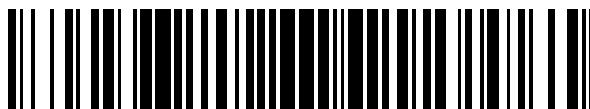


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 776**

51 Int. Cl.:

A61K 38/57 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

C07K 16/38 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2012** **PCT/NL2012/050581**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013** **WO13028070**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2012** **E 12758914 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018** **EP 2747776**

54 Título: **Compuestos para el uso para potenciar la coagulación**

30 Prioridad:

25.08.2011 US 201161527140 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2018

73 Titular/es:

UMC UTRECHT HOLDING B.V. (100.0%)

Yalelaan 40

3584 CM Utrecht, NL

72 Inventor/es:

HACK, CORNELIS ERIK y

YILDIZ, CAFER

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 689 776 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

Compuestos para el uso para potenciar la coagulación.

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere al campo de la medicina, en particular la invención se refiere a factores de coagulación de la sangre, inhibidores de los mismos y su uso para la hemostasia. Más específicamente se divulga un método para potenciar la actividad de trombina para estimular la coagulación de la sangre. La invención se puede utilizar para tratar o prevenir el sangrado excesivo, por ejemplo, debido a un trastorno de sangrado tal como la hemofilia, o debido a cirugía, traumatismo, o al uso de fármacos anticoagulantes, o para detener un sangrado interno.

Antecedentes de la invención

[0002] La coagulación de la sangre, coagulación, es un proceso delicado que se debería activar inmediatamente en caso de herida vascular, y desactivarse cuando la vasculatura está intacta. La patología resulta cuando este proceso se regula incorrectamente: un trastorno de sangrado o sangrado extenso resulta cuando la coagulación se activa demasiado tarde o demasiado débilmente, una enfermedad trombótica sucede cuando la coagulación se activa demasiado pronto o demasiado fuertemente. Esta invención divulga un nuevo método para estimular la coagulación y, por lo tanto, se puede aplicar en enfermedades o condiciones clínicas caracterizadas por el sangrado (excesivo). Estas condiciones incluyen hemofilia A o B, sangrado debido a cirugía o traumatismo, al igual que sangrado interno tal como derrame cerebral hemorrágico y sangrado gastrointestinal, o sangrado por el uso de fármacos anticoagulantes tales como la warfarina o la heparina.

[0003] La coagulación de la sangre comprende una respuesta humoral y una respuesta celular. La primera lleva a la conversión de fibrinógeno soluble en fibrina insoluble, la última a la formación de un tapón de plaquetas. Ambas respuestas están entrelazadas. Por ejemplo, la enzima trombina, que se forma durante la respuesta humoral, es un activador potente de las plaquetas, mientras que las membranas de plaquetas activadas sirven para ensamblar complejos de factores de coagulación, que son fundamentales para un proceso de coagulación eficaz. Los tapones de plaquetas activadas, las hebras de fibrina y los glóbulos rojos y blancos incluidos constituyen juntos un coágulo sanguíneo. Esta patente trata de un nuevo método para potenciar la respuesta humoral de la coagulación de la sangre. La respuesta de coagulación humoral se discutirá, por lo tanto, en primer lugar.

[0004] La respuesta de coagulación humoral está mediada por una serie de proteínas, los factores de coagulación, que circulan como cofactores y proenzimas inactivos. Juntos estos factores constituyen el sistema de coagulación. La activación de la coagulación comprende un proceso que consiste en una activación secuencial de proenzimas y cofactores inactivos de una forma de tipo cascada. En cada etapa, una proteasa de coagulación recién formada catalizará la activación del siguiente factor. La activación se inicia tras el contacto de la sangre con el factor tisular (TF) de la proteína de membrana, que normalmente no se expresa por células endoteliales, pero está presente abundantemente en células subendoteliales tales como las células de músculo liso. Por lo tanto, la interrupción de la capa celular endotelial exponerá sangre a este TF expresado constitutivamente, lo que acciona la coagulación. Durante la activación del sistema de coagulación diferentes complejos de cofactor enzimático se forman, que se ensamblan en las membranas de las células, particularmente células endoteliales y plaquetas activadas. Entre estos complejos de cofactor enzimático se encuentra el del TF y el factor VII activado (TF-FVIIa), donde el FVIIa tiene actividad proteolítica que puede activar los factores X y IX (FX y FIX). El FX activado (FXa) se ensambla con el factor activado V (FVa) para formar el complejo de protrombinasa, que a su vez activa la protrombina en la trombina de la proteasa activa. El TF-FVIIa puede también convertir el factor IX en FIXa que se ensambla con el factor VIII activado (FVIIIa) para generar el complejo FVIIIa-FIXa. La proteasa activa en este complejo es el FIXa, que, al igual que el FVIIa, puede activar el FX.

[0005] Tras el contacto con los estímulos apropiados, por ejemplo, TF, la activación del sistema de coagulación se inicia mediante el complejo TF-FVIIa y se propaga por la acción del complejo FVIIIa-FIXa y se amplifica por la activación del FXI (véase la figura 1).

[0006] Bajo condiciones fisiológicas, la mayoría de respuestas homeostáticas necesitan esta amplificación dependiente del FIX y FVIII para asegurar la activación suficiente del FX (y, por lo tanto, la generación de trombina). Esta necesidad de FVIII y IX se muestra notablemente por las manifestaciones clínicas de deficiencias genéticas de estas proteínas: hemofilia A o B, que son trastornos de sangrado severo y resultan de una deficiencia de FVIII o FIX, respectivamente.

[0007] La hemofilia es un trastorno de sangrado congénito ligado al cromosoma X que resulta generalmente de una deficiencia del FVIII (hemofilia A) o FIX (hemofilia B) de coagulación (Mannucci *et al.*, N Engl J Med 2001, 344:1773-1779). La frecuencia de la enfermedad es de uno en 10 000 nacimientos masculinos. La prevalencia

de la hemofilia A es aproximadamente 5-6 veces la de la hemofilia B, que también es una deficiencia genética ligada al cromosoma X. Clínicamente la hemofilia se categoriza en hemofilia leve, moderada y severa, dependiendo de la gravedad de las manifestaciones de sangrado. Las personas con hemofilia severa tienen frecuentemente un historial de hacerse moretones fácilmente en la infancia temprana, sangrado espontáneo (particularmente en las articulaciones y tejido blando), y sangrado excesivo después de un traumatismo o cirugía. Los pacientes con hemofilia leve apenas padecen episodios de sangrado espontáneo, y principalmente tienen sangrado excesivo inducido por traumatismo o cirugía. Pruebas de coagulación apropiadas confirmarán el diagnóstico y revelarán si un paciente padece hemofilia A o B. La hemofilia A severa se caracteriza por niveles de FVIII funcional muy bajos o ausentes ($< 1\%$ de lo normal), mientras que en el caso de la hemofilia leve los niveles de FVIII funcional son del 5-15 % de lo normal.

[0008] La terapia bajo demanda y profiláctica para pacientes con hemofilia consiste típicamente en terapia de sustitución, que se basa en la complementación del sistema de coagulación defectuoso del paciente con el factor de coagulación carente. Así, a los pacientes con hemofilia A y B se les infunden concentrados de FVIII y FIX, respectivamente, para tratar o prevenir episodios de sangrado. Los pacientes con hemofilia tratados con preparaciones del factor deficitario están, sin embargo, en riesgo de desarrollar anticuerpos neutralizadores (inhibidores) del factor que falta. El factor de coagulación que falta no es endógeno para estos pacientes y, en consecuencia, su sistema inmunológico no se ha vuelto tolerante al mismo. La formación de anticuerpos neutralizadores ocurre en el 15-30 % de los pacientes con hemofilia A severa (Goudemond *et al.*, Blood 2006;107:46-51; Gouw *et al.*, Blood. 2007;109:4693-4697) y en el 1-3 % de los pacientes con hemofilia B. Particularmente los pacientes con defectos genéticos severos que llevan a niveles en plasma de FVIII $< 1\%$ de lo normal, tales como delección o inversión de genes, mutaciones sin sentido y de desplazamiento del marco de lectura, pueden desarrollar inhibidores ya que su sistema inmunológico no se ha vuelto tolerante al FVIII. Cuando los niveles circulantes de inhibidores son altos, los pacientes requieren cantidades muy altas del factor deficitario para superar los efectos neutralizadores de los inhibidores. Tal terapia de alta dosis de FVIII es muy cara. Como una alternativa, se ha desarrollado la terapia de baipás del FVIII. El principio subyacente a estos tratamientos es que el defecto en el complejo FVIII/FIX se evita mediante el uso de formas activadas del FVII, IX y X. Ejemplos de tales terapias de baipás del FVIII son los concentrados de complejo de protrombina activado y FVIIa recombinante (J Astermark *et al.*, Blood. 2007;109:546-551; HR Roberts *et al.*, Blood 2004;104:3858-3864; WK Hoots, Blood 2007;109:395-396). Una desventaja de estas terapias de baipás del FVIII es que son solo adecuadas para terapia bajo demanda.

[0009] La única terapia de baipás del FVIII recombinante autorizada es el FVIIa recombinante (rFVIIa; NovoSeven®, NovoNordisk, Copenhagen, Dinamarca). El rFVIIa estimula la hemostasia mediante la unión, directamente o en el complejo con factor tisular, a fosfolípidos cargados negativamente expuestos en la superficie de plaquetas activadas, dirigiendo así la activación del FX al sitio de la herida. Alternativamente, su efecto se puede deber a un aumento en la proporción de FVIIa y FVII. El rFVIIa detiene el sangrado en el 70-75 % de los pacientes con inhibidores. Una limitación de la terapia de baipás del FVIII con rFVIIa o complejo de protrombina activado es que es costosa y no aplicable como terapia profiláctica debido a su breve semivida de 2-3 horas. No obstante, el tratamiento profiláctico de la hemofilia previene la artropatía hemofílica y mejora la calidad de vida (Manco-Johnson *et al.*, N Engl J Med 2007; 357:535-44). Por lo tanto, hay una necesidad médica sin cubrir de terapia de baipás del FVIII profiláctica de hemofílicos con inhibidores de FVIII. Es un objeto de la presente invención proporcionar tal terapia.

[0010] Diversas otras condiciones clínicas están acompañadas por sangrado excesivo o no deseado tal como el sangrado inducido por cirugía, sangrado debido a la guerra o accidentes de tráfico, sangrados internos tales como derrame cerebral hemorrágico y sangrado gastrointestinal, y sangrado asociado al uso de anticoagulantes tales como la warfarina. Estas condiciones se pueden tratar con agentes hemostáticos que se aplican localmente tales como selladores de fibrina, o con rFVIIa administrado sistémicamente. El tratamiento de estas condiciones con rFVIIa, sin embargo, tiene un riesgo de activar procesos tromboembólicos que conducen a efectos secundarios serios (O'Connel *et al.*, JAMA. 2006;295:293-298; Levi *et al.*, N Engl J Med 2010;363:1791-1800). Este riesgo tromboembólico posiblemente tiene que ver con el hecho de que el rFVIIa es una proteasa de coagulación activa. La infusión del rFVIIa en la circulación da como resultado, por lo tanto, la presencia de una proteasa de coagulación activa en todas partes en la circulación. Además, el rFVIIa es difícil de evaluar debido a la falta de un ensayo simple para controlar sus efectos farmacodinámicos.

[0011] Es un objeto de la presente invención proporcionar nuevos compuestos y métodos para el tratamiento y la prevención de un sangrado excesivo debido a cirugía, accidentes y otras condiciones. A diferencia de la terapia con rFVIIa, los nuevos compuestos y métodos de la invención se pueden usar como una terapia profiláctica, al igual que como terapia bajo demanda, y su dosificación requerida terapéuticamente se puede evaluar y controlar con un ensayo al lado del paciente simple y conveniente.

Resumen de la invención

[0012] La invención proporciona un método para el tratamiento y la prevención de un sangrado excesivo, que comprende la administración de un inhibidor de antitrombina III (AT) para reducir los niveles de AT funcional para

un paciente con sangrado o un paciente con riesgo de sangrado. Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un inhibidor de antitrombina III (AT) para el uso en el tratamiento y la prevención de un sangrado: i) en un sujeto que padece un trastorno de sangrado adquirido o genético (hipocoagulabilidad); o, ii) en un sujeto que tiene una condición clínica caracterizada por sangrado excesivo, donde el sangrado no se debe al uso de anticoagulantes; donde el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en: a) un péptido o peptidomimético que imita la secuencia de aminoácidos de los residuos P1-P14 del RSL; b) un aptámero que se enlaza específicamente a la antitrombina III; y, c) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se enlaza específicamente a la antitrombina III, y donde el inhibidor, cuando se añade a plasma agrupado de voluntarios sanos, causa una reducción de los niveles de antitrombina III funcional de al menos el 20 % medido con unos ensayos cromogénicos para la antitrombina III funcional usando el Factor Xa o trombina. Este uso médico es sorprendente y nuevo, ya que los inhibidores de AT nunca se han descrito como un método terapéutico para tratar o prevenir el sangrado en pacientes. La invención se puede aplicar en hemofilia, cirugía, traumatismo u otras condiciones en las que ocurre sangrado excesivo tal como el uso de anticoagulantes, y también en el caso de sangrado interno tal como derrame cerebral hemorrágico o sangrado gastrointestinal tal como sangrado esofágico debido a varices. El uso médico descrito por la presente invención también se puede usar para prevenir el sangrado en pacientes con riesgo de sangrado, por ejemplo, en los pacientes con hemofilia para prevenir el sangrado en articulaciones, tejidos musculares y/o blandos de un paciente con hemofilia. El sangrado se puede evitar en tal paciente mediante tratamiento con un inhibidor de AT.

[0013] En algunas formas de realización, el inhibidor de AT es una molécula que se enlaza a la AT e inhibe la función de la AT o aumenta la liquidación de la AT en humanos o en un animal. En otras formas de realización de la invención esta molécula de unión es un péptido o un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. También otras moléculas tales como compuestos químicos, que se enlazan a la AT e inhiben su función, están en el alcance de la presente invención.

[0014] En algunas formas de realización de la invención, el inhibidor de AT es un anticuerpo monoclonal, humano, humanizado o a partir de una especie animal, o fragmento del mismo, que se enlaza a la AT e inhibe la actividad de la AT.

[0015] En otras formas de realización de la invención, el inhibidor de AT es un anticuerpo monoclonal, humano, humanizado o a partir de una especie animal, o fragmento del mismo, que se enlaza a la AT y reduce los niveles de AT en humanos o en un animal.

