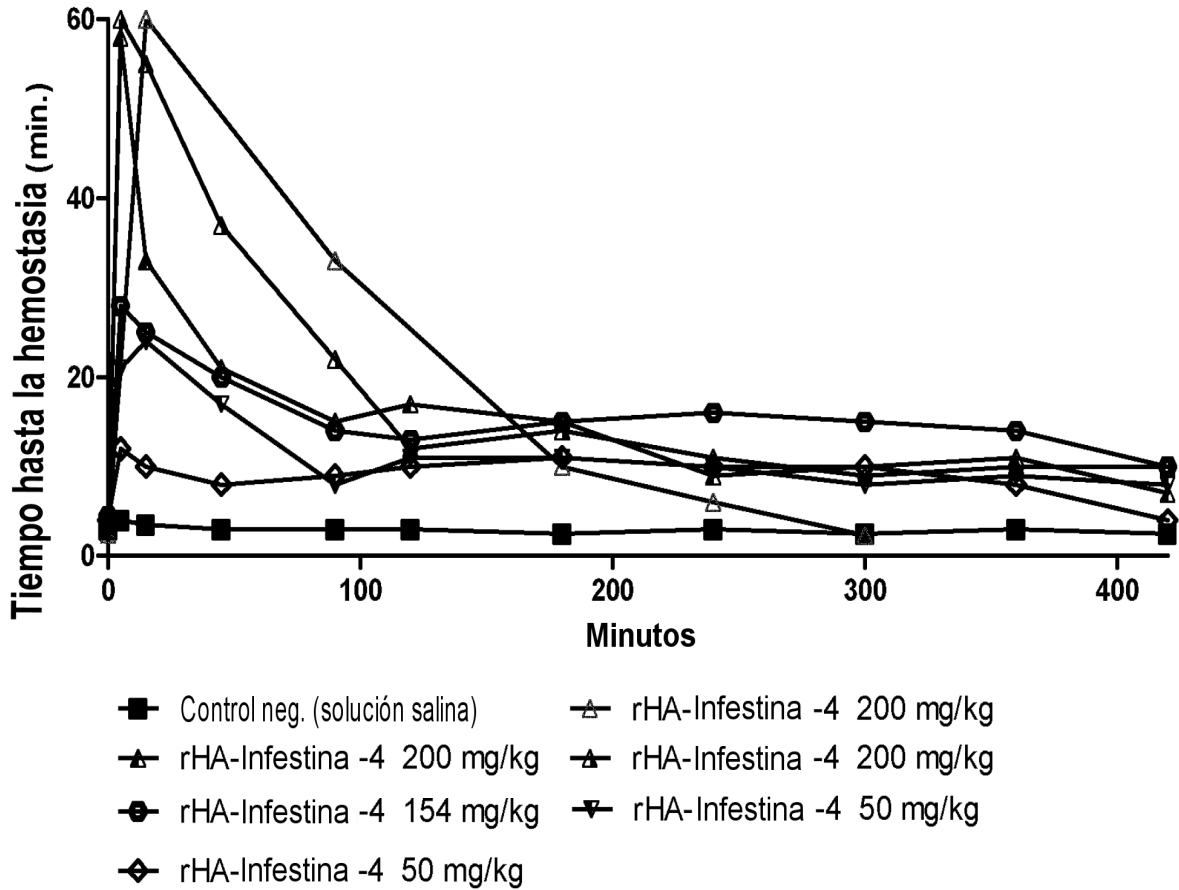


Figura 3 – WBCT de sangre completa porcina (rHA-Infestina-4) ex vivo:

