(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 742 898**

(51) Int. CI.:

A61K 38/48 (2006.01)
A61K 38/54 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2015 PCT/US2015/020361**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15138847**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2015 E 15712018 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 3116534**

(54) Título: **Composiciones de protrombina humana y factor X activado para mejorar la hemostasia en el tratamiento de trastornos hemorrágicos**

(30) Prioridad:

14.03.2014 US 201461953496 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2020

(73) Titular/es:

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)
1200 Lakeside Drive
Bannockburn, IL 60015, US y
BAXALTA GMBH (50.0%)

(72) Inventor/es:

DOCKAL, MICHAEL;
KNAPPE, SABINE;
TILL, SUSANNE;
TURECEK, PETER, LEOPOLD y
SCHEIFLINGER, FRIEDRICH

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de protrombina humana y factor X activado para mejorar la hemostasia en el tratamiento de trastornos hemorrágicos

Campo

Se divulgan en el presente documento composiciones que mejoran la hemostasia para su uso en el tratamiento de trastornos hemorrágicos y en la reversión de la actividad anticoagulante.

Antecedentes

La cascada de la coagulación mediante la que el cuerpo humano produce coágulos de sangre es el mecanismo principal del cuerpo para detener la hemorragia. Los coágulos de sangre se producen por las plaquetas que se unen juntas en una matriz de fibrina para formar un trombo en el sitio del vaso sanguíneo dañado. La incapacidad del cuerpo para formar coágulos de sangre puede conducir a una hemorragia excesiva que puede ser muy peligrosa. La sangre que no puede coagularse de manera apropiada en un individuo es a menudo el signo de un trastorno hemorrágico.

La incapacidad para formar coágulos de sangre puede ser debida a una deficiencia o falta de factores de coagulación en la cascada de la coagulación. Por ejemplo, la hemofilia A, el tipo más común de hemofilia, es en su mayoría un trastorno hemorrágico hereditario en el que existe una deficiencia de factor VIII (FVIII). Para una persona con hemofilia A que resulta herida, la hemorragia no se detiene fácilmente y requiere más tiempo para detenerse. El desarrollo de anticuerpos, también denominados inhibidores, contra FVIII en respuesta a terapia sustitutiva del FVIII es un reto adicional para el tratamiento de la hemofilia A.

Un tipo menos común de hemofilia, la hemofilia B, también es en su mayoría un trastorno hemorrágico hereditario que da como resultado una deficiencia de factor IX (FIX) y también se conoce como “enfermedad de Christmas”. El desarrollo de anticuerpos, también denominados inhibidores, contra FIX en respuesta a la terapia sustitutiva del FIX es un reto adicional para el tratamiento de la hemofilia B.

Otro trastorno hemorrágico, la enfermedad de von Willebrand, también una enfermedad genética hereditaria, se produce por una deficiencia o un defecto en el factor de von Willebrand (vWF), una proteína de la coagulación sanguínea. El vWF es crítico en las fases iniciales de la coagulación sanguínea ya que interactúa con las plaquetas para formar un trombo en el sitio de la herida.

El tratamiento de trastornos hemorrágicos habitualmente implica el reemplazo del factor de coagulación sanguínea que o bien falta o bien es deficiente. Los factores pueden o bien purificarse a partir de plasma humano donado (factores derivados de plasma), o bien elaborarse de manera recombinante (factores recombinantes).