[0016] En otras formas de realización de la invención, el inhibidor de AT son anticuerpos policlonales, o fragmentos de los mismos, que inhiben la actividad de la AT.

[0017] En otras formas de realización de la invención, el inhibidor de AT es un anticuerpo policlonal, humano, humanizado o a partir de una especie animal, o fragmento del mismo, que se enlaza a la AT y reduce los niveles de AT en humanos o en un animal.

[0018] En otras formas de realización de la invención, el inhibidor de AT es una molécula que no es un anticuerpo tal como un aptámero, péptido o compuesto químico que se enlaza a la AT e inhibe la actividad de la AT.

[0019] En otras formas de realización de la invención, el inhibidor de AT es una molécula que no es un anticuerpo tal como un aptámero, proteína, péptido o compuesto químico que se enlaza a la AT y reduce los niveles de AT en humanos o en un animal.

[0020] En algunas formas de realización de la invención, el inhibidor de AT se enlaza a la AT y bloquea sitios en la AT implicados en la interacción de la AT con sus proteasas objetivo. En otras formas de realización de la invención, el inhibidor de AT se enlaza a sitios en la AT previniendo así el aumento de la actividad funcional de la AT mediante heparina u otros glicosaminoglicanos.

[0021] En una forma de realización preferida de la presente invención, el inhibidor de AT previene la inserción del bucle del sitio reactivo de la AT en la lámina β central de la AT, que causa la inactivación proteolítica de la AT mediante sus proteasas objetivo.

[0022] En otra forma de realización de la invención, el inhibidor de AT se administra para tratar o prevenir el sangrado en un paciente con hemofilia con deficiencia de FVIII que puede tener o puede no tener anticuerpos neutralizadores contra el FVIII. En otras formas de realización, el paciente con hemofilia tiene deficiencia de actividad de FIX y puede tener o puede no tener anticuerpos neutralizadores contra el FIX.

[0023] En otra forma de realización de la invención, el inhibidor de AT se administra para tratar o prevenir el sangrado en un paciente con hemofilia con deficiencia de FXI. En otras formas de realización, se da inhibidor de AT para tratar o prevenir el sangrado en un paciente con una deficiencia de factor de coagulación diferente del FVIII, FIX o FXI.

[0024] En una forma de realización, el inhibidor de AT según la invención reduce o previene la posibilidad de generar inhibidores para FVIII en un paciente con hemofilia A, disminuyendo así la necesidad de FVIII. En otra forma de realización, el inhibidor de AT según la invención reduce o previene la posibilidad de generar inhibidores para FIX en un paciente con hemofilia B.

[0025] En una forma de realización, el inhibidor de AT según la invención administrado a pacientes no hemofílicos que padecen sangrado (excesivo), donde el sangrado no se debe al uso de anticoagulantes. Así, en una forma de realización, la invención se refiere a un inhibidor de AT para el uso en la prevención o el tratamiento de una condición clínica caracterizada por sangrado excesivo, tal como, por ejemplo, cirugía, traumatismo y sangrado interno.

[0026] Según las formas de realización de la invención anteriormente descritas, una cantidad hemostática de inhibidor de AT se administra a dicho paciente. Dicha cantidad es preferiblemente una cantidad hemostática eficaz.

[0027] En algunas formas de realización, la dosificación de inhibidor de AT que se va a administrar a un paciente con hemofilia se calcula a partir de un ensayo *in vitro* que se utiliza para establecer la concentración de dicho inhibidor de AT que puede compensar el factor de coagulación que es deficitario en dicho plasma, que comprende a) añadir al plasma de un paciente con hemofilia una dilución de factor tisural y Ca^{2+} en concentraciones donde el tiempo de coagulación depende de la adición del factor de coagulación (por ejemplo, FVIII o FIX) que es deficitario en dicho plasma; b) medir la generación de fibrina o la generación de trombina en el plasma hemofílico en ausencia de dicho factor de coagulación; c) medir la generación de fibrina o la generación de trombina en el plasma hemofílico en presencia del factor de coagulación deficitario añadido para conseguir concentraciones de 0,01 a 1 U/ml, donde 1 U/ml es la cantidad de factor presente en el plasma humano normal agrupado; y d) medir la generación de fibrina o la generación de trombina (así como los niveles de AT) en el plasma hemofílico en ausencia de dicho factor de coagulación, pero en presencia de varias concentraciones de inhibidor de AT. El nivel deseado de AT funcional que se debe conseguir mediante la administración de inhibidor de AT se puede estimar por comparación de la generación de trombina y la formación de fibrina en diferentes niveles de inhibidor de AT con aquellos observados en diferentes niveles del factor deficitario.

[0028] En otra forma de realización, la dosificación de inhibidor de AT que se debe administrar a un paciente con hemofilia con inhibidores se calcula a partir de un ensayo *in vitro* que se utiliza para establecer la concentración de dicho inhibidor de AT que puede compensar el factor de coagulación que es deficitario en dicho plasma, que comprende: a) añadir al plasma de un paciente con hemofilia con inhibidores de FVIII o IX una dilución de factor tisural y Ca^{2+} en concentraciones donde el tiempo de coagulación sería dependiente de la adición del factor de coagulación (por ejemplo, FVIII o FIX) en el plasma hemofílico con inhibidores; b) medir la generación de fibrina o la generación de trombina en el plasma hemofílico con inhibidores; y c) medir la generación de fibrina o la generación de trombina en el plasma normal agrupado. La dosis de inhibidor de AT que normaliza la generación de trombina y la formación de fibrina se puede seleccionar como el nivel objetivo para la administración *in vivo*. La dosis de inhibidor de AT que se debe usar *in vivo* se controla entonces mediante la administración de inhibidor de AT al paciente mientras se mide el nivel de AT funcional en la circulación.

[0029] En otra forma de realización, la divulgación proporciona un método para estimar la capacidad del inhibidor de AT para estimular la formación de fibrina y la generación de trombina y la actividad en un plasma a partir de un paciente no hemofílico con sangrado debido a cirugía, traumatismo, el uso de anticoagulantes o debido a otra razón, que comprende: a) proporcionar plasma de este paciente con una dilución de factor tisular; b) medir la generación de fibrina o la generación de trombina en ese plasma; c) medir la generación de fibrina o la generación de trombina en presencia de una dosis de inhibidor de AT que causa una caída de la actividad de entre 0 y 1 U/ml (0 y 100 % de lo normal, respectivamente); y d) medir la generación de fibrina o la generación de trombina en dicho plasma en ausencia o presencia de inhibidor de AT, para establecer la capacidad del inhibidor de AT para aumentar la formación de fibrina o la generación de trombina en dicho plasma.

[0030] En otra forma de realización, la dosis de inhibidor que se va a usar *in vivo* se controla mediante la administración de inhibidor de AT al paciente mientras se mide el nivel de AT funcional en la circulación.

[0031] En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar un paciente con sangrado o un paciente con riesgo de sangrado, que comprende la administración al paciente de un inhibidor de AT para obtener una concentración en plasma de AT funcional por debajo del 80 % de lo normal, preferiblemente entre el 20 y 80 %, preferiblemente entre el 20 y 60 % de lo normal, más preferiblemente entre el 40 y 60 % de lo normal, más preferiblemente de aproximadamente el 50 % de lo normal. Así, preferiblemente, el inhibidor se administra en una cantidad que reduce la actividad funcional de la AT a al menos el 90, 80, 50, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,2, 0,1 % del nivel de la AT normal, donde la AT normal se entiende aquí preferiblemente como el nivel en el plasma agrupado de voluntarios sanos.

[0032] En algunas formas de realización, la invención proporciona un método para tratar un paciente no hemofílico con un episodio de sangrado mediante la administración al paciente de inhibidor de AT para obtener una concentración en plasma de AT funcional por debajo del 80 % de lo normal, preferiblemente entre el 20 y 80 %, preferiblemente entre el 20 y 60 % de lo normal, más preferiblemente entre el 40 y 60 % de lo normal, más preferiblemente de aproximadamente el 50 % de lo normal. La dosis de inhibidor de AT administrada se controla utilizando un ensayo para niveles en plasma de AT funcional.

[0033] En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un paciente que tiene un nivel hemostático subóptimo de deficiencia de FVIII de FVIII administrado al paciente en combinación con inhibidor de AT, para producir una cantidad hemostática eficaz de la mezcla. En algunas formas de realización, el FVIII, en combinación con el inhibidor de AT, se administra en un nivel lo suficientemente bajo como para no provocar una respuesta inmune en el paciente al FVIII.

Descripción detallada de la invención

[0034] La activación excesiva de coagulación *in vivo* se regula mediante diferentes inhibidores. Un inhibidor principal es la antitrombina III (AT), que pertenece a la familia de proteínas de inhibidores de serina proteinasa o serpinas. Hasta ahora nadie ha mostrado o sugerido que la inhibición de la AT constituye un enfoque terapéutico para potenciar la coagulación. La presente invención divulga el hallazgo inesperado de que la inhibición de la AT constituye una opción terapéutica para pacientes con hemofilia u otros trastornos de sangrado. Mediante la administración de un inhibidor de AT, por ejemplo, un anticuerpo inhibidor, a un paciente que padece o con riesgo de sangrado, los niveles de AT se reducen permitiendo que se genere más trombina y prolongando la actividad de trombina, lo que conduce a la generación de más fibrina y la formación de coágulos sanguíneos más eficaz.

Razonamiento de la invención

[0035] La AT inhibe diferentes proteinasas de coagulación particularmente trombina y FXa, y también FVIIa, FIXa y FXIa. Se ha estimado que aproximadamente el 80 % de la cantidad de la trombina generada *in vivo* se neutraliza mediante AT. Niveles disminuidos de AT funcional, por ejemplo, debido a una deficiencia heterocigota genética, dan como resultado menos inhibición de trombina, FXa, FIXa, FXIa y FVIIa y, por lo tanto, más generación de fibrina. En particular, a niveles de AT decrecientes, no solo se prolonga la semivida de la actividad de trombina, sino que también se generan más moléculas de trombina a medida que la semivida del FXa, la proteasa de coagulación que genera trombina a partir de protrombina, también se prolonga. La actividad de FXa prolongada aumenta el número de moléculas de protrombina convertidas en trombina mediante la molécula FXa. Así, los efectos procoagulantes de la reducción de los niveles de AT se deben a una semivida más larga de la trombina al igual que a una cantidad aumentada de la trombina generada. Esto contrasta con todas las otras formas de baipás del FVIII tales como la terapia con rFVIIa, que solo aumenta la generación de trombina, pero no tiene ningún efecto en la semivida de la trombina. La inhibición de la AT en pacientes con sangrado o con riesgo de sangrado constituye un nuevo principio terapéutico que nunca se ha descrito en la bibliografía.

[0036] El defecto primario en la hemofilia es la ausencia de amplificación de generación de trombina vía el bucle FVIII/FIX (véase la figura 1). Sin embargo, alguna generación de trombina ocurre en ausencia del bucle FVIII/FIX ya que la vía de activación directa del FX mediante el complejo FVIIa/TF está intacta. En el plasma, la trombina se inhibe en el 60-90 % mediante AT. Además, también las actividades de FXa y FIXa se inhiben mediante AT. Una forma de realización de la presente invención es la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de un inhibidor de AT para reducir la inhibición de FXa y trombina mediante AT. Como consecuencia, la semivida de ambas proteasas se prolonga dando como resultado un mayor número de moléculas de protrombina convertidas en trombina por molécula de FXa, y un mayor número de moléculas de fibrinógeno convertidas en fibrina por molécula de trombina. Así, mediante la reducción de los niveles funcionales de AT, se genera más trombina y la semivida de la actividad de trombina se prolonga. Esto compensa la generación disminuida de trombina que ocurre en la hemofilia como consecuencia de una función defectuosa del bucle FVIII/FIX. Sobre todo, este efecto doble de inhibición de la AT, que aumenta el número de moléculas de trombina generadas al igual que prolonga la actividad de trombina, es exclusivo del concepto de inhibición de la AT y no se comparte con ninguno de los otros procedimientos de baipás del FVIII. Esto hace de la inhibición de la AT, en principio, el método de baipás del FVIII más potente.

[0037] La inhibición de la AT en sí misma no es un desencadenante para la activación de la coagulación, ya que la activación requiere proteasas activas. La interacción del TF con FVII(a) y la activación posterior del FIX y FX genera proteasas activas en el sitio de expresión del TF (véase la figura 1). Así, aunque debido al nivel inferior de AT funcional, la coagulación ocurre más fácilmente en presencia de inhibidores de AT, esta formación de coágulos se limitará principalmente, si no exclusivamente, a lugares en el cuerpo donde el TF se expone a la sangre, por ejemplo, en las paredes de los vasos dañados. Esto contrasta con el tratamiento con FVIIa recombinante, que se administra como una proteasa activa y se volverá disponible en todo el sistema circulatorio entero.

Aspectos de la invención

[0038] Así, en un primer aspecto, la divulgación se refiere a un inhibidor de AT para el uso como un medicamento. El inhibidor es preferiblemente un inhibidor de AT como se define en este documento a continuación.

[0039] En un segundo aspecto, la invención se refiere a un inhibidor de AT para el uso en el tratamiento y la prevención de un sangrado en un sujeto que padece un trastorno de sangrado adquirido o genético (hipocoagulabilidad) o en un sujeto que tiene una condición clínica caracterizada por sangrado excesivo, donde el sangrado no se debe al uso de anticoagulantes; donde el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en: a) un péptido o peptidomimético que imita la secuencia de aminoácidos de los residuos P1-P14 del RSL; b) un aptámero que se enlaza específicamente a la antitrombina III; y, c) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se enlaza específicamente a la antitrombina III, y donde el inhibidor, cuando se añade a plasma agrupado de voluntarios sanos, causa una reducción de los niveles de antitrombina III funcional de al menos el 20 % medido con unos ensayos cromogénicos para antitrombina III funcional usando el Factor Xa o trombina. Alternativamente en este aspecto, la invención se refiere al uso de un inhibidor de AT para la producción de un medicamento para el tratamiento y la prevención de un sangrado en un sujeto que padece un trastorno de sangrado adquirido o genético (hipocoagulabilidad) o en un sujeto que tiene una condición clínica caracterizada por sangrado excesivo. En este aspecto, el inhibidor de AT es preferiblemente un inhibidor como se define en este documento a continuación. Asimismo, el tratamiento y la prevención de un sangrado en un sujeto que padece un trastorno de sangrado adquirido o genético (hipocoagulabilidad) o en un sujeto con una condición clínica caracterizada por sangrado excesivo son preferiblemente como se define en este documento a continuación.