Farmacocinéticas/Tiempo
de coagulación de sangre completa porcina



**Figura 4 – Medición de aPTT de sangre porcina (rHA-Infestina-4) ex vivo:
Farmacocinéticas/aPTT
porcino**

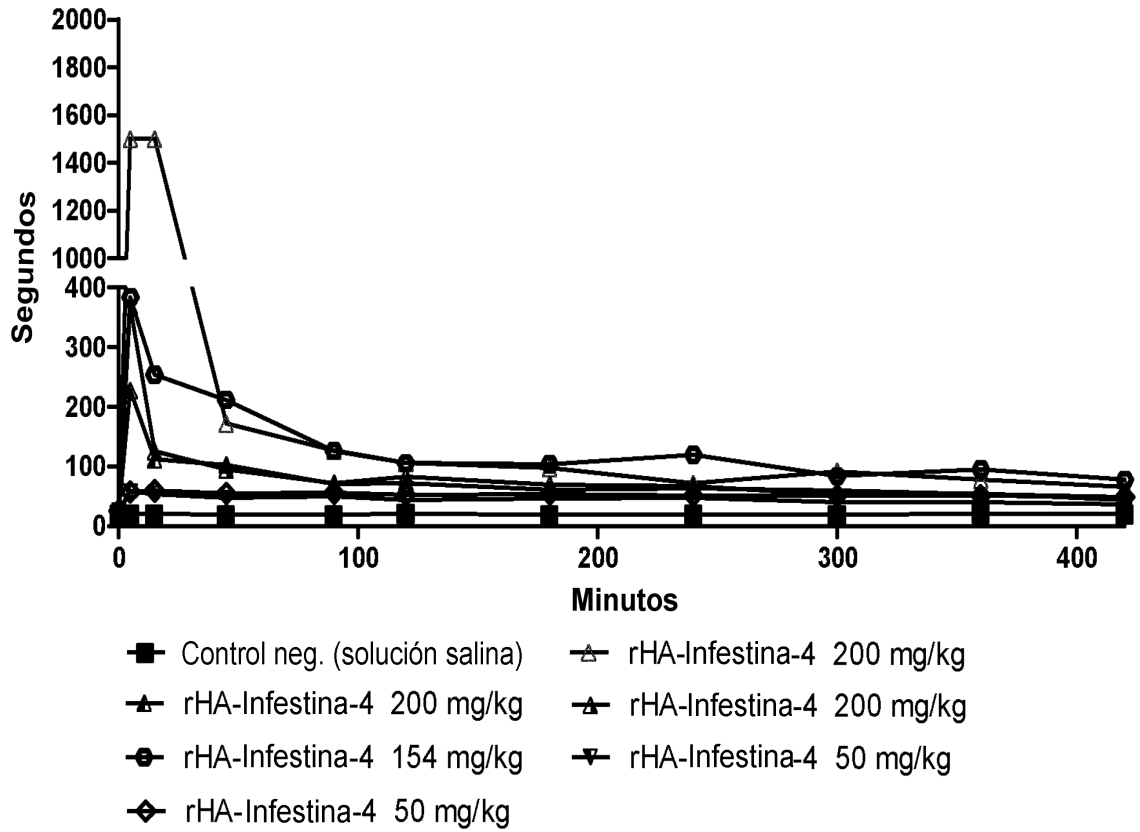
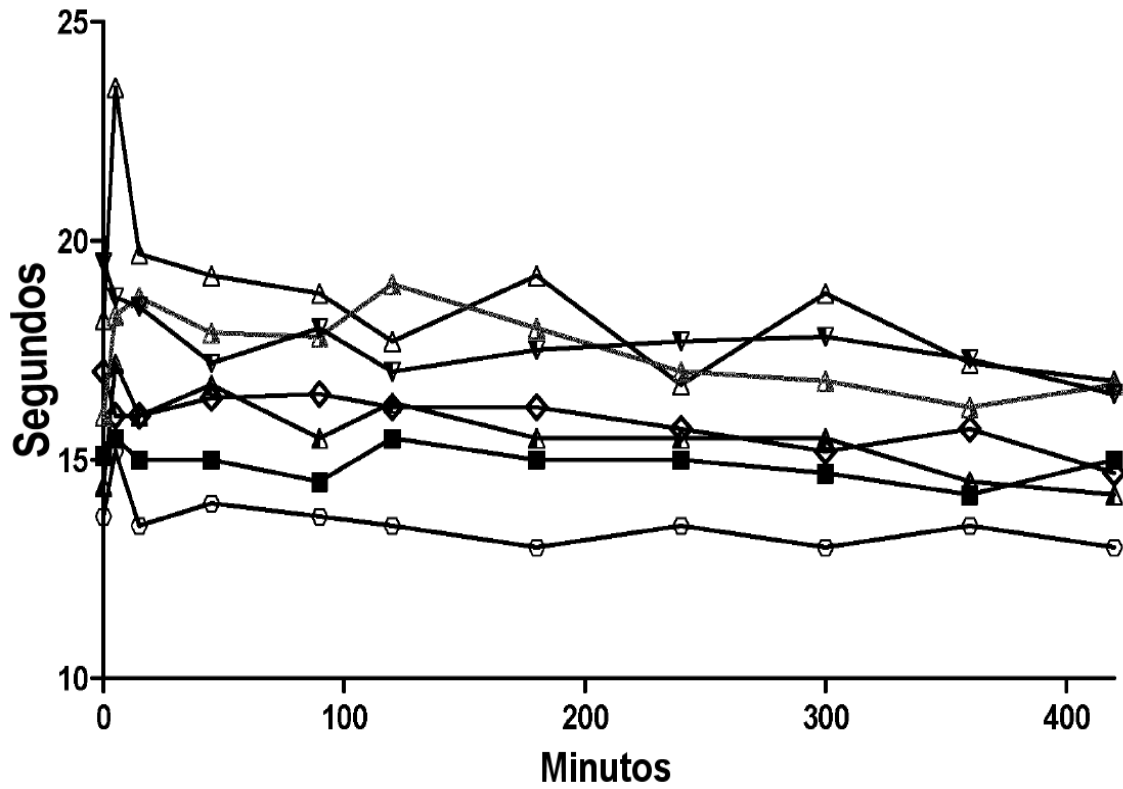