Los anticuerpos, también denominados inhibidores, pueden desarrollarse cuando un individuo con un trastorno hemorrágico se trata con terapia sustitutiva del FVIII y el cuerpo reconoce la terapia como una amenaza en lugar de un tratamiento. En respuesta a la amenaza percibida, el sistema inmunitario fabrica anticuerpos, también denominados inhibidores, que atacan al FVIII. Esto puede resultar muy peligroso ya que los inhibidores pueden prevenir o inhibir que el FVIII controle la hemorragia. Por tanto, en el caso del desarrollo de inhibidores contra el factor de coagulación administrado, se han aplicado terapias coagulantes contrainhibidoras. El tratamiento de la hemofilia A se complica por el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra el FVIII, que se producen en aproximadamente el 30% de pacientes con hemofilia A grave. La formación de anticuerpos neutralizantes o inhibidores similares puede producirse en pacientes tratados con terapia sustitutiva del FIX o vWF. Actualmente existen dos opciones de tratamiento convencionales para los pacientes con hemofilia que han desarrollado inhibidores contra el FVIII o FIX: monoterapia con FEIBA® (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL) o FVIIa recombinante. Existen otras opciones tales como el uso de complejos de protrombina o incluso intercambio de plasma, pero tienen más efectos secundarios y no son tan eficaces. Se ha usado FEIBA® (actividad coagulante contrainhibidora del factor VIII) durante más de treinta años en el tratamiento de pacientes con hemofilia. Es una parte integral de la terapia coagulante contrainhibidora en hemofílicos con inhibidores, controla la hemorragia en el 93% de los episodios, y tiene un alto perfil de seguridad. Algunos pacientes son resistentes o no capaces de responder a la monoterapia con FEIBA® o FVIIa recombinante, por tanto existe una necesidad de mejorar la terapia con inhibidores en la técnica. Los inventores han identificado razones eficaces de protrombina humana (FII) y factor X activado (FXa) para el tratamiento de trastornos hemorrágicos que son tan eficaces como la FEIBA®, pero requieren una cantidad menor de FII. FII y FXa pueden ser o bien recombinantes o bien derivados de plasma.

Sumario

Las presentes composiciones se dirigen a la mejora de la hemostasia para su uso en el tratamiento de trastornos hemorrágicos y la ayuda en la reversión de la actividad anticoagulante.

Las razones eficaces de protrombina (FII) y factor X activado (FXa) se describen en el presente documento para ayudar en el tratamiento de trastornos hemorrágicos y la reversión de la actividad anticoagulante. FII y FXa pueden ser o bien recombinantes o bien derivados de plasma.

Determinadas realizaciones incluyen una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico que comprende FII y FXa en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es más de 1:20.000.

En otras realizaciones, una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico comprende aproximadamente 0,44 mg/kg de FII y aproximadamente 826 ng/kg de FXa. Alternativamente, la composición puede comprender de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de FII y de aproximadamente 560 ng/kg a aproximadamente 1100 ng/kg de FXa. Alternativamente, la composición puede comprender aproximadamente 4,4 mg/kg de FII y aproximadamente 275 ng/kg de FXa. Alternativamente, la composición puede comprender de aproximadamente 1,2 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de FII y de aproximadamente 200 ng/kg a aproximadamente 540 ng/kg de FXa.

En aún otras realizaciones, un trastorno hemorrágico puede incluir hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, hemofilia congénita A con inhibidores o hemofilia adquirida A con autoanticuerpos inhibidores contra FVIII, hemofilia congénita B con inhibidores o hemofilia adquirida B con autoanticuerpos inhibidores contra FIX, hemorragia de un traumatismo, deficiencia de factor VII (FVII), deficiencia de factor V (FV), deficiencia de factor X (FX), deficiencia de factor XI (FXI), deficiencia de factor XIII (FXIII), deficiencia de fibrinógeno, deficiencia de protrombina, coagulopatía por dilución, trombocitopenia, hemorragia de cirugías de alto riesgo, hemorragia cerebral, enfermedad de von Willebrand con inhibidores contra el factor de von Willebrand, o combinaciones de los mismos.

Otras realizaciones incluyen una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico que comprende FII y FXa en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es más de 1:20.000 y al menos un excipiente. FII y FXa pueden ser o bien derivados de plasma o bien recombinantes.

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica puede incluir aproximadamente 0,44mg/kg de FII y aproximadamente 826 ng/kg de FXa y al menos une excipiente. Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de FII y de aproximadamente 560 ng/kg a aproximadamente 1100 ng/kg de FXa y al menos un excipiente. Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender aproximadamente 4,4 mg/kg de FII y aproximadamente 275 ng/kg de FXa y al menos un excipiente. Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender de aproximadamente 1,2 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de FII y de aproximadamente 200 ng/kg a aproximadamente 540 ng/kg de FXa y al menos un excipiente.