[0040] En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o reducir el riesgo de sangrado en un sujeto que padece un trastorno de sangrado adquirido o genético (hipocoagulabilidad) o en un sujeto que tiene una condición clínica caracterizada por sangrado excesivo, donde el método comprende el paso de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de AT. El inhibidor de AT es preferiblemente un inhibidor como se define en este documento a continuación. Asimismo, el trastorno de sangrado adquirido o genético (hipocoagulabilidad) y la condición clínica caracterizada por sangrado excesivo son preferiblemente como se describe en este documento a continuación.

[0041] En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para identificar un compuesto como un inhibidor de AT que se define en este documento a continuación.

Inhibidores de antitrombina III (AT)

[0042] La antitrombina III (AT) es una glicoproteína 58 kDa de la familia de proteínas de las serpinas (inhibidores de serina proteasa). La proteína madura consiste en 432 aminoácidos, y tiene 4 sitios de glicosilación. La AT se produce en el hígado, en células parenquimales. Su concentración en el plasma es de aproximadamente 0,1-0,15 mg/ml o 3,5 µM. La AT desaparece de la circulación con una semivida aparente de 2-3 días. Los niveles antigénicos y de actividad se expresan como un porcentaje del nivel normal o como U/ml, donde 1 U es la cantidad en el plasma humano agrupado. La AT se expresa tanto como una forma α y una forma β . La α -AT representa el 90 % de la AT y se glicosila en todas las cuatro posiciones. Aunque solo comprende el 10 % de la AT, la β -AT tiene una afinidad más alta a la heparina, no se glicosila en una posición (N135), y ejerce un efecto anticoagulante mayor en general que la α -AT.

[0043] La AT es el inhibidor fisiológico más importante de la vía de coagulación. Como su nombre implica, la AT inhibe la trombina. Además, la AT es capaz de inhibir todos los otros factores de coagulación proteolíticos (por ejemplo, FIXa, FXa y FXIa). Su actividad anticoagulante principal se debe, sin embargo, a la regulación del FXa, el FIXa y la trombina. Se estima que la AT proporciona el 50-80 % o hasta el 80 % del efecto inhibitorio contra la trombina *in vivo*.

[0044] La acción de la AT se potencia mediante glicosaminoglicanos tales como la heparina y el heparán sulfato, que pueden aumentar la actividad funcional de la AT en 2-3 registros. La heparina consiste en un esqueleto de proteína que lleva un número de disacáridos sulfatados. Las preparaciones crudas contienen moléculas de heparina con un peso molecular que varía de 3 a 40 kDa. Una secuencia de pentasacárido única en la heparina es responsable de la unión de alta afinidad a AT. *In vivo*, el heparán sulfato en el endotelio, y la heparina liberada a partir de gránulos de mastocitos asociados al endotelio son probablemente las fuentes principales de cofactores de la AT.

[0045] La heparina usa dos mecanismos diferentes para acelerar la inhibición de proteasa mediante AT. Un mecanismo es que hace el bucle del sitio reactivo (RSL; en la figura 2 este bucle se llama el bucle de centro reactivo (RCL), véase la figura 2) más accesible a proteasas objetivo, mecanismo que contribuye a la actividad inhibidora mejorada hacia FIXa y FXa. Otro mecanismo es que la heparina proporciona un modelo para AT y sus proteasas objetivo, particularmente trombina. Además de su actividad anticoagulante, se ha mostrado que la AT también tiene funciones antiinflamatorias y antiangiogénicas. Esto no se tratará en este documento.

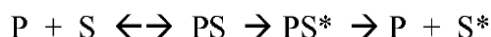
[0046] La importancia fisiológica de la AT se ha mostrado en ratones *knockout* con deficiencia de AT completa. Estos ratones mueren en el útero de trombosis y hemorragia (Ishiguro *et al.*, J Clin Invest.2000;106:873-878). También en humanos la deficiencia total tiene supuestamente efectos letales ya que una deficiencia de AT completa no se ha documentado en humanos mientras que la deficiencia heterocigota ocurre en 1 de 2000-5000 personas. Las personas con deficiencia de AT heterocigota tienen un riesgo aumentado de trastornos tromboembólicos (PS McLean *et al.*, Drugs 2007;67: 1429-1440).

[0047] Los efectos de la inhibición de las proteasas de coagulación mediante AT se han investigado en un sistema con proteínas purificadas en la concentración en plasma normal (van 't Veer *et al.*, J Biol Chem.1997;272:4367-4377). La presencia de AT en niveles normales no afectó a la fase de iniciación de generación de trombina cuando la reacción se inició con FVIIa/TF, ni afectó la AT a la activación de FV. El índice de formación de trombina en presencia de AT se redujo al 30 % del de la reacción desinhibida, y la cantidad de trombina formada fue rápidamente aplacada después de su generación. La presente invención divulga que la reducción de los niveles de AT se puede usar como un principio terapéutico en pacientes con sangrado severo o con riesgo de sangrado severo.

[0048] La AT pertenece a la superfamilia de proteínas de las serpinas (inhibidores de serina proteasa) que se encuentran ampliamente en la naturaleza, por ejemplo, en animales, plantas, bacterias y virus (véase para revisión: Ruby HP Law *et al.*, Genome Biology 2006;7:216.1-216.11). La mayoría de las serpinas tienen nombres bien conocidos que en su mayoría se refieren a la función que ha llevado a su descubrimiento. Aunque para algunas serpinas como la AT el nombre tradicional más o menos cubre sus funciones biológicas principales, para algunas otras serpinas su nombre tradicional es confuso en este aspecto. Por ejemplo, la α 1-antitripsina y la α 1-antiquimiotripsina se han descubierto debido a su poder para inhibir las enzimas digestivas tripsina y quimiotripsina, respectivamente, pero su función principal *in vivo* es inhibir proteasas neutrofílicas, elastasa y proteasa 3, y catepsina G, respectivamente. Las serpinas se clasifican en 16 clados (A-P). El nombre sistemático de cada serpina, es SERPINXy, donde X es el clado e y es el número en el clado. Según esta clasificación la AT es serpinC1. Los seres humanos tienen genes que codifican 36 serpinas. La mayoría de las serpinas sirven como inhibidor de proteasa, aunque algunas han adoptado funciones diferentes.

[0049] La estructura básica de las serpinas se compone de aproximadamente 400 aminoácidos, algunas tienen bucles de inserción N-, C-terminales o internos grandes. La mayoría de las serpinas tienen modificaciones postranslacionales tales como glicosilación, sulfatación, fosforilación y oxidación para alterar su función. Las serpinas comparten una estructura 3D altamente conservada compuesta de un haz de 9 hélices α (A-I) y un sándwich β compuesto por tres láminas β (A-C) (véase la figura 2). Otra característica típica de las serpinas es el bucle del sitio reactivo (RSL) que sobresale del cuerpo de la proteína y se presenta a las proteasas como una especie de cebo. El RSL está normalmente compuesto de 20 aminoácidos que van de P17 en el N-terminal a P3' en el extremo C-terminal (según esta nomenclatura P1-P1' constituyen el enlace escindible, que se puede escindir mediante proteasas). En el estado nativo normal de una serpina, la lámina β A, o la lámina β central, se compone de cinco cadenas y el RSL (que conecta el C-terminal de la cadena 5A al N-terminal de la cadena 1C) está expuesto. Notablemente, la estabilidad termodinámica de esta conformación no es óptima, la incorporación del RSL en la lámina β central produce una conformación más estable. Esta conformación estable se consigue o bien tras la escisión proteolítica del RSL mediante una proteasa (no objetivo), en cuyo caso la proteasa se libera de la serpina antes de que se complete la inserción del RSL en la lámina β central, o bien durante la formación del complejo con una proteasa objetivo, en cuyo caso la proteasa sigue estando enlazada de manera covalente al residuo de aminoácido en la posición P1 cuando se completa la inserción. Como consecuencia de esta inserción, la serina del sitio activo se saca ligeramente de su posición en el sitio activo de la proteasa evitando así que la proteasa se pueda liberar del residuo P1. En el último caso, se dejan los complejos enlazados de manera covalente entre una serpina cambiada conformacionalmente y su proteasa objetivo.

[0050] La interacción de una serpina con una proteasa objetivo es estequiométrica. La reacción se puede describir como:



P = proteasa; S = serpina; S* = serpina con conformación estable, alterada

[0051] Tras el reconocimiento de la secuencia del RSL (RCL en la figura 3) como un sustrato por la proteasa, se forma un complejo reversible (conocido también como el complejo de Michaelis) en el que la conformación de la serpina sigue siendo nativa (S). En la siguiente etapa, la proteasa comienza a escindir el enlace de peptidil entre los residuos de aminoácidos en la posición P1 y P1' (en el caso de unas proteasas no objetivo otros enlaces de peptidil en el RSL se pueden escindir también), y la porción N-terminal del RSL se inserta en la lámina β central de la serpina cuando esta produce su conformación de energía mínima. Cuando la inserción se completa antes de que la proteasa haya sido liberada de P1, el sitio activo de la proteasa se distorsiona inmediatamente interrumpiendo la reacción proteolítica de la proteasa (conformación c en la figura 3).

[0052] Esto resulta en un complejo estable donde el sitio activo de la proteasa queda atrapado de manera covalente por el RSL de la serpina, y en el cual la serpina ha adaptado la conformación estable (S*). Cuando la inserción no está todavía completada cuando la proteasa ha completado su reacción hidrolítica, la proteasa se libera como una enzima activa y una serpina inactivada donde el RSL escindido se inserta en la lámina β central (conformación d en la figura 3). Aunque los contactos RSL-sitio activo obligados contribuyen significativamente a la formación de complejos de Michaelis, otros sitios de la molécula también están implicados.

[0053] En el caso de la AT, se pueden formar complejos covalentes entre la serpina y las proteasas trombina, FXa y FIXa, y hasta cierto punto también FXIIa. La eficiencia de la inhibición de estas proteasas se puede describir en constantes cinéticas, particularmente constantes de índice de segundo orden. Estas constantes se dan en la tabla 1.

Tabla 1: Constantes de inhibición de la AT con diferentes proteasas objetivo y la influencia de los glicosaminoglicanos en estas (por: Rau *et al.*, J.Tromb.Haemost 2007;5 (Supl. 1):102-115.

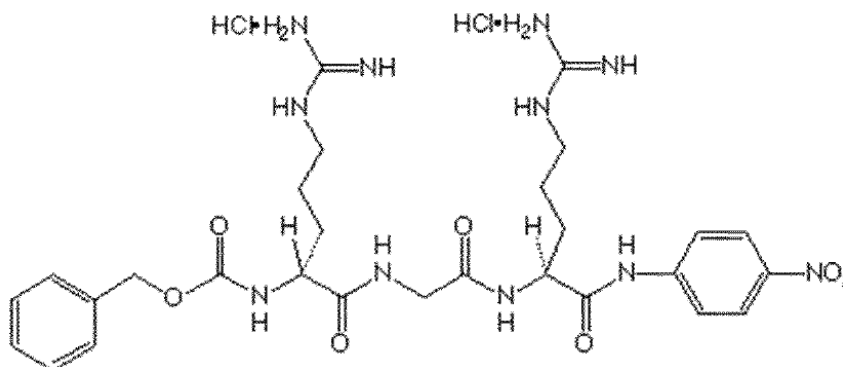
Proteasa objetivo	Cofactor	Índice de segundo orden k_2 ($M^{-1}s^{-1}$)
Trombina	--	$7,5 \times 10^3$, 1×10^4
	UFH	2×10^7 , $4,7 \times 10^7$
	LMWH	$5,3 \times 10^6$
	Pentasacárido	2×10^4
Factor Xa	--	$2,5 \times 10^3$, 6×10^3
	UFH	5×10^6 , $6,6 \times 10^6$
	LMWH	$1,3 \times 10^6$
	Pentasacárido	$7,5 \times 10^5$
Factor IXa	--	$1,3 \times 10^2$, 5×10^2
	UFH	8×10^6 , $1,75 \times 10^6$
	LMWH	$3,7 \times 10^5$

UFH: heparina no fraccionada; LMWH: heparina de bajo peso molecular

[0054] Como queda claro a partir de la tabla 1, la actividad inhibidora de AT se mejora en presencia de glicosaminoglicanos tales como heparina, o pentasacáridos sintéticos. La inhibición mejorada de proteasas mediante AT en presencia de heparina resulta de dos mecanismos diferentes. Expele el N-terminal del RSL de la lámina β central A. Esta "liberación" del RSL explica la inhibición mejorada de FIXa y FXa, pero no la de la trombina. La inhibición mejorada de la trombina resulta de un mecanismo denominado modelo que implica que la heparina sirve como un modelo para enlazar tanto la trombina como la AT en una posición óptima para permitir la máxima inhibición de trombina mediante AT.

[0055] En principio cualquier inhibidor de AT farmacéuticamente aceptable se puede usar en la presente invención. Un inhibidor adecuado de la AT para el uso en la presente invención es preferiblemente un inhibidor, que, cuando se añade al plasma (plasma preferiblemente humano, más preferiblemente plasma agrupado de voluntarios sanos), causa una reducción de la actividad de la AT preferiblemente medida con Factor Xa, trombina, o cualquier otra proteasa que interactúa con la AT, tal como, por ejemplo, el factor IXa. Preferiblemente, el inhibidor reduce la actividad de la AT a al menos el 90, 80, 50, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,2, 0,1 % del nivel de la AT normal. La AT normal se entiende en este documento como el nivel en el plasma agrupado de voluntarios sanos. Alternativamente, el inhibidor reduce la actividad de la AT a al menos el 90, 80, 50, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,2, 0,1 % del nivel de la AT antes de la adición del inhibidor.

[0056] La inhibición de la AT se mide preferiblemente por comparación del efecto de la AT en el plasma con y sin el inhibidor cuando se añade a una enzima proteolítica que se inhibe normalmente mediante AT, tal como, por ejemplo, trombina, factor Xa o factor IXa, de origen humano o bovino. Así, preferiblemente, el inhibidor, cuando se añade al plasma (preferiblemente plasma humano, más preferiblemente plasma agrupado de voluntarios sanos), previene una reducción en la actividad de al menos uno de trombina, factor Xa y factor IIa de más del 10, 20, 50, 80, 90, 95, 99, 99,5, 99,8, 99,9 % mediante el plasma cuando se añade a al menos uno de trombina (aislada), factor Xa (aislado), y factor IIa (aislado), en comparación con la reducción en la actividad de al menos uno de trombina y factor Xa mediante el mismo plasma sin el inhibidor. Preferiblemente, la actividad de trombina y/o factor Xa se determina en un ensayo utilizando un sustrato cromogénico como se describe, por ejemplo, en http://www.practical-haemostasis.com/Thrombophilia%20Tests/at_assays.html o en Beeck *et al.*, Blood Coagulation Fibrinolysis 2000;11:127-35. Un sustrato cromogénico adecuado para el factor Xa es, por ejemplo, S-2765, Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl con la fórmula:



[0057] Los ensayos para actividad de AT se describen adicionalmente en "*Determinación de los niveles de AT funcional para evaluar la inhibición de la AT*".