Figura 5– **Medición de PT de sangre porcina (rHA-Infestina-4) ex vivo:**

**Farmacocinéticas/PT
porcino**



- Control neg. (solución salina)
- ▲ rHA-Infestina-4 200 mg/kg
- rHA-Infestina-4 154 mg/kg
- ◇ rHA-Infestina-4 50 mg/kg
- △ rHA-Infestina-4 200 mg/kg
- ▽ rHA-Infestina-4 50 mg/kg

Figura 6 – Tiempo de hemorragia cutánea porcina (rHA-Infestina-4):

Farmacocinéticas/Tiempo de hemorragia cutánea porcina

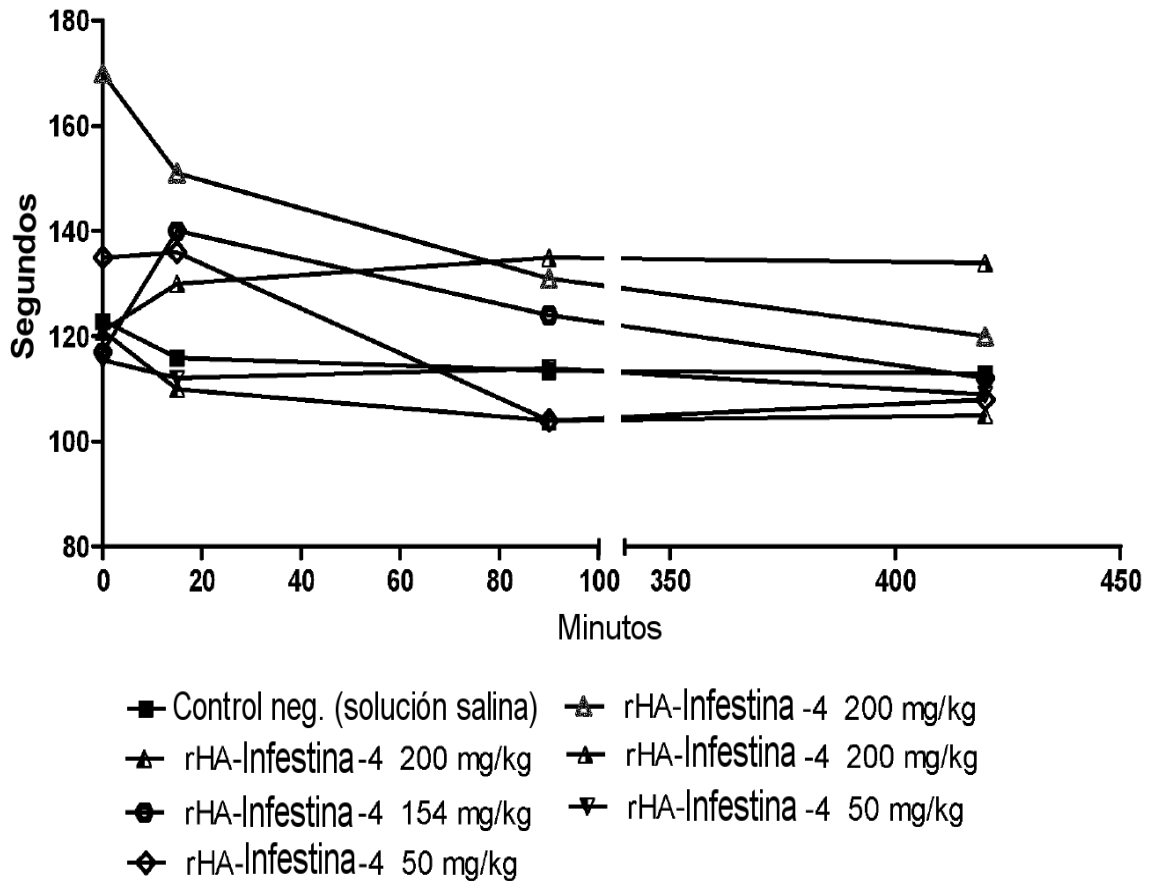


Figura 7 – Circulación extracorpórea en cerdo - diseño de estudio:

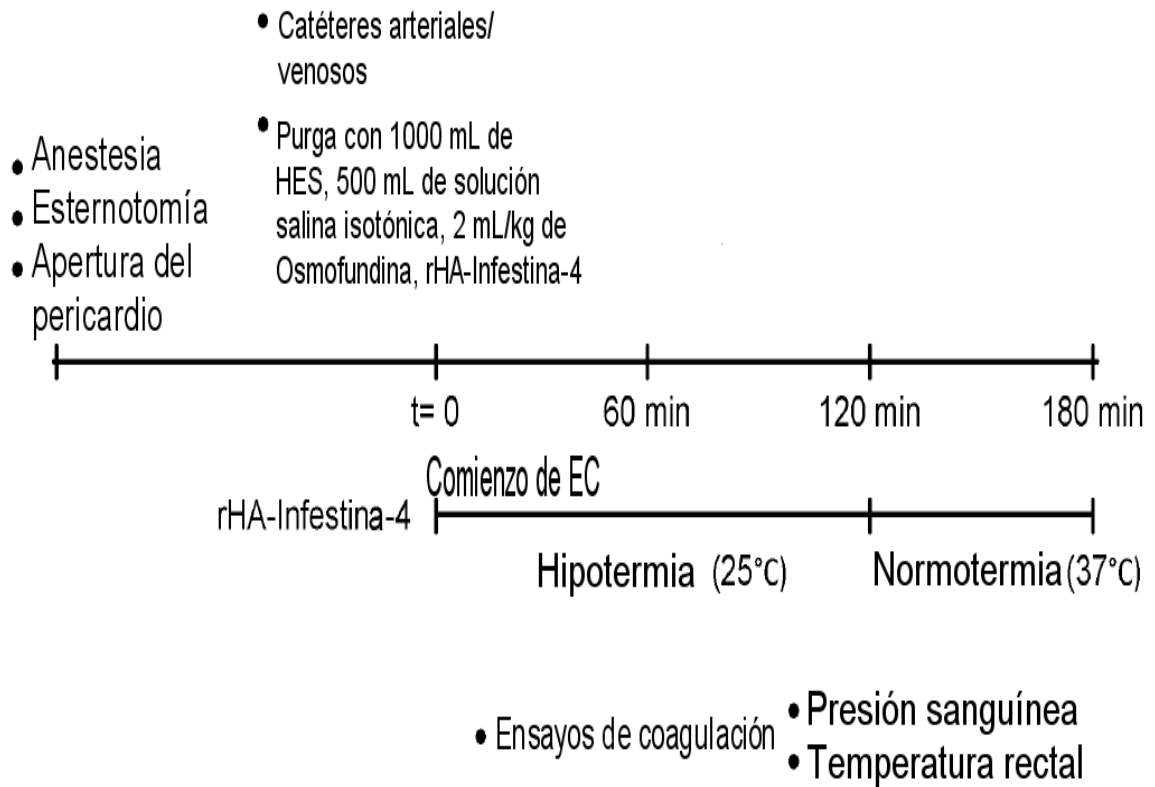


Figura 8 – Ciculación extracorpórea en cerdo - aPTT:

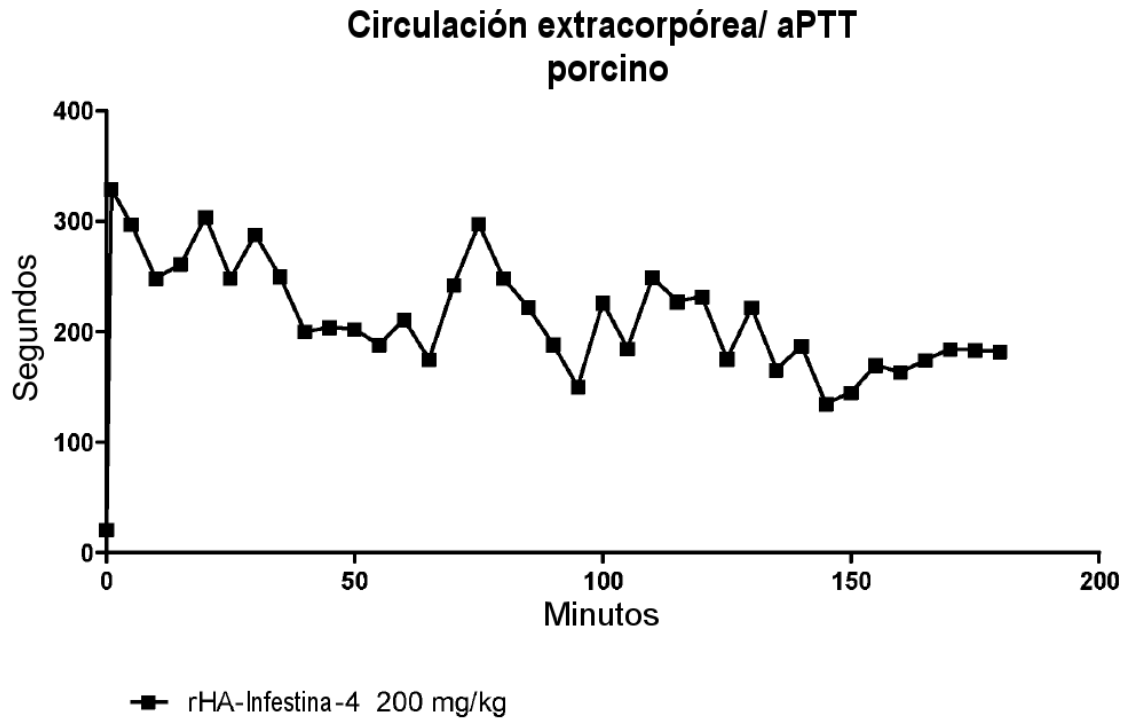


Figura 9 –Cirulación extracorpórea en cerdo - PT:

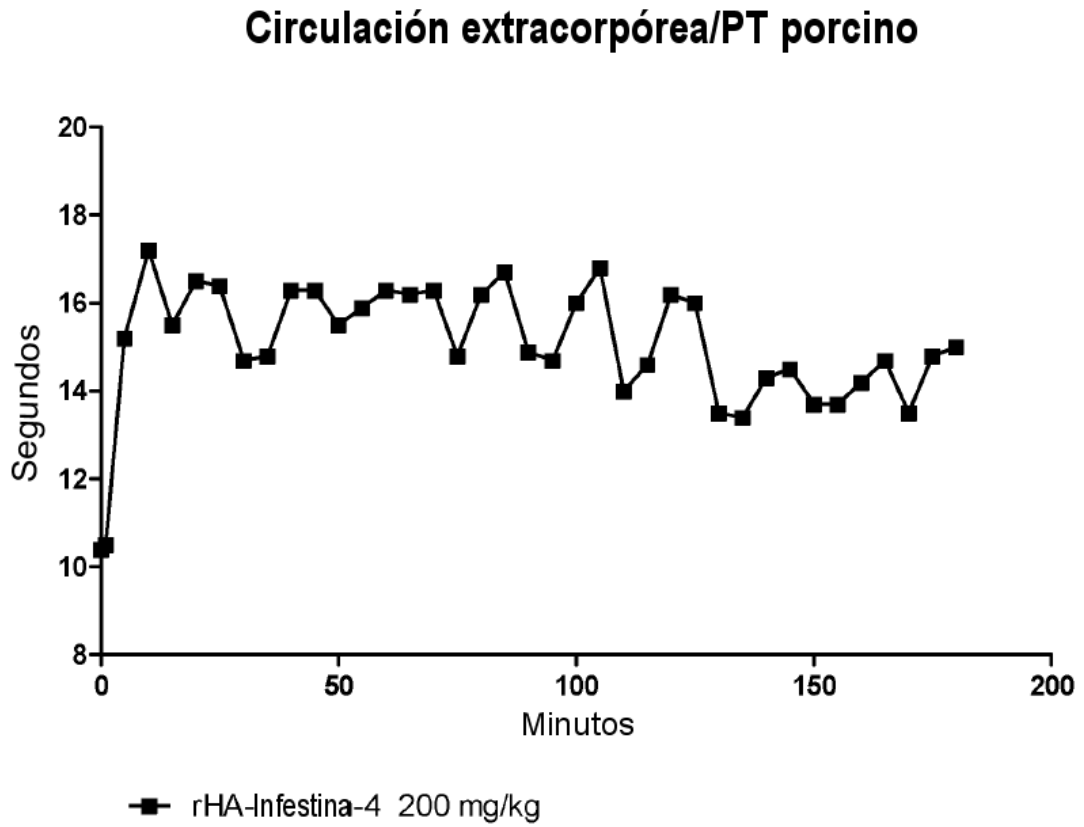


Figura 10 – Circulación extracorpórea en cerdo - tiempo de coagulación de sangre completa

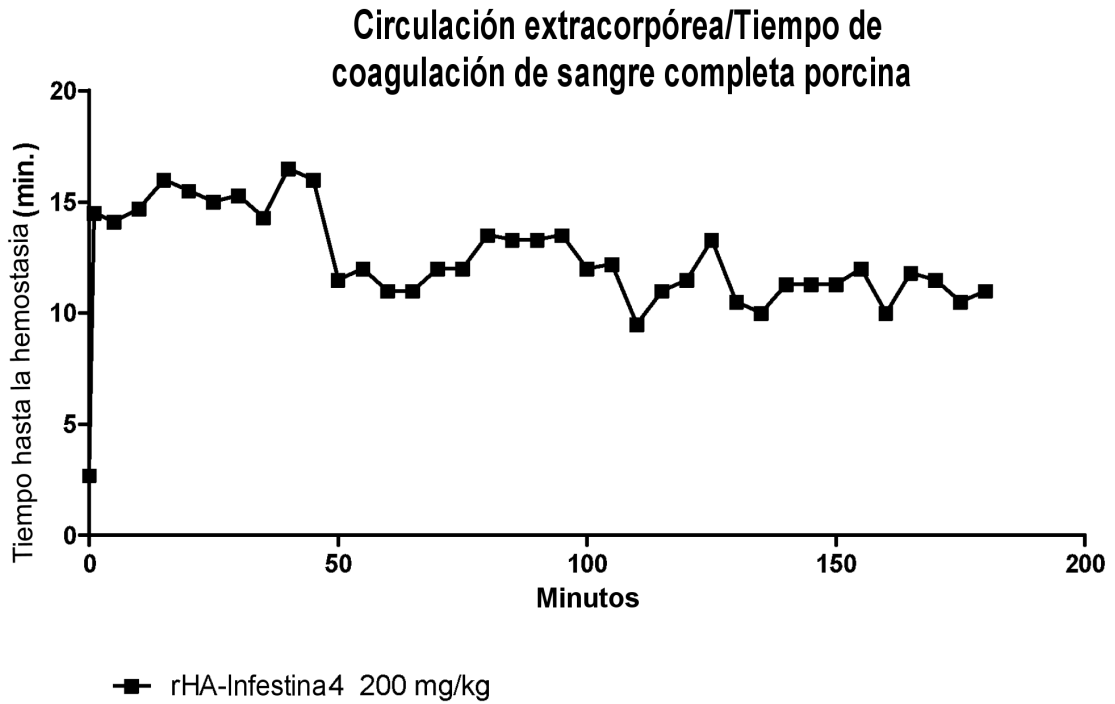


Figura 11

```

###          #####          ##          ##
Rho EGGEPC-----ACPHALHRVCGSDGETYSNPCTLNCAKFNGKPELVKVHGDGPC
I4  EVRNPC-----ACFRNYVPVCGSDGKTYGNPCMLNCAAQTKVPGLKLVHEGRC
SP  GREAKCYNELNGCTKIYDPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRTSILIQKSGPC
      ++++++++          ++  +  +
    
```