En otras realizaciones, se describe el tratamiento de un trastorno hemorrágico que comprende administrar una composición que comprende FII y FXa en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es más de 1:20.000. FII y FXa pueden ser o bien recombinantes o bien derivados de plasma.

Aún realizaciones adicionales incluyen una composición para su uso en la ayuda en la reversión de la actividad anticoagulante que comprende FII y FXa en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es más de 1:20.000. FII y FXa pueden ser o bien recombinantes o bien derivados de plasma.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que ilustra perfiles de generación de trombina representativos de diferentes combinaciones de protrombina humana (FII) y factor X activado (FXa) en plasma humano inhibido por FVIII.

La figura 2 es un diagrama que ilustra la valoración cruzada de FII y FXa en un ensayo de trombografía automatizada calibrada (CAT) con plasma humano inhibido por FVIII.

Las figuras 3A y 3B ilustran la eficacia aguda de diferentes combinaciones de FII y FXa en un modelo de hemorragia de corte de uñas en conejos inducidos por hemofilia. La figura 3A es una vista general esquemática del procedimiento experimental. La figura 3B es un diagrama que ilustra la hemorragia relativa que sigue a un corte de uñas que se monitorizó durante 30 minutos antes y después de la administración intravenosa de FII y/o FXa, FEIBA® (control positivo) o tampón (control negativo). La mediana para cada grupo se indica como una línea negra.

La figura 4 es un diagrama que ilustra el análisis *ex vivo* de muestras de sangre completa de conejos inhibidos por FVIII tratados con FII y FXa solo o en combinación.

La figura 5 es un diagrama que ilustra el análisis de CAT de muestras de plasma de conejos inhibidos por FVIII tratados con FII y FXa solo o en combinación.

Descripción detallada

Las razones eficaces de protrombina humana (FII) y factor X activado (FXa) se describen en el presente documento para ayudar en el tratamiento de trastornos hemorrágicos y la reversión de la actividad anticoagulante.

En el presente documento se divulgan composiciones para tratar un trastorno hemorrágico que comprenden FII y FXa en las que la razón molar de FXa con respecto a FII es más de 1: 20.000. FII y FXa pueden ser o bien derivados del plasma o bien recombinantes

La producción de proteínas recombinantes tales como FII y FXa se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, el documento EP 1460131 describe un procedimiento para producir factores de coagulación sanguínea humanos recombinantes en líneas celulares humanas. Además, el documento WO 2005/038019 describe la producción de altos rendimientos de factores de coagulación de manera recombinante. El procedimiento de aislamiento de factores de coagulación a partir de productos plasmáticos también se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, la patente estadounidense 4.883.598 describe el procedimiento para aislar factores de coagulación a partir de plasma sanguíneo y productos plasmáticos usando cromatografía de líquidos.

FEIBA® es un concentrado de complejo de protrombina activado derivado de plasma usado para tratar episodios de hemorragia en pacientes hemofílicos con inhibidores. Se han identificado FII y FXa como los componentes más críticos que median el efecto hemostático de FEIBA®. La razón molar de FXa y FII en FEIBA® oscila desde 1:20.000-40.000, es decir, 1 U/ml de FEIBA® da como resultado concentraciones plasmáticas de FXa 0,035-0,07 nM y FII 1400 nM. Los intervalos de razón molar de FXa con respecto a FII en FEIBA® dan como resultado una alta demanda de protrombina que es difícil de producir de forma recombinante. FII y FX son proteínas complejas con múltiples dominios estructurales y modificaciones postraduccionales. Ambos pueden producirse de forma recombinante en líneas celulares de mamíferos, por ejemplo CHO. El factor X necesita activarse adicionalmente a FXa para la coformulación con FII en las composiciones de las presentes realizaciones.