[0058] Un inhibidor preferido de AT para el uso en la presente invención es un inhibidor seleccionado del grupo que consiste en: (a) un compuesto que se puede insertar en la lámina β central de la antitrombina III; (b) un aptámero que se enlaza específicamente a la antitrombina III y previene o ralentiza la inserción del bucle del RSL en la lámina β central de la antitrombina III; y, (c) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se enlaza específicamente a la AT. Tales inhibidores se describen en este documento a continuación.

Inhibidores de péptido de AT

[0059] En una forma de realización, una clase de inhibidores de AT que se puede usar en la presente invención, por ejemplo, para mejorar la formación de trombina y la actividad de trombina en pacientes que padecen sangrado se basa en la observación de que péptidos que imitan la secuencia de los residuos P1-P14 del RSL se pueden insertar en la lámina β central de la AT. La inserción del péptido en la lámina β central previene la inserción del RSL de la propia molécula. Como la inserción del RSL en la lámina β central es esencial para la función inhibitoria de la serpina (véase las figuras 2 y 3), la AT incubada con el péptido del RSL se convierte en un sustrato para sus proteasas objetivo tales como la trombina. En otras palabras, tras la incubación de la AT el péptido que imita la secuencia de aminoácidos del RSL de la AT se enlazarán e insertarán en la lámina β central de la AT y transformará la AT en un sustrato para sus proteasas objetivo (véase la figura 4). Los efectos de los péptidos que imitan la secuencia de P1-P14 del RSL de la AT se han descrito por I Bjork *et al.*, J.Biol.Chem.1992;267:1976-1982. Así, un inhibidor preferido de la AT según esta forma de realización es un péptido o peptidomimético que imita la secuencia de aminoácidos de los residuos P1-P14 del RSL.

[0060] Una secuencia preferida de este péptido es:

NH₂-Ser-Glu-Ala-Ala-Ala-Ser-Thr-Ala-Val-Val-Ile-Ala-Gly-Arg-COOH

[0061] En particular, nadie hasta ahora ha reivindicado o sugerido el uso terapéutico de péptidos que imitan la secuencia del RSL de la AT como una terapia para pacientes con sangrado excesivo. Tales péptidos pueden ser un péptido con la secuencia indicada, o un péptido con la misma secuencia, pero enlazado a otra secuencia de proteínas, o a una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) u otras moléculas para mejorar las propiedades farmacocinéticas. También variantes de la secuencia indicada capaces de enlazarse a la AT se consideran englobadas dentro del alcance de esta invención.

[0062] Además, también compuestos químicos u otros compuestos tales como aptámeros capaces de enlazarse a la AT e inactivar la AT previniendo o ralentizando la inserción del bucle del RSL y disminuyendo así la actividad inhibitoria hacia la trombina y otras proteasas de coagulación se consideran englobados dentro del alcance de esta patente.

Inhibidores de anticuerpo de AT

[0063] En otra forma de realización, el inhibidor de AT para el uso en la presente invención comprende anticuerpos policlonales y monoclonales (humano, murino, murino humanizado, otras especies animales tales como camélido) contra la AT, o fragmentos de los mismos. Los ejemplos específicos en este documento demuestran que los anticuerpos policlonales contra la AT humana tras la adición al plasma bloquean completamente la actividad de la AT en el plasma.

[0064] Estudios en autoanticuerpos monoclonales que neutralizan e inactivan el inhibidor C1, que también es una serpina y comparte homología estructural con la AT, y que causa deficiencia de inhibidor C1 adquirida, han revelado que estos anticuerpos reconocen epítomos situados cerca de la secuencia del RSL alrededor de P10' (S

He *et al.*, J.Immunol. 1996;154: 2009-2013). Estos anticuerpos hacen del inhibidor C1 un sustrato para sus proteasas objetivo (S He *et al.*, Molecular Medicine 4: 119-128, 1998), probablemente obstaculizando la inserción del RSL del inhibidor C1 en la lámina beta central (véase también el panel derecho de la figura 4). Los anticuerpos o fragmentos de los mismos contra las secuencias homólogas de la AT se utilizan para inactivar la AT tras la interacción con proteasas objetivo. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos contra la secuencia del RSL de la AT alrededor de P10 también dificultan la inserción del RSL en la lámina β central y hacen de la serpina un sustrato cuando interactúan con una proteasa objetivo. De hecho, un anticuerpo que reconoce un epítipo que implica los aminoácidos en la posición P3-P8 del RSL de la AT, se ha mostrado que transforma la AT en un sustrato cuando se incubaba con trombina (S Asakura *et al.*, J Biol Chem 1990;265:5135-6). Además, otros anticuerpos monoclonales que inhiben la AT sin especificación adicional de los mecanismos subyacentes de la inhibición se han descrito en la bibliografía (P Herion *et al.*, Blood 1985;65:1201-7; S Knoller *et al.*, Eur J Bioch 1989;180:319-27). Sin embargo, el potencial terapéutico de tales anticuerpos para el tratamiento o la prevención de un sangrado nunca se ha considerado. La presente invención divulga que tales anticuerpos se pueden utilizar para detener y prevenir el sangrado en hemofílicos o pacientes con episodios de sangrado debido a otros motivos. Todos los anticuerpos, completamente humanos, humanizados o de especies animales, desimmunizados o no, o fragmentos de los mismos, que inhiben la AT mediante interferencia con la inserción del RSL de la AT de la lámina beta central, se engloban en el alcance de esta invención.

[0065] Así, un inhibidor preferido según la invención es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se enlaza específicamente a un epítipo en la secuencia del RSL de la AT, y, preferiblemente, dificulta la inserción del RSL en la lámina β central de la AT. Más preferiblemente, por lo tanto, el epítipo en la secuencia del RSL comprende uno o más de los residuos P1-P14 del RSL, preferiblemente el epítipo comprende residuos del RSL alrededor de P10, los residuos P5 - P10 del RSL o los residuos P3 - P8 del RSL.

[0066] Los anticuerpos contra las secuencias de los péptidos del RSL anteriormente mencionados se hacen por inmunización con péptidos que cubren estas secuencias estén o no enlazados a una proteína portadora. Los péptidos conjugados de hemocianina de lapa californiana (KLH) se usan rutinariamente como antígenos para generar anticuerpos contra secuencias peptídicas. Otras proteínas portadoras, sin embargo, tales como la albúmina de suero bovino (BSA), también se pueden usar. Además, mutantes de la secuencia peptídica indicada también se pueden usar para la inmunización, siempre y cuando los anticuerpos resultantes se enlacen con la AT.

[0067] Una estrategia preferida para hacer anticuerpos inhibidores de AT es inmunizar un huésped adecuado con KLH al que se han acoplado péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos del RSL de la AT. Los péptidos se pueden comprar de proveedores comerciales o no comerciales, o hacerse según procedimientos bien conocidos en la técnica. Máquinas sintetizadoras de péptidos disponibles comercialmente también se pueden usar para este propósito. Los péptidos se acoplan a KLH vía métodos bien establecidos, por ejemplo, por introducción de una cisteína C-terminal en la secuencia. Otro método usa glutaraldehído como un reactivo de conjugación. Diferentes empresas comerciales ofrecen producción de conjugados de KLH-péptido como un servicio para los clientes. Tales conjugados de KLH-péptidos se pueden usar después para la inmunización de un huésped adecuado.

[0068] En una forma de realización preferida se usa KLH como una proteína portadora, péptidos que cubren la secuencia del RSL (véase arriba) o péptidos que cubren las secuencias P5'-P10 del RSL de la AT, se conjugan a KLH vía la introducción de un residuo de cisteína adicional en el C-terminal.

[0069] Una variedad de protocolos de inmunización se pueden emplear, y pueden incluir inyección intravenosa, subcutánea, o intraperitoneal, seguido de uno o más estímulos. Un adyuvante adecuado es el adyuvante de Freund. Un procedimiento de inmunización adecuado es la hiperinmunización con KLH-péptido en una concentración que, dependiendo del animal huésped, puede estar en el rango de 10 a 500 microgramos, mezclada con adyuvante completo de Freund. La mezcla se inyecta subcutáneamente. Las inyecciones se repiten de 2 a 5 veces usando la misma preparación de KLH-péptido mezclada con adyuvante incompleto de Freund. Las muestras de sangre se toman a partir del animal 1 semana después de la 3^a, 4^a, 5^a inyección, y se filtran para la presencia de anticuerpos contra la AT.

[0070] En una forma de realización preferida de esta invención, los anticuerpos murinos monoclonales contra la AT se hacen usando tecnología de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir de varias otras maneras con técnicas bien entendidas por aquellos expertos en la materia. Detalles de estas técnicas se describen en (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow *et al.*, Cold Spring Harbor Publications, p. 726,1988), o se describen por (Campbell, A.M. "Monoclonal Antibody Technology Techniques in Biochemistry and Molecular Biology," Elsevier Science Publishers, Ámsterdam, Países Bajos, 1984) o por (St. Groth *et al.*, J. Immunol. Methods 35:1-21, 1980).

[0071] Los hibridomas que segregan anticuerpos contra la AT humana se pueden identificar ensayando sobrenadantes de cultivo, etcétera, para la presencia de anticuerpo. El procedimiento de filtrado preferido

comprende dos pasos secuenciales, el primero es la identificación de los hibridomas que segregan mAb contra la AT, el segundo es la determinación de la capacidad del mAb para inhibir la actividad funcional de la AT.

[0072] Un ELISA se utiliza para filtrar los sobrenadantes de hibridoma para la presencia de anticuerpos monoclonales anti-AT. Este ELISA se puede realizar de la siguiente manera. Se usa AT de plasma humano purificado (o AT humana recombinante) para el revestimiento (2 µg/ml en suero salino tamponado con fosfato, pH 7,4 [PBS]; 100 ul/pocillo). Los sitios de unión no específicos residuales se bloquean entonces mediante incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con PBS/0,1 % (p/v) de Tween 20 (PBS-T) con 0,2 % (p/v) de gelatina (PBS-TG). Luego, después de un procedimiento de lavado (5 veces con PBS-T), las placas se incuban durante 60 minutos a 37 °C con 20 µl de sobrenadante de hibridoma junto con 80 µl de PBS-TG. Finalmente, se detectan anticuerpos murinos enlazados mediante incubación con anticuerpos de inmunoglobulina de antirratón de cabra policlonal conjugados con peroxidasa durante 120 minutos a 37 °C. Finalmente, las placas se lavan con agua destilada (5 veces), y se desarrollan con 3,5,3',5'-tetrametil bencidina.

[0073] Alternativamente, los anticuerpos anti-AT se miden con un procedimiento de radioinmunoensayo, por ejemplo, usando un procedimiento similar como se describe para la detección de anticuerpos anti-C3 por (Hack *et al.*, J Immunol. 1988;141:1602-9).

[0074] Para evaluar el efecto del anticuerpo contra la AT en la actividad funcional de la AT, se subclonan hibridomas positivos vía dilución limitante y se cultivan. A continuación, los anticuerpos se purifican del sobrenadante del cultivo de hibridoma por cromatografía de afinidad de proteína G. El anticuerpo purificado se incuba entonces con AT purificada o con plasma humano, después de lo cual la actividad funcional se mide en un ensayo cromogénico como se describe en este documento a continuación.

[0075] Cualesquiera anticuerpos o fragmentos de los mismos que inhiben la AT vía un mecanismo diferente de la interferencia con la inserción del RSL también se considera que se engloban dentro del alcance de esta invención. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos, humanizados, murinos, desinmunizados monoclonales, anticuerpos de otras especies animales tales como camellos, o sintéticos, o fragmentos de los mismos. Las características clave de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se engloban en el alcance de la presente invención es que se enlazan a la AT e inhiben la actividad funcional de la AT. Estos anticuerpos bloquean uno o más sitios importantes funcionalmente en la AT dando como resultado una actividad funcional disminuida de la AT.

[0076] Los anticuerpos que inhiben la AT en general se pueden obtener por inmunización de animales con AT funcional. Los anticuerpos (ya sea anticuerpos policlinales por colección de plasma y purificación de anticuerpos de la AT, o anticuerpos monoclonales hechos vía la tecnología de hibridoma con AT nativa como antígeno) se filtran entonces con ensayos que usan AT como antígeno. Todos los anticuerpos positivos se evalúan entonces para actividades inhibitorias hacia la AT mediante la incubación de la AT purificada con los anticuerpos, después de lo cual la actividad funcional de la AT se evalúa utilizando un ensayo cromogénico como se describe en este documento a continuación. Alternativamente, los anticuerpos se pueden filtrar añadiéndolos a plasma y analizando el plasma en ensayos de coagulación tales como el tiempo de protrombina (PT) y el tiempo de protromboplastina activada (APTT) u otros. Además, el anticuerpo se puede añadir a plasma humano normal, después de lo cual la actividad funcional de la AT se mide utilizando un ensayo cromogénico como se describe a continuación. Los anticuerpos inhibidores reducirán la actividad funcional de la AT en estos ensayos.

[0077] Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos, que se enlazan a la AT y causan una reducción de la AT *in vivo* mediante la mejora de la liquidación de la AT, o reducción de actividad de la AT *in vivo* mediante otros mecanismos, se consideran englobados en el alcance de la presente invención.

Otros inhibidores de AT

[0078] Los péptidos, anticuerpos y otras moléculas que se enlazan a la AT e inhiben la AT vía mecanismos diferentes de la interferencia con la inserción del RSL en la lámina beta central también se engloban dentro del alcance de esta invención. Por ejemplo, estos péptidos o compuestos tales como aptámeros se pueden enlazar a otros sitios funcionales en la AT tales como sitios implicados en la interacción con las proteasas objetivo. Cualquier molécula capaz de inhibir la actividad funcional de la AT, preferiblemente *in vivo*, se considera englobada dentro del alcance de la invención. Asimismo, cualquier molécula capaz de reducir la actividad funcional de la AT, preferiblemente *in vivo*, se considera englobada dentro del alcance de la invención.

Determinación de los niveles de AT funcional para evaluar la inhibición de la AT

[0079] El efecto de los inhibidores de la AT en el plasma se puede evaluar con un ensayo que mide la actividad funcional de la AT en el plasma o en otros fluidos (biológicos). La actividad funcional de la AT se puede evaluar basándose en su actividad inhibidora hacia la trombina. Tales ensayos están disponibles comercialmente (por ejemplo, Actichrome ATIII, American Diagnostica, Greenwich, CT, EE. UU.; STA Stachrome, Diagnostica Stago Inc, Parsippany, NJ, EE. UU.). La base de estos ensayos es que la trombina puede convertir sustratos

cromogénicos adecuados (por ejemplo, S-2238, Haemochrom Diagnostica, Molndal, Suecia). Los sustratos cromogénicos son péptidos que reaccionan con enzimas proteolíticas bajo la formación de color. Se hacen sintéticamente por diferentes empresas y se diseñan para poseer una selectividad similar a la del sustrato natural para la enzima. Fijado a la parte de péptido del sustrato cromogénico está un grupo químico, p-nitroanilida, que tras la liberación después de la escisión enzimática da lugar a un color amarillo. El cambio de color se puede seguir espectrofotométricamente y es proporcional a la actividad proteolítica. En el caso de mediciones de la AT una cantidad determinada de trombina se incuba con plasma en la etapa 1, etapa durante la cual la AT funcional se enlaza e inactiva parte de la trombina. La actividad de trombina residual se mide entonces con un sustrato cromogénico en la etapa 2 del ensayo. Esta actividad de trombina residual es inversamente proporcional a la concentración de AT. Para asegurar la cuantificación óptima, la incubación de trombina con plasma ocurre en presencia de heparina que optimiza la actividad de la AT. Además, la trombina bovina se usa frecuentemente para aumentar adicionalmente la especificidad del ensayo, ya que la trombina bovina, a diferencia de la trombina humana, interactúa difícilmente con otro inhibidor de plasma, cofactor de heparina II. También el FXa humano o bovino en combinación con un sustrato cromogénico se puede utilizar para medir niveles de actividad de la AT.

[0080] Usando este ensayo cromogénico, el nivel de inhibición de la AT mediante inhibidores de AT se puede medir fácilmente tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro* esto se consigue incubando un volumen determinado de plasma, por ejemplo, X ml, con una cantidad determinada de inhibidor de AT disuelto en, por ejemplo, 0,1X ml de solución salina o tampón. La mezcla se incuba entonces a 37 °C, después de lo cual la actividad de la AT en la mezcla se mide con un ensayo cromogénico para AT como se ha descrito anteriormente. El valor obtenido se compara entonces con el valor obtenido con una muestra que contiene trombina y solución salina, en lugar de plasma, que es igual al 100 % de inhibición de la AT funcional, y al obtenido con plasma al que no se ha adicionado ningún inhibidor de AT, que es igual al 0 % de inhibición. La cantidad de inhibición de la AT en la muestra de plasma incubada con inhibidor de AT se compara entonces con los controles de inhibición del 0 % y el 100 % y se expresa como % de inhibición de la AT. La muestra de plasma incubada con inhibidor de AT puede ser un plasma normal o plasma de un paciente con sangrado o un paciente con riesgo de sangrado, por ejemplo, un hemofílico. La inhibición *in vivo* de la AT mediante inhibidores de AT administrados a un paciente se puede evaluar mediante la medición de los niveles de AT en circulación tras la administración de inhibidores de AT utilizando los ensayos cromogénicos descritos en este párrafo.

Aplicación clínica de la invención

[0081] Los inhibidores de AT se pueden aplicar para el tratamiento profiláctico o bajo demanda de trastornos de sangrado. Así, en una forma de realización, la invención se refiere a un inhibidor de AT para el uso en el tratamiento y la prevención de un sangrado en un sujeto que padece un trastorno de sangrado (hipocoagulabilidad). El trastorno de sangrado puede ser un trastorno de sangrado adquirido o genético. En una forma de realización preferida, el trastorno de sangrado es hemofilia, por ejemplo, hemofilia A o B. Más preferiblemente, el inhibidor de AT se usa para tratar un sujeto hemofílico con anticuerpos neutralizadores del factor VIII o factor IX. En tales casos, el inhibidor se usa preferiblemente como terapia profiláctica de baipás del factor VIII o factor IX.

[0082] Una aplicación de la presente invención es el tratamiento agudo y profiláctico de hemofílicos con inhibidores (anticuerpos neutralizadores del FVIII o IX). La gravedad de las manifestaciones de sangrado en la hemofilia se correlaciona generalmente con el nivel de factor de coagulación. Los hemofílicos severos tienen cantidades insignificantes de FVIII (< 1 % de lo normal) y pueden sangrar de forma espontánea en muchos sitios. Los sitios más frecuentes, sin embargo, son las articulaciones (70 %-80 %), particularmente las rodillas y los codos, y tejido muscular/blando (10 %-20 %). Otros sangrados principales (5 %-10 %), y a veces sangrado del sistema nervioso central (< 5 %), también ocurren. Además, los hemofílicos pueden sangrar excesivamente tras la cirugía u otro traumatismo. La sustitución profiláctica del factor de coagulación en la hemofilia, que pretende mantener los niveles circulantes del factor deficitario por encima del 1 % en todo momento para prevenir sangrados espontáneos en articulaciones y tejidos blandos, a diferencia de la terapia bajo demanda, previene en gran medida la artropatía hemofílica (MJ Manco-Johnson *et al.*, N Engl J Med 2007; 357:535-44). En particular, los pacientes con FVIII muy bajo o sin FVIII están en riesgo de desarrollar anticuerpos neutralizadores cuando se tratan con FVIII exógeno, ya que su sistema inmunológico considera el FVIII administrado como un antígeno extraño y no es tolerante al mismo. De hecho, el 20-30 % de los hemofílicos severos desarrollan tales anticuerpos neutralizadores (J Goudemond *et al.*, Blood 2006;107:46-51; SC Gouw *et al.*, Blood. 2007;109:4693-4697), que inhiben la eficacia del FVIII administrado y, por lo tanto, son frecuentemente referidos como inhibidores de FVIII. Actualmente, la única terapia profiláctica disponible para hemofílicos es la terapia de sustitución con el factor deficitario. Sin embargo, en el caso de un paciente con inhibidores contra el FVIII, la terapia profiláctica es prácticamente imposible ya que el FVIII administrado es neutralizado por los inhibidores o se liquida rápidamente de la circulación mediante la unión de anticuerpos al FVIII. Según la presente invención, el defecto de formación de fibrina durante la coagulación en estos pacientes se puede restaurar mediante la administración de una cantidad de inhibidor de AT que reduce la actividad funcional de la AT circulante, lo que aumenta la formación de fibrina debido a la inhibición disminuida del factor Xa y a la actividad de trombina prolongada. El grado requerido de inhibición de la AT se puede controlar por medición del nivel *in vivo* de la AT funcional tras la administración del inhibidor de AT a un paciente hemofílico, mientras que el grado de inhibición

requerido para hemostasia eficaz se puede estimar basándose en experimentos *in vitro* en los que la generación de trombina se induce mediante una concentración baja de TF en el plasma del paciente hemofílico en presencia de varias cantidades de inhibidor de AT.

[0083] En otra forma de realización, la invención se refiere a un inhibidor de AT para el uso en la prevención o el tratamiento de una condición clínica caracterizada por sangrado excesivo. Una condición clínica caracterizada por sangrado excesivo puede ser, por ejemplo, una o más de cirugía, traumatismo y sangrado interno. Así, la invención proporciona adicionalmente un método para reducir o prevenir la pérdida de sangre en un paciente con traumatismo o una víctima de guerra, que comprende administrar un inhibidor de AT al paciente. La invención también proporciona un método para reducir o prevenir la pérdida de sangre de un paciente que se somete a cirugía, por ejemplo, un baipás coronario u otra cirugía vascular, que comprende administrar un inhibidor de AT al paciente. La invención proporciona adicionalmente un método para reducir o prevenir el daño cerebral en un paciente que padece un sangrado intracerebral, que comprende administrar un inhibidor de AT al paciente. La invención también proporciona un método para reducir o prevenir la pérdida de sangre en un paciente con un sangrado interno, por ejemplo, de varices esofágicas o debido al uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, que comprende administrar un inhibidor de AT al paciente. La invención también proporciona un método para reducir o prevenir la pérdida de sangre en un paciente con sangrado debido al uso de anticoagulantes. La invención se puede aplicar en cirugía, traumatismo u otras condiciones donde ocurre sangrado excesivo tales como el uso de anticoagulantes, y también en el caso de sangrado interno tal como derrame cerebral hemorrágico o sangrado gastrointestinal tal como sangrado esofágico debido a varices. El método descrito por la presente invención también se puede usar para prevenir el sangrado en pacientes con riesgo de sangrado, por ejemplo, en los pacientes con hemofilia para prevenir el sangrado en articulaciones, tejidos musculares y/o blandos en un paciente con hemofilia.

[0084] El inhibidor de antitrombina III, cuando se usa conforme a la invención en el tratamiento y la prevención de un sangrado en un sujeto que padece un trastorno de sangrado adquirido o genético (hipocoagulabilidad) o en un sujeto que tiene una condición clínica caracterizada por sangrado excesivo, se usa preferiblemente en una dosificación que reduce la actividad de la AT a al menos el 90, 80, 50, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,2, 0,1 % del nivel de la AT normal, donde el nivel de la AT normal es como se ha definido en este documento anteriormente.

Evaluación de los niveles de AT funcional para guiar la dosis de inhibidor de AT para el uso in vivo

[0085] El efecto de los inhibidores de AT en el plasma se puede evaluar utilizando un ensayo que mide la actividad funcional de la AT en el plasma, como se ha descrito en este documento anteriormente. El nivel de inhibición de la AT que se debe conseguir *in vivo* se puede estimar *in vitro* con muestras de plasma de pacientes con trastornos de sangrado. En el caso de un plasma hemofílico, el plasma suplementado con varias concentraciones de inhibidores de AT puede ser un plasma empobrecido inmune al FVIII (Dade Behring, Marburg, Alemania) o plasma de un paciente hemofílico. La formación de trombina en estas muestras de plasma se activa entonces mediante la adición de TF (por ejemplo, Innovin, Dade Behring, B4212-50). Las concentraciones de TF se seleccionan primero para dar una generación de trombina dependiente del FVIII o formación de fibrina en este plasma empobrecido de FVIII o plasma hemofílico, que se consigue incubando las muestras de plasma con de 1 a 1000 a de 1 a 80 000 diluciones de Innovin, en presencia de diferentes concentraciones de FVIII que varían del 0,1 % (0,001 U/ml) al 25 % (0,25 U/ml) del nivel normal imitando condiciones hemofílicas severas a leves, respectivamente. La generación de fibrina se puede medir en el tiempo usando el lector de placas de microtitulación SpectraMax y el software Softmax pro. Alternativamente, la generación de trombina se evalúa con sustratos cromogénicos o fluorogénicos, por ejemplo, el Technothrombin TGA proporcionado por DiaPharma. Se selecciona entonces una concentración de TF que induce la generación de trombina o fibrina dependiente de la dosis de FVIII en este sistema.

[0086] Para evaluar el efecto del inhibidor de AT en la formación de fibrina o la generación de trombina, muestras de plasma hemofílico o empobrecido de FVIII se incuban con varias cantidades de inhibidor de AT para reducir los niveles de AT funcional en un 20, 40, 60, 80 o 100 % evaluado según los procedimientos descritos anteriormente. Como controles, las muestras de plasma se suplementan con varias concentraciones de FVIII (por ejemplo, FVIII recombinante de Baxter (Recombinate®) o Bayer (Kogenate®). Después de la mezcla, las muestras se evalúan para generación de fibrina o generación de trombina tras la adición de TF en una concentración seleccionada como se explica en el párrafo precedente para producir generación de trombina y formación de fibrina dependientes de FVIII. Esta generación de trombina y/o formación de fibrina se mide entonces como se ha descrito anteriormente. La generación de fibrina y/o la generación de trombina mejorada (potenciada) observada en la muestra de plasma con niveles decrecientes de AT funcional (aumentando la inhibición de la AT), se puede comparar con los resultados obtenidos con FVIII. El nivel deseado de inhibición de la AT para compensar la falta de FVIII se puede seleccionar, por lo tanto, para imitar condiciones de hemofilia moderada, leve o sin hemofilia. El nivel correspondiente de inhibidor de AT que se debe conseguir en el plasma se puede calcular entonces.

[0087] La coadministración de inhibidor de AT con FVIII también se puede considerar. Tal coadministración puede reducir la necesidad de FVIII y, por lo tanto, reducir el riesgo de inmunogenicidad y la posibilidad del

desarrollo del inhibidor. En pacientes, la administración de factor VIII se puede disminuir a niveles muy inferiores, por ejemplo, a niveles lo suficientemente bajos como para no provocar una respuesta inmune en el paciente al FVIII. Por ejemplo, resulta posible administrar a pacientes con hemofilia una cantidad de FVIII para alcanzar una concentración de 0,001-0,05, por ejemplo, 0,01 U/ml de plasma y, al mismo tiempo, tratar también al paciente con inhibidor de AT según la presente invención.

[0088] Además de la hemofilia, sangrado de rutina que no responde a la terapia convencional puede ocurrir en un gran número de otros trastornos médicos. Actualmente, el rFVIIa, usado sin autorización, es el único tratamiento de estas condiciones. Estas condiciones incluyen hemorragia intracraneal, enfermedad hepática, sangrado después de cirugía tal como cirugía de baipás cardiopulmonar, cirugía espinal, cirugía de próstata y trasplante de hígado ortotópico, sangrado asociado a traumatismo, sangrado asociado al uso de anticoagulantes tales como la warfarina, y otros.

[0089] La hemorragia intracerebral es una de las formas de derrame cerebral que causan más discapacidad. Más de un tercio de los pacientes con este trastorno mueren en el plazo de un mes después de la aparición de los síntomas, la mayoría se debilitan seriamente, y solo el 20 por ciento recuperan la independencia funcional. Actualmente no hay ningún tratamiento eficaz para la hemorragia intracerebral, aunque la estimulación de la coagulación de la sangre mediante la administración de FVIIa recombinante ha mostrado resultados prometedores (SA Mayer *et al.*, N.Engl.J.Med. 2005;352:777-85). El volumen del hematoma es un determinante crítico de la mortalidad y del resultado funcional después de la hemorragia intracerebral, y el crecimiento del hematoma temprano es una causa importante de deterioro neurológico. Se ha mostrado que el rFVIIa reduce este aumento de volumen. En un estudio de fase 3 un efecto favorable del rFVIIa en el tamaño de infarto se descubrió nuevamente, aunque las consecuencias clínicas del rFVIIa redujeron el crecimiento del hematoma, pero no mejoraron la supervivencia o el resultado funcional después de la hemorragia intracerebral (SA Mayer *et al.*, N.Engl.J.Med.2008;358:2127-37).