Los pacientes hemofílicos “con inhibidores” pueden significar pacientes hemofílicos con anticuerpos, con anticuerpos neutralizantes, con anticuerpos inhibidores o similares. Los inhibidores pueden desarrollarse cuando un individuo con un trastorno hemorrágico se trata con una terapia sustitutiva y el cuerpo reconoce la terapia como una amenaza en lugar de como un tratamiento.

En el pasado, la protrombinasa parcial recombinante se ha desarrollado basándose en la razón de FXa/FII que está presente en FEIBA® para explorar la eficacia de esta combinación de factores de coagulación. Sin embargo, en este enfoque, la expresión y producción de altas cantidades de FII recombinante fue el factor limitante. Se realizaron estudios para identificar razones eficaces de FII y FXa humanos que son tan activos y eficaces como FEIBA®, pero requieren una menor cantidad de FII. Además, los estudios de expresión exploratorios usando plataformas de expresión de última generación y tecnologías de detección de clones demostraron la viabilidad técnica del factor X recombinante y la generación de protrombina. El sistema de expresión de última generación en células CHO proporcionó altos rendimientos con alta calidad de proteínas y potencia para ambos factores. La combinación de FXa recombinante y protrombina puede usarse como una opción para la terapia con inhibidores de la hemofilia. Un beneficio adicional de las composiciones de las presentes realizaciones puede ser el riesgo disminuido de trombosis, ya que la concentración de FII es menor, lo que puede conducir a menos eventos de coagulación espontánea, especialmente cuando se usa en pacientes no hemofílicos para la reversión de anticoagulantes.

Sorprendentemente, se encontró que las razones de FII con respecto a FXa muy diferentes de las encontradas en FEIBA® fueron igual de eficaces en el control de la hemorragia. En determinadas realizaciones, una composición para tratar trastornos hemorrágicos comprende FII y FXa en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es más de aproximadamente 1:20.000, más de aproximadamente 1:19.000, más de aproximadamente 1:18.000, más de aproximadamente 1:17.000, más de aproximadamente 1:16.000, más de aproximadamente 1:15.000, más de aproximadamente 1:14.000, más de aproximadamente 1:13.000, más de aproximadamente 1:12.000, más de aproximadamente 1:11.000, más de aproximadamente 1:10.000, más de aproximadamente 1:9.000, más de aproximadamente 1:8.000, más de aproximadamente 1:7.000, más de aproximadamente 1:6.000, más de aproximadamente 1:5.000, más de aproximadamente 1:4.000, más de aproximadamente 1:3.000, más de aproximadamente 1:2.000, más de aproximadamente 1:1.000, más de aproximadamente 1:950, más de aproximadamente 1:900, más de aproximadamente 1:850, más de aproximadamente 1:800, más de aproximadamente 1:750, más de aproximadamente 1:700, más de aproximadamente 1:650, más de aproximadamente 1:600, más de aproximadamente 1:550, más de aproximadamente 1:500, más de aproximadamente 1:450, más de aproximadamente 1:400, más de aproximadamente 1:350, más de aproximadamente 1:300, más de aproximadamente 1:250, más de aproximadamente 1:200, más de aproximadamente 1:150, más de aproximadamente 1:100, más de aproximadamente 1:95, más de aproximadamente 1:90, más de aproximadamente 1:85, más de aproximadamente 1:80, más de aproximadamente 1:75, más de aproximadamente 1:70, más de aproximadamente 1:65, más de aproximadamente 1:60, más de aproximadamente 1:55, más de aproximadamente 1:50, más de aproximadamente 1:45, más de aproximadamente 1:40, más de aproximadamente 1:35, más de aproximadamente 1:30, más de aproximadamente 1:25, más de aproximadamente 1:20, más de aproximadamente 1:15, más de aproximadamente 1:10 o más de aproximadamente

1:5.