[0090] Los pacientes con enfermedad hepática debido a cirrosis alcohólica o posthepatitis u otras enfermedades están en riesgo de sangrado severo debido a la síntesis disminuida de factores de coagulación por el hígado, lo que da como resultado bajos niveles circulantes de factores de coagulación, y la presencia de varices en el esófago y el estómago. Estos pacientes se tratan actualmente con concentrados de factor de coagulación o infusión de rFVIIa. El sangrado severo también puede ocurrir durante el trasplante de hígado y durante la hepatectomía parcial en pacientes no cirróticos debido a niveles circulantes disminuidos de varios factores de coagulación. La hemorragia excesiva también puede en pacientes que se someten a cirugía cardíaca. Este riesgo de sangrado aumentado se debe a bajos niveles en el plasma de factores de coagulación debido a la hemodilución como consecuencia del uso de fluido de cebado para el oxigenador extracorpóreo, el uso de anticoagulantes y problemas mecánicos de injertos vasculares.

[0091] Los anticoagulantes se usan para una serie de enfermedades tromboembólicas que incluyen fibrilación atrial, trombosis venosa profunda, infarto de miocardio y otras. Los pacientes tratados con anticoagulante oral tienen niveles reducidos de proteínas de coagulación dependientes de la vitamina K funcional y, por lo tanto, están en riesgo de complicaciones hemorrágicas. La incidencia de sangrado es de alrededor del 0,6-0,7 % por mes con una Relación Normalizada Internacional (INR) terapéutica y la incidencia de grandes eventos hemorrágicos es sustancial. Por lo tanto, la capacidad para invertir el efecto de la antivitamina K es importante. En caso de emergencia, se usan concentrados de complejo de protrombina o plasma, al igual que FVIIa recombinante. Como una alternativa, se puede usar la presente invención. La ventaja de la presente invención es que el efecto procoagulante se puede evaluar mediante la medición de los niveles de AT funcional en un paciente que recibe el inhibidor de AT.

[0092] En las condiciones clínicas descritas en el párrafo precedente, al igual que en otras enfermedades con riesgo aumentado de sangrado o con sangrado en curso, hay una necesidad médica de prevenir o detener el sangrado. Para detener el sangrando, solo están disponibles el FVIIa recombinante o el complejo de protrombina activado derivado de plasma tal como FEIBA (J Astermark *et al.*, Blood 2007;109:546-551; HR Roberts *et al.*, Blood 2004;104:3858-3864). Ninguno de estos se puede utilizar para prevenir el sangrado. Además, no hay buenos ensayos *in vitro* que predigan la eficacia o los efectos secundarios de estos agentes. La presente invención proporciona una alternativa para estos procoagulantes en la que el efecto del tratamiento se puede evaluar, se puede controlar, y se puede usar como una terapia profiláctica pero también como terapia bajo demanda. Esta invención consiste en la administración de inhibidor de AT a un paciente con riesgo de sangrado o que padece sangrado. El control farmacológico de la cantidad de inhibidor de AT que se debe administrar se puede conseguir mediante la medición de los niveles en el plasma de AT funcional.

Evaluación de la concentración eficaz de inhibidor de AT para potenciar la formación de trombina

[0093] El nivel objetivo de inhibición de la AT *in vivo* se puede estimar *in vitro* con muestras de plasma de pacientes con trastornos de sangrado como se ha explicado en este documento anteriormente. Tras la adición de TF para inducir la coagulación, la generación de fibrina se puede medir finalmente usando el lector de placas de microtitulación SpectraMax y el software Softmax pro, mientras que la generación de trombina se puede evaluar

con sustratos cromogénicos o fluorogénicos, por ejemplo, el sistema Technothrombin TGA proporcionado por DiaPharma.

[0094] Los resultados de la generación de trombina y la formación de fibrina en las muestras de plasma de pacientes que contienen cantidades variables de inhibidor de AT se comparan con aquellos obtenidos con muestras de plasma de controles normales. Basándose en la cantidad de inhibidor de AT que es capaz de restaurar la generación de trombina y la formación de fibrina al rango observado con las muestras de plasma de controles normales, al igual que en la biodisponibilidad y las propiedades farmacocinéticas, se calcula entonces la dosis de inhibidor de AT que se debe administrar. La dosis que se debe administrar se confirma mediante la medición de los niveles de actividad de la AT circulante tras la administración de inhibidores de AT a los pacientes utilizando el ensayo descrito en este documento anteriormente.

Composiciones farmacéuticas de los inhibidores de AT

[0095] Para la administración a humanos, la invención puede emplear composiciones farmacéuticas que comprenden el inhibidor de AT y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En el presente contexto, el término "farmacéuticamente aceptable" significa que el portador o excipiente, en las dosificaciones y concentraciones empleadas, no causará ningún efecto no deseado o nocivo en los pacientes a los que se administra. Tales portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables son muy conocidos en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer y L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). El inhibidor de AT de esta invención se formula y se administra preferiblemente como una solución estéril, aunque se engloba dentro del alcance de esta invención utilizar preparaciones liofilizadas. Las soluciones estériles se preparan por filtración estéril o por otros métodos conocidos *per se* en la técnica. Las soluciones se liofilizan o se rellenan entonces en contenedores de dosificación farmacéutica. El pH de la solución está generalmente en el rango de pH 3,0 a 9,5, por ejemplo, pH 5,0 a 7,5. La proteína o péptido está típicamente en una solución con un tampón farmacéuticamente aceptable adecuado, y la solución de proteína también puede contener una sal. En alguna forma de realización, se añade detergente. Para el uso en esta invención, el inhibidor de AT se puede formular en una preparación inyectable. Las formulaciones parenterales son adecuadas para el uso en la invención, preferiblemente para administración intravenosa. Estas formulaciones contienen cantidades terapéuticamente eficaces de inhibidor de AT, son o bien soluciones líquidas estériles, suspensiones líquidas o versiones liofilizadas y contienen opcionalmente estabilizadores o excipientes. Típicamente, las composiciones liofilizadas se reconstituyen con diluyentes adecuados, por ejemplo, agua esterilizada para inyección, solución salina estéril y similares.

Tratamiento de pacientes con un trastorno de sangrado con inhibidores de AT

[0096] El inhibidor de AT se puede administrar mediante inyección por vía intravascular, o mediante otras vías y/o sitios de administración. La dosificación requerida depende entre otros de la condición clínica.

[0097] Anteriormente hemos descrito la metodología para evaluar el efecto de un grado variable de inhibición de la AT en la generación de trombina y de fibrina en el plasma hemofílico en comparación con los efectos de un rango de dosis de FVIII. En el caso del tratamiento profiláctico con inhibidores de AT, se desea un grado similar de inhibición de la AT ya que es equivalente al grado de inhibición que corresponde a la suplementación con aproximadamente 0,3 U de FVIII como se describe en "*Evaluación de los niveles de AT funcional para guiar la dosis de inhibidor de AT para el uso in vivo*" arriba en este documento. Considerando las propiedades farmacocinéticas del inhibidor de AT, se puede estimar la cantidad que se debe administrar para producir un grado similar de inhibición de la AT *in vivo* como en los experimentos *in vitro*. Controlando los niveles de AT funcional en el paciente después de la administración del inhibidor de AT, se comprueba que el nivel deseado de inhibición de la AT se da realmente en el paciente.

[0098] En el caso de un episodio de sangrado agudo, el inhibidor de AT se puede administrar en dosis ligeramente crecientes y bajo la guía de los niveles funcionales de la AT hasta que el sangrado se detiene. El tratamiento de pacientes con episodios de sangrado debido a otra causa que no sea la hemofilia se puede hacer utilizando una estrategia similar. El inhibidor de AT se administra para reducir lentamente los niveles funcionales de la AT hasta que el sangrado haya cesado. El control de los niveles de AT funcional después de la administración del inhibidor se hace con un ensayo como se ha descrito en este documento anteriormente.

Método para identificar un compuesto como un inhibidor de AT

[0099] En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un método para identificar un compuesto como un inhibidor de AT. El método comprende preferiblemente las etapas de: (a) añadir el compuesto a plasma agrupado de voluntarios sanos; (b) mezclar el plasma agrupado con el compuesto obtenido en a) con al menos uno de trombina aislada y factor Xa aislado; (c) determinar la actividad de al menos uno de trombina y factor Xa en la mezcla obtenida en b) y comparar la actividad en la mezcla con el compuesto con la actividad de al menos

uno de trombina y factor Xa mezclado con el mismo plasma sin el compuesto, donde, preferiblemente la actividad de al menos uno de trombina y factor Xa se determina en un ensayo utilizando un sustrato cromogénico; y, (d) identificar un compuesto que previene una reducción en la actividad de al menos uno de trombina y factor Xa en el plasma en comparación con el mismo plasma sin el compuesto, como un inhibidor de AT, donde preferiblemente el compuesto previene una reducción en la actividad de al menos uno de trombina y Factor Xa superior al 50 %. En una forma de realización preferida del método, antes de la etapa (a), el compuesto se ha seleccionado como un compuesto que se enlaza específicamente a la AT. Preferiblemente, en el método, el compuesto es un péptido, aptámero, anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se ha seleccionado para enlazarse específicamente a la AT; más preferiblemente, el péptido, aptámero, anticuerpo o fragmento de anticuerpo se ha seleccionado para enlazarse específicamente a un epítipo en la secuencia del RSL de la AT.

[0100] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los elementos después de la palabra están incluidos, pero los elementos no mencionados específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos estén presentes, a menos que el contexto requiera claramente que allí sea uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" significa normalmente, por lo tanto, "al menos uno/una".

[0101] Los ejemplos siguientes se ofrecen solo para fines ilustrativos, y no se destinan para limitar el alcance de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones anexas.

Descripción de las figuras

[0102]

Figura 1: Esquema simplificado de coagulación. La activación comienza con la exposición de la sangre al factor tisular (TF) que forma un complejo con el FVII(a) del plasma. El complejo TF/FVIIa activa el FX en FXa, que a su vez forma un complejo con el FV. El complejo FXa/FVa convierte la proenzima protrombina en trombina, la enzima central de la coagulación. Esta vía se puede considerar como una vía basal de coagulación. Esta vía basal se amplifica mediante dos vías, una que consiste en FIX y FVIII, y otra que consiste en FXI. La vía FIX/FVIII se activa mediante el complejo TF/FVIIa, que activa el FIX en FIXa. El FIXa en el complejo FIXa/FVIIIa tiene actividad proteolítica y puede activar el FX en FXa. Otro bucle de amplificación consiste en FXI que tras la activación del cual mediante trombina puede también activar el FIX. No representados en la figura hay varios inhibidores de coagulación que incluyen AT y cofactor fosfolípido.

Figura 2: Estructura de serpina A1 (Banco de Datos de Proteína (PDB) código 1QLP PR Elliott *et al.*, Nat.Struct Biol 1996;3:676-681). El bucle de centro reactivo (RCL) está en la parte superior de la molécula. La flecha punteada indica la "ranura" en la lámina β central donde se inserta el bucle de centro reactivo.

Figura 3: Mecanismo estructural de la acción inhibitoria de una serpina con una proteasa. La estructura mostrada es la de SERPINA1 del Banco de Datos de Proteína (PDB) código 1QLP. Vía b $\rightarrow$ c: La interacción de serpina proteasa da como resultado un complejo covalente estable, en el que la serina del sitio activo de la proteasa se conecta con el residuo de PI del bucle del sitio reactivo (= bucle de centro reactivo, RCL) de la serpina. Como resultado, la proteasa cuelga distorsionada e inactiva en la base de la molécula. Vía b $\rightarrow$ d: el complejo de serpina-proteasa se disocia antes de que la inserción del RSL en la lámina β central se complete y de que se induzca el cambio conformacional en el sitio activo de la serina proteasa. Como resultado, la proteasa activa se libera y se deja una serpina inactiva con conformación estable. En esta situación, la serpina se comporta como un sustrato para la proteasa, que se escapa de la trampa conformacional. Referencias: PR Elliott *et al.*, Nat.Struct Biol 1996;3:676-681; A Dementiev *et al.*, J Biol Chem 2003;278:37881-37887; JA Huntington *et al.*, Natura 2000;407:923-926; H Loebermann *et al.*, J.Mol.Biol. 1984;177:531-557.

Figura 4 Dibujo que describe el mecanismo de algunos inhibidores de AT. Se muestra el efecto de un péptido que se inserta en la lámina β central de la AT o un anticuerpo monoclonal (mAb) que previene la inserción del RSL en la lámina β central. La parte izquierda del dibujo muestra la situación normal: tras la escisión del RSL por una proteasa objetivo, el RSL escindido (residuos P1-P14) se inserta en la lámina β central distorsionando así la estructura 3D del sitio activo de la proteasa volviéndola inactiva. En la derecha, un péptido que imita la secuencia de P1-P14 del RSL se inserta en la lámina β central previniendo así la inserción del RSL de la AT. Como un inhibidor de AT alternativo, un mAb que se enlaza a la secuencia P4-P14 del RSL previene la inserción del RSL en la lámina β central haciendo de la AT un sustrato para sus proteasas objetivo.

Figura 5 Los anticuerpos policlonales de cabra purificados de afinidad contra AT (anti-AT) inhiben completamente la actividad de la AT en plasma de humano fresco medido con trombina. Los

anticuerpos anti-AT de cabra purificados de afinidad (20 µg en 25 µl) se añadieron a 25 µl de 1 a 10 de plasma de humano fresco diluido, y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. 50 µl de la mezcla se incubaron entonces con trombina (50 µl) y la actividad de trombina residual se midió añadiendo 50 µl de una solución del sustrato cromogénico Etil-Malonil-S-Pro-Arg-pNA.AcOH (2 mg/ml). Las mezclas se midieron entonces a 405 nm cada minuto. Los valores OD se dan en el eje Y, el tiempo en minutos en el eje X. Varias concentraciones de plasma se evaluaron para generar una curva de dosis-respuesta. Obsérvese que el 100 % de plasma inhibe potentemente la actividad de la trombina adicionada, y que la adición de anticuerpos contra AT (100 % de plasma + anti-AT) inhibe este efecto del plasma completamente.

Figura 6 Los anticuerpos policlonales de cabra purificados de afinidad contra AT (anti-AT) inhiben completamente la actividad de la AT en el plasma de humano fresco medido con FXa bovino. Los anticuerpos anti-AT de cabra purificados de afinidad (6 µg en 7,5 µl) se añadieron a 7,5 µl de 1 a 5 de plasma de humano fresco diluido, y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadieron 15 µl con heparina (2,5 U/ml) y las mezclas se incubaron durante 30 min a 37 °C. Luego se añadieron 75 µl del sustrato cromogénico MAPA-Gly-Arg-pNA (8,4 umol/ml) y la mezcla se incubó durante otros 30 minutos. Finalmente, se añadió FXa bovino (75 µl) y la actividad FXa residual se midió a 405 nm cada minuto. Los valores OD se dan en el eje Y, el tiempo en minutos en el eje X. Varias concentraciones de plasma se evaluaron para generar una curva de dosis-respuesta. Obsérvese que el 100 % de plasma inhibe potentemente la actividad del FXa adicionado, y que la adición de anticuerpos contra AT (100 % de plasma + anti-AT) inhibe dependientemente de la dosis este efecto del plasma.

Figura 7 Los anticuerpos policlonales de cabra purificados de afinidad contra AT potencian la generación de trombina en el plasma de humano fresco. Anticuerpos de anti-antitrombina III de cabra purificada (a-AT) se añadieron a plasma de humano fresco. La mezcla se incubó entonces con factor tisular para inducir la activación del sistema de coagulación. La generación de trombina en la mezcla se midió en tiempo real con un sustrato cromogénico, y se expresó como nM mediante referencia a un estándar. Obsérvese el aumento de más de 2 veces en la cantidad de trombina generada tras la adición de la misma cantidad de TF.

Figura 8 Los anticuerpos policlonales de cabra purificados de afinidad contra AT potencian la generación de trombina en el plasma carente de FVIII. Los anticuerpos de anti-antitrombina III de cabra purificada (anti-AT) se añadieron a la muestra de plasma. La mezcla se incubó entonces con factor tisular para inducir la activación del sistema de coagulación. La trombina en la mezcla se midió con un sustrato cromogénico. Obsérvese el aumento de más de 2 veces en la cantidad de trombina generada en la muestra cuando la AT se inhibió completamente (250 µg/ml).

Ejemplos

Ejemplo 1: Inhibición de la actividad de la AT en plasma con anticuerpos policlonales contra AT

[0103] Como un ejemplo para mostrar que los anticuerpos pueden inhibir realmente la actividad de la AT en el plasma humano, anticuerpos policlonales se purificaron de suero de una cabra inmunizada con AT humana (Bioconnect, Huissen, Países Bajos; N.º de catálogo: AHP1750). AT purificada (Kybernin P, CSL-Behringwerke, Marburg, Alemania; N.º de catálogo:83167111A) se acopló a Sepharose 4B activada por CNBr (GE Healthcare Life Sciences, Diegem, Bélgica) según las instrucciones del fabricante (aproximadamente 25 mg de AT para 1 gramo de Sepharose activada por CNBr). Las microesferas se lavaron y se incubaron posteriormente con 2,5 ml de antisuero de cabra contra AT humana diluido 1 a 2 en suero salino tamponado con fosfato, pH 7,4 (PBS), durante 2 horas a temperatura ambiente. Las microesferas se lavaron nuevamente y se eludieron entonces con 0,1 M de glicina, 0,15 NaCl, pH 2,5. Las microesferas se centrifugaron mediante centrifugación durante 1 minuto a 1300 g, el sobrenadante se quitó, inmediatamente neutralizado con 1M de Tris, pH 8,5, y dializado contra PBS. La preparación resultante se analizó en SDS-PAGE para pureza, y se descubrió que consistía en una banda con Mr de ~160 000 bajo condiciones de no reducción, y de 2 bandas con Mr ~50 000 y ~25 000 bajo condiciones de reducción.

[0104] Dos ensayos para actividad de AT funcional se usaron para evaluar los efectos de los anticuerpos en la AT funcional en el plasma. El primer ensayo (equipo STA ATIII, N.º de catálogo: 12145103140; Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos) es un ensayo cromogénico que usa trombina como la proteasa objetivo. El principio de este ensayo es que una cantidad estándar de trombina se añade al plasma en presencia de heparina, el plasma se comprueba entonces para actividad de trombina residual utilizando el sustrato cromogénico Etil-Malonil-S-Pro-Arg-pNA.AcOH (2 mg/ml). En este ensayo se evalúan 50 µL de muestras de plasma diluidas 1 a 20 (en diluyente proporcionado con el ensayo). Para evaluar sus efectos en la función de la AT en el plasma, 20 µg de los anticuerpos anti-AT purificados en 25 µL se añadieron a 25 µL de plasma normal diluido 1 a 10. La mezcla se evaluó entonces en el ensayo. Los resultados mostraron claramente que el efecto inhibitorio del plasma en la actividad de trombina se neutralizó tras la adición de anticuerpos anti-AT purificados (compárese "100 % de plasma" con "100 % de plasma + anti-AT" y con "0 % de plasma" en la figura 5).

[0105] Aunque la AT es el inhibidor principal de la trombina en el plasma, otros inhibidores en el plasma tales como el cofactor de heparina II también pueden contribuir a la inhibición de la trombina. En cambio, el FXa se inhibe exclusivamente en el plasma por la AT. Por lo tanto, los resultados con los anticuerpos anti-AT se confirmaron en otro ensayo (STA Rotachrom Heparin, N.º de catálogo: 11556959140; Roche Diagnostics), que es similar al ensayo con trombina descrito anteriormente excepto en que se usa FXa bovino como proteasa y Etil-Malonil-S-Pro-Arg-pNA.AcOH como el sustrato cromogénico (a 2 mg/ml). Además, se evalúan 15 µL de muestras de plasma diluidas 1 a 10 (en el diluyente proporcionado con el ensayo). Se hicieron mezclas de 6 µg de anticuerpos anti-AT purificados de afinidad en 7,5 µL y 7,5 µL de plasma normal diluido 1 a 5 y se evaluaron en el ensayo. La adición de los anticuerpos purificados de afinidad a plasma de humano fresco dependientemente de la dosis abandonó el efecto inhibitorio del plasma en el FXa (compárese "100 % de plasma" con "100 % de plasma + anti-AT" y con "0 % de plasma" en la figura 6).

[0106] Los resultados mostrados en las figuras 5 y 6 muestran que la inhibición completa de la actividad de la AT en el plasma se puede conseguir con anticuerpos policlonales contra AT. Este efecto de los anticuerpos de la AT purificados de afinidad se confirmó en diversas otras muestras de plasma: en todas las muestras de plasma evaluadas se observó inhibición completa de la actividad de la AT tras la adición observada de anticuerpos policlonales purificados de afinidad contra AT.

Ejemplo 2: Efectos de los inhibidores de AT en la generación de trombina en plasma normal y en plasma carente de FVIII

[0107] En un conjunto sucesivo de experimentos establecimos entonces si la inhibición de la AT mediante la adición de anticuerpos anti-AT purificados de afinidad podría afectar a la generación de trombina inducida por TF en plasma normal y en plasma hemofílico.

[0108] La trombina es la enzima clave del sistema de coagulación y la generación de trombina en el tiempo *in vitro* tras la adición de TF al plasma se considera que es un modelo *ex vivo* excelente para la coagulación. La generación de trombina en el plasma hemofílico en bajas concentraciones de TF se dificulta seriamente y las intervenciones terapéuticas que se han mostrado que son eficaces para detener el sangrado en pacientes hemofílicos, es decir, preparaciones de FVIII, rFVIIa y el complejo de protrombina activada tal como FEIBA (J Astermark *et al.*, Blood 2007;109:546-551; HR Roberts *et al.*, Blood 2004;104:3858-3864) han mostrado todas que son capaces de restaurar la generación de trombina hasta cierto punto (K Varadi *et al.*, J Thromb Haemost 2003;1:2374-80; NM Aljamali *et al.*, Haemophilia 2009;15:1318-26). Por lo tanto, seleccionamos este modelo *ex vivo* para evaluar los efectos de los inhibidores de AT.

[0109] El modelo, el ensayo de trombograma automático calibrado se realizó esencialmente como se describe por Hemker *et al.* (Pathophysiol Haemost Thromb 2002;32:249-2) y el manual proporcionado por Thrombinoscope (Maastricht, Países Bajos). La coagulación se desencadenó mediante la recalcificación en presencia de 1 o 5 pM de factor tisular humano recombinante, 4 µM de fosfolípidos procoagulantes, y 417 µM de sustrato fluorogénico Z-Gly-Gly-Arg-AMC. La fluorescencia se controló con un fluorómetro (Fluoroscanner Ascent, ThermoLabsystems, Helsinki, Finlandia), y el potencial de trombina endógena (ETP) se calculó utilizando el software Thrombinoscope® (Thrombinoscope). El "trombograma" resultante en plasma pobre en plaquetas o rico en plaquetas mide la hipocoagulabilidad tal como hemofilia o el uso de anticoagulantes, pero también hipercoagulabilidades tales como la deficiencia de AT, y demás. Como se muestra en la figura 7, la adición de anticuerpos anti-AT purificados indujo una generación de trombina mejorada en el plasma normal conforme con la existencia de un estado de hipercoagulabilidad, que es conforme con la inhibición de la AT en el plasma.

[0110] El mismo experimento se realizó excepto en que se usó plasma carente de FVIII en lugar de plasma normal agrupado. Los pacientes con hemofilia carecen de factor VIII (o factor IX) y muestran mucha menos generación de trombina a baja concentración de TF que la gente sana. Como se puede observar en la figura 8, la generación de trombina, como previsto, se redujo de hecho en el plasma hemofílico con niveles de valor máximo de aproximadamente 20 nM, y conforme con una hipocoagulabilidad del plasma. La adición de anticuerpos policlonales de cabra purificados de afinidad contra AT potenció dependientemente de la dosis la generación de trombina en el plasma carente de FVIII. En la mayor concentración añadida (250 µg/ml) se observó un aumento de casi 2 veces en la generación de trombina. Como la generación de trombina en el plasma se considera que es un indicador excelente para el potencial para generar trombina *in vivo*, estos datos sostienen fuertemente que la inhibición de la AT constituye un enfoque terapéutico para la hemofilia para restaurar el defecto de generación de trombina mediante el *baipás* del FVIII.

Listado de secuencias

[0111]

<110> UMC Utrecht Holding B.V.

<120> Compuestos para el uso para potenciar la coagulación
 <130> P6041926PCT
 5 <140> PCT/NL2012/050581
 <141> 2012-08-24
 <150> US 61/527,140
 <151> 2011-08-25
 10 <160> 1
 <170> Versión de PatentIn 3.3
 15 <210> 1
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> la secuencia de aminoácidos de los residuos P1-P14 del RSL
 <400> 1
 Ser Glu Ala Ala Ala Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de antitrombina III para uso en el tratamiento y la prevención de un sangrado:

- 5 i) en un sujeto que padece un trastorno de sangrado adquirido o genético (hipocoagulabilidad); o,
 ii) en un sujeto que tiene una condición clínica **caracterizada por** sangrado excesivo, donde el sangrado no se debe al uso de anticoagulantes;

donde el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en:

- 10 a) un péptido o peptidomimético que imita la secuencia de aminoácidos de los residuos P1-P14 del RSL;
 b) un aptámero que se enlaza específicamente a la antitrombina III; y,
 c) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se enlaza específicamente a la antitrombina III,

15 y donde el inhibidor, cuando se añade a plasma agrupado de voluntarios sanos, causa una reducción de los niveles de antitrombina III funcional de al menos el 20 % medido con un ensayo cromogénico para la antitrombina III funcional usando el factor Xa o trombina.

20 2. Inhibidor para un uso según la reivindicación 1, donde el trastorno de sangrado es hemofilia.

3. Inhibidor para un uso según la reivindicación 2, donde el sujeto es un hemofílico con anticuerpos neutralizadores del factor VIII o factor IX.

25 4. Inhibidor para un uso según la reivindicación 3, donde el inhibidor se usa como terapia profiláctica de baipás del factor VIII o factor IX.

5. Inhibidor para un uso según la reivindicación 1, donde la condición clínica **caracterizada por** sangrado excesivo es uno o más de cirugía, traumatismo y sangrado interno.

30 6. Inhibidor para un uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se enlaza específicamente a un epítipo en la secuencia del RSL de la antitrombina III.

35 7. Inhibidor para un uso según la reivindicación 6, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo dificulta la inserción del RSL en la lámina β central de la antitrombina III.

8. Inhibidor para un uso según la reivindicación 6 o 7, donde el epítipo en la secuencia del RSL de la antitrombina III comprende uno o más de los residuos P1 - P14 del RSL.

40 9. Inhibidor para un uso según la reivindicación 8, donde el epítipo comprende residuos del RSL alrededor de P10, los residuos P5 - P10 del RSL o los residuos P3 - P8 del RSL.