En otras realizaciones, una composición para tratar trastornos hemorrágicos comprende FII y FXa en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es de aproximadamente 1:19.999, de aproximadamente 1:19.500, de aproximadamente 1:18.500, de aproximadamente 1:17.500, de aproximadamente 1:16.500, de aproximadamente 1:15.500, de aproximadamente 1:14.500, de aproximadamente 1:13.500, de aproximadamente 1:12.500, de aproximadamente 1:11.500, de aproximadamente 1:10.500, de aproximadamente 1:9.500, de aproximadamente 1:8.500, de aproximadamente 1:7.500, de aproximadamente 1:6.500, de aproximadamente 1:5.500, de aproximadamente 1:4.500, de aproximadamente 1:3.500, de aproximadamente 1:2.500, de aproximadamente 1:1.500, de aproximadamente 1:950, de aproximadamente 1:900, de aproximadamente 1:850, de aproximadamente 1:800, de aproximadamente 1:750, de aproximadamente 1:700, de aproximadamente 1:650, de aproximadamente 1:600, de aproximadamente 1:550, de aproximadamente 1:500, de aproximadamente 1:450, de aproximadamente 1:400, de aproximadamente 1:350, de aproximadamente 1:300, de aproximadamente 1:250, de aproximadamente 1:200, de aproximadamente 1:150, de aproximadamente 1:100, de aproximadamente 1:95, de aproximadamente 1:90, de aproximadamente 1:85, de aproximadamente 1:80, de aproximadamente 1:75, de aproximadamente 1:70, de aproximadamente 1:65, de aproximadamente 1:60, de aproximadamente 1:55, de aproximadamente 1:50, de aproximadamente 1:45, de aproximadamente 1:40, de aproximadamente 1:35, de aproximadamente 1:30, de aproximadamente 1:25, de aproximadamente 1:20, de aproximadamente 1:15, de aproximadamente 1:10 o de aproximadamente 1:5.

En otras realizaciones, una composición para tratar trastornos hemorrágicos comprende aproximadamente 0,1 mg/kg de FII y aproximadamente 800 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,15 mg/kg de FII y aproximadamente 700 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,2 mg/kg de FII y aproximadamente 600 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,25 mg/kg de FII y aproximadamente 500 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,3 mg/kg de FII y aproximadamente 400 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,35 mg/kg de FII y aproximadamente 300 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,4 mg/kg de FII y aproximadamente 200 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,45 mg/kg de FII y aproximadamente 200 ng/kg de FXa, o aproximadamente 0,5 mg/kg de FII y aproximadamente 100 ng/kg de FXa. En aún otras realizaciones, una composición para tratar trastornos hemorrágicos comprende aproximadamente 0,44 mg/kg de FII y aproximadamente 826 ng/kg de FXa. En otras realizaciones, una composición para tratar trastornos hemorrágicos comprende aproximadamente 4,4 mg/kg de FII y aproximadamente 275 ng/kg de FXa.

En determinadas realizaciones, una composición para tratar trastornos hemorrágicos comprende de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg de FII y de aproximadamente 600 ng/kg a aproximadamente 1100 ng/kg de FXa, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de FII y de aproximadamente 500 ng/kg a aproximadamente 1000 ng/kg de FXa, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg de FII y de aproximadamente 450 ng/kg a aproximadamente 950 ng/kg de FXa, de aproximadamente 2,0 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg de FII y de aproximadamente 400 ng/kg a aproximadamente 900 ng/kg de FXa, de aproximadamente 2,5 mg/kg a aproximadamente 3,0 mg/kg de FII y de aproximadamente 350 ng/kg a aproximadamente 850 ng/kg de FXa, de aproximadamente 3,5 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg de FII y de aproximadamente 300 ng/kg a aproximadamente 600 ng/kg de FXa, o de aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 5,5 mg/kg de FII y de aproximadamente 200 ng/kg a aproximadamente 600 ng/kg de FXa. En otras realizaciones, una composición para tratar trastornos hemorrágicos comprende de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de FII y de aproximadamente 560 ng/kg a aproximadamente 1100 ng/kg de FXa. En aún otras realizaciones, una composición para tratar trastornos hemorrágicos comprende de aproximadamente 1,2 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de FII y de aproximadamente 200 ng/kg a aproximadamente 540 ng/kg de FXa.