Fig. 1

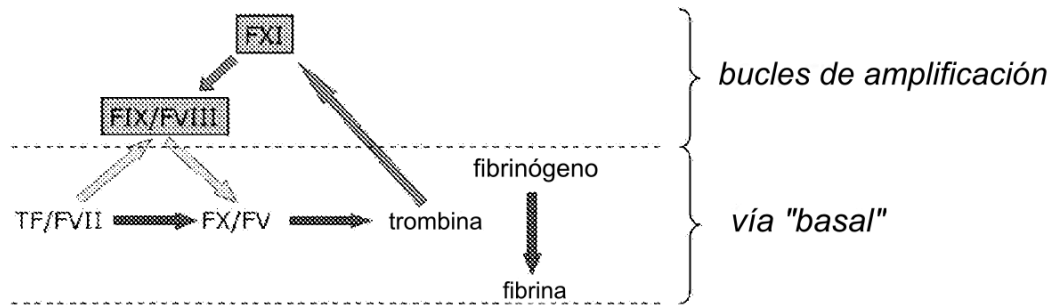
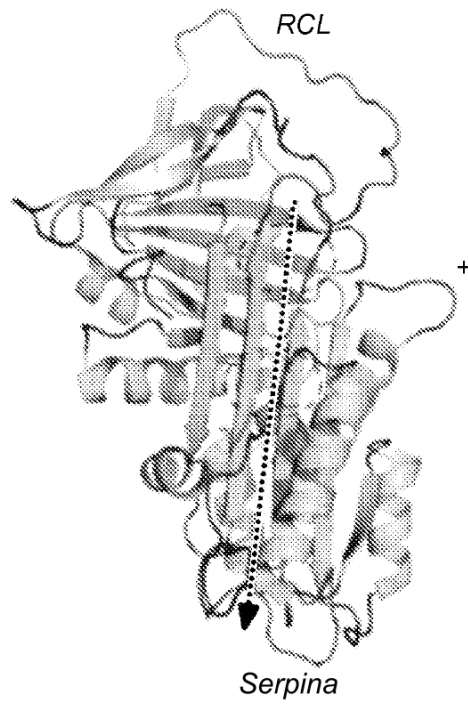


Fig. 2



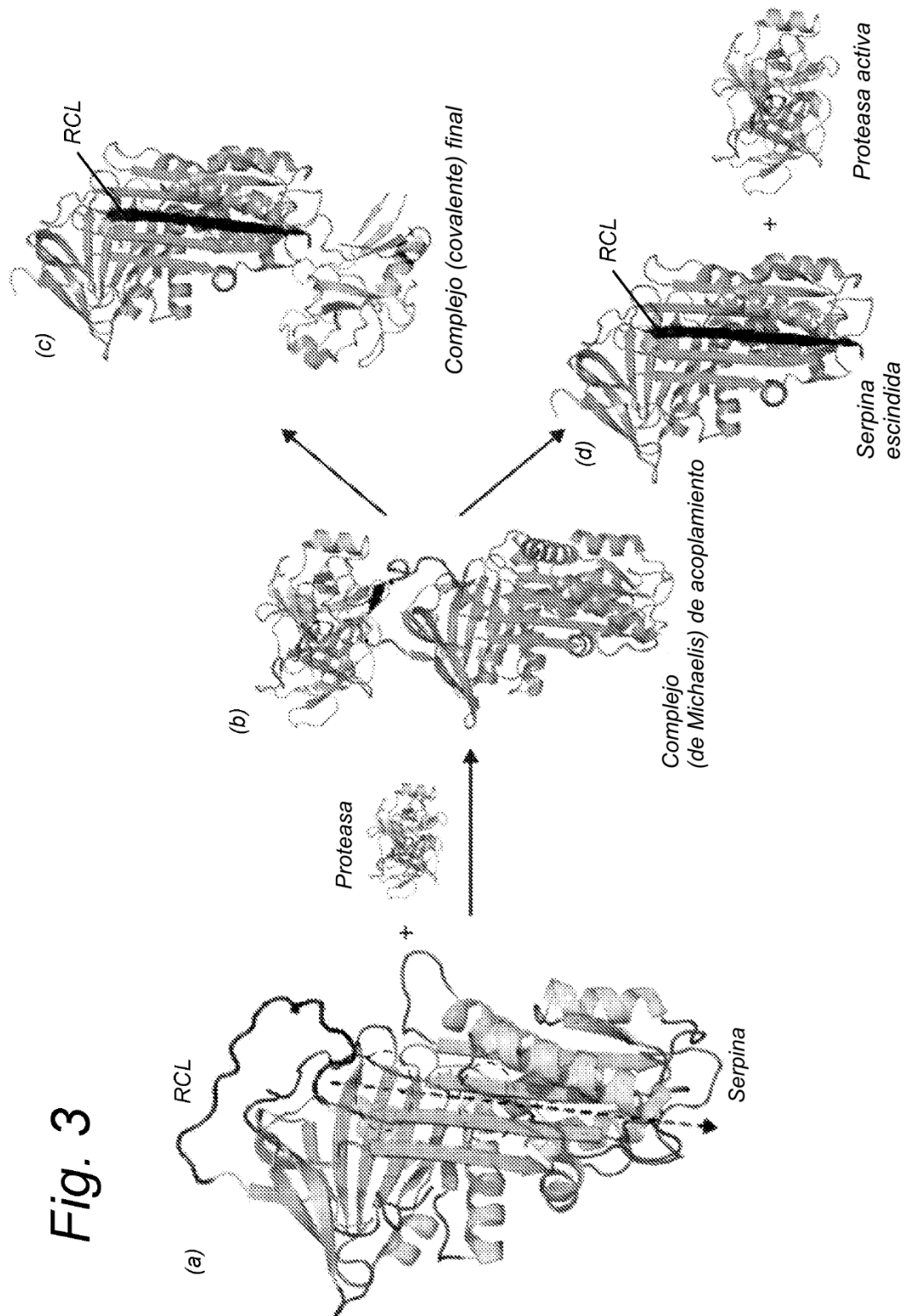


Fig. 4

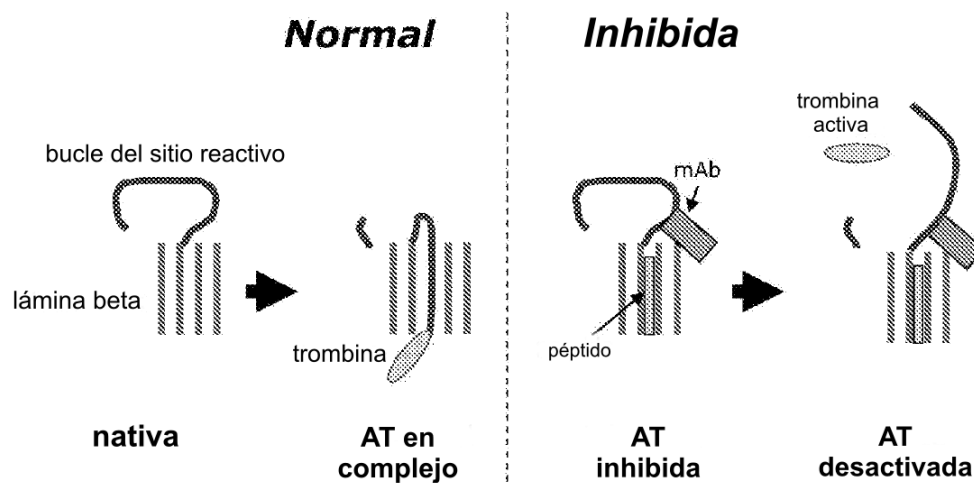


Fig. 5

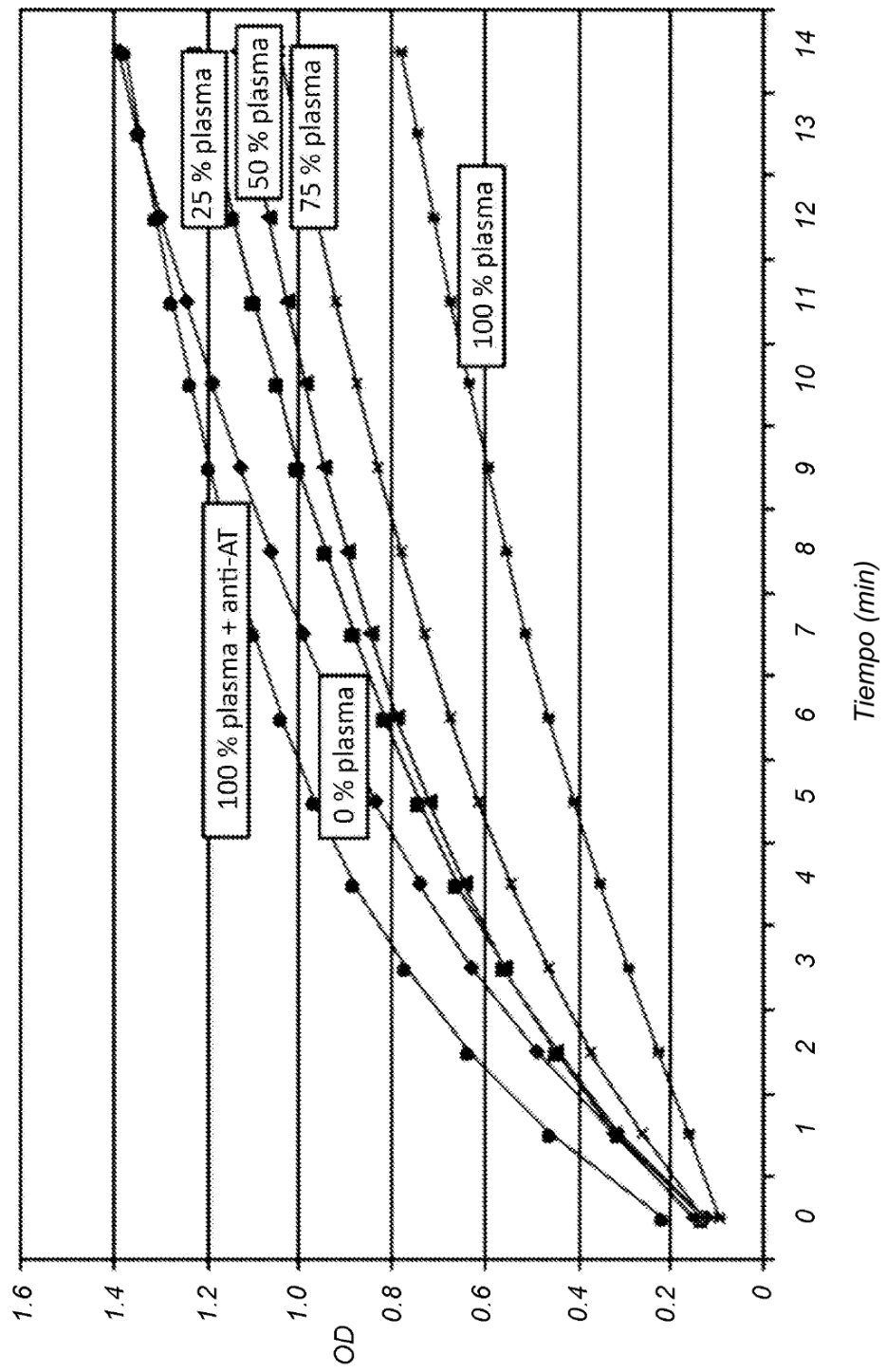


Fig. 6

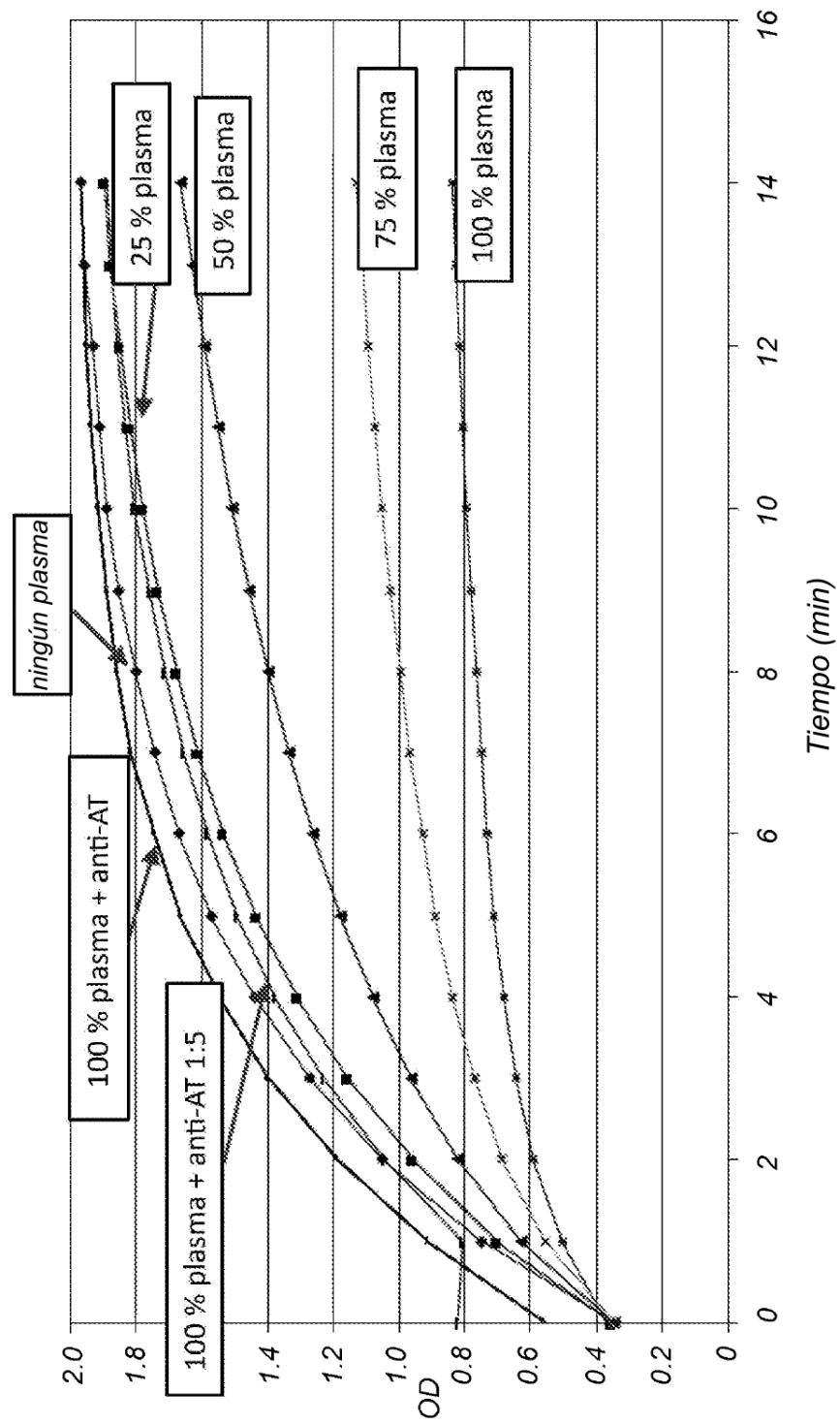


Fig. 7

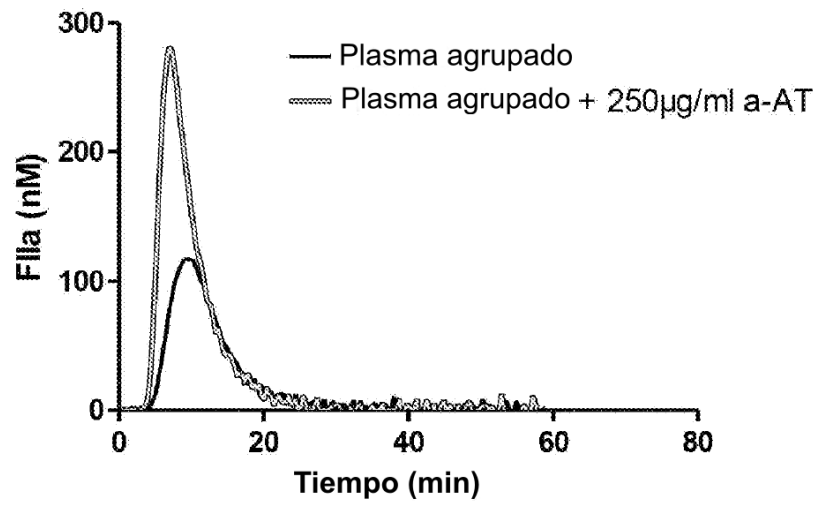


Fig. 8