En algunas realizaciones, el FXa es aproximadamente el 90% de la forma FXaα y el 10 % de la forma FXaβ. Alternativamente el FXa puede ser aproximadamente el 100% de la forma FXaα y el 0% de la forma FXaβ, aproximadamente el 80% de la forma FXaα y el 20% de la forma FXaβ, aproximadamente el 70% de la forma FXaα y el 30% de la forma FXaβ, aproximadamente el 60% de la forma FXaα y el 40% de la forma FXaβ, aproximadamente el 50% de la forma FXaα y el 50% de la forma FXaβ, aproximadamente el 40% de la forma FXaα y el 60% de la forma FXaβ, aproximadamente el 30% de la forma FXaα y el 70% de la forma FXaβ, aproximadamente el 20% de la forma FXaα y el 80% de la forma FXaβ, aproximadamente el 10% de la forma FXaα y el 90% de la forma FXaβ, o aproximadamente el 0% de la forma FXaα y el 100% de la forma FXaβ.

Los trastornos hemorrágicos incluyen, pero no se limitan a, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, hemofilia congénita A con inhibidores o hemofilia adquirida A con autoanticuerpos inhibidores contra FVIII, hemofilia congénita B con inhibidores o hemofilia adquirida B con autoanticuerpos inhibidores contra FIX, hemorragia de un traumatismo, deficiencia de FVII, deficiencia de FV, deficiencia de FX, deficiencia de FXI, deficiencia de FXIII, deficiencia de fibrinógeno, deficiencia de protrombina, coagulopatía por dilución, trombocitopenia, hemorragia de cirugías de alto riesgo, hemorragia cerebral, enfermedad de von Willebrand con inhibidores contra el factor de von Willebrand, o combinaciones de los mismos.

Los anticoagulantes se usan para tratar y prevenir coágulos de sangre. A los individuos que están en riesgo de

desarrollar un coágulo sanguíneo, o para prevenir el crecimiento de un coágulo sanguíneo existente, se les administra un anticoagulante. Los que están en riesgo de desarrollar un coágulo sanguíneo incluyen aquellos con fibrilación auricular, una válvula cardíaca mecánica, endocarditis, estenosis mitral, determinados trastornos sanguíneos, y los que han tenido una cirugía de prótesis de cadera o cirugía de prótesis de rodilla. A veces la reversión de anticoagulantes es necesaria por ejemplo, en situaciones en las que existe un alto riesgo de hemorragia. El efecto farmacológico de algunos anticoagulantes, por ejemplo warfarina, puede revertirse fácilmente mediante la administración de vitamina K. Algunos anticoagulantes introducidos de manera más reciente tales como apixabán, betrixabán y rivaroxabán no pueden revertirse fácilmente mediante la administración de vitamina K. Actualmente no existe antídoto para una hemorragia no deseada producida por estos anticoagulantes que pueden ser bastante peligrosos. Por tanto, un beneficio adicional de las composiciones divulgadas en el presente documento es que cuando se usan en pacientes no hemofílicos para la reversión anticoagulante, existen menos eventos de coagulación espontánea.

Las vías de administración para las composiciones divulgadas incluyen, pero no se limitan a, inyección parenteral, inyección intravenosa, inyección subcutánea e inyección intramuscular.

La administración de la dosis puede ser una única dosificación o acumulativa (administración de la dosis en serie), y puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento de hemofilia congénita puede comprender la administración de una dosis eficaz de una composición divulgada en el presente documento durante toda la vida. Como un ejemplo no limitativo, una dosis eficaz de una composición divulgada en el presente documento puede administrase una vez a un individuo, por ejemplo, como una única inyección. Alternativamente, el tratamiento de un trastorno hemorrágico puede comprender múltiples administraciones de una dosis eficaz de una composición divulgada en el presente documento llevadas a cabo a lo largo de un intervalo de periodos de tiempo, tales como, por ejemplo, diariamente, una vez cada pocos días o semanalmente. Como un ejemplo no limitativo, una composición divulgada en el presente documento puede administrarse dos o tres veces semanalmente a un individuo. La programación de la administración puede variar de individuo a individuo, dependiendo de factores tales como la gravedad de los síntomas de un individuo. Por ejemplo, una dosis eficaz de una composición divulgada en el presente documento puede administrarse a un individuo una vez al día, o cada de dos a tres días, durante un periodo indefinido de tiempo. Un experto habitual en la técnica reconocerá que el estado del individuo puede monitorizarse a lo largo del transcurso del tratamiento y que la cantidad eficaz de una composición divulgada en el presente documento que se administra puede ajustarse como corresponda. La eficacia clínica puede describirse controlando la hemorragia. La administración puede ser a demanda, profiláctica, preoperatoria o perioperatoria.

Determinadas realizaciones incluyen una composición farmacéutica para tratar trastornos hemorrágicos que comprende FII y FXa derivados de plasma en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es más de 1:20.000 y al menos un excipiente. Los excipientes incluyen, pero no se limitan a, agua, NaCl u otras sales para isotonicidad, dextrosa al 5% en agua, disoluciones tamponadas con un pH de 2-8, trehalosa, manitol o sorbitol como estabilizadores, tampones tales como tampones de fosfato o acetato, agentes de tonicidad tales como sales o aminoácidos, y tensioactivo monooleato de polioxietilensorbitano (TWEEN 80). Además puede liofilizarse la composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica para tratar trastornos hemorrágicos comprende al menos un excipiente, FII y FXa, en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es más de aproximadamente 1:20.000, más de aproximadamente 1:19.000, más de aproximadamente 1:18.000, más de aproximadamente 1:17.000, más de aproximadamente 1:16.000, más de aproximadamente 1:15.000, más de aproximadamente 1:14.000, más de aproximadamente 1:13.000, más de aproximadamente 1:12.000, más de aproximadamente 1:11.000, más de aproximadamente 1:10.000, más de aproximadamente 1:9.000, más de aproximadamente 1:8.000, más de aproximadamente 1:7.000, más de aproximadamente 1:6.000, más de aproximadamente 1:5.000, más de aproximadamente 1:4.000, más de aproximadamente 1:3.000, más de aproximadamente 1:2.000, más de aproximadamente 1:1.000, más de aproximadamente 1:950, más de aproximadamente 1:900, más de aproximadamente 1:850, más de aproximadamente 1:800, más de aproximadamente 1:750, más de aproximadamente 1:700, más de aproximadamente 1:650, más de aproximadamente 1:600, más de aproximadamente 1:550, más de aproximadamente 1:500, más de aproximadamente 1:450, más de aproximadamente 1:400, más de aproximadamente 1:350, más de aproximadamente 1:300, más de aproximadamente 1:250, más de aproximadamente 1:200, más de aproximadamente 1:150, más de aproximadamente 1:100, más de aproximadamente 1:95, más de aproximadamente 1:90, más de aproximadamente 1:85, más de aproximadamente 1:80, más de aproximadamente 1:75, más de aproximadamente 1:70, más de aproximadamente 1:65, más de aproximadamente 1:60, más de aproximadamente 1:55, más de aproximadamente 1:50, más de aproximadamente 1:45, más de aproximadamente 1:40, más de aproximadamente 1:35, más de aproximadamente 1:30, más de aproximadamente 1:25, más de aproximadamente 1:20, más de aproximadamente 1:15, más de aproximadamente 1:10 o más de aproximadamente 1:5.

En otras realizaciones, una composición farmacéutica para tratar trastornos hemorrágicos comprende al menos un excipiente, FII y FXa, en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es de aproximadamente 1:19.999, de aproximadamente 1:19.500, de aproximadamente 1:18.500, de aproximadamente 1:17.500, de aproximadamente 1:16.500, de aproximadamente 1:15.500, de aproximadamente 1:14.500, de aproximadamente 1:13.500, de

aproximadamente 1:12.500, de aproximadamente 1:11.500, de aproximadamente 1:10.500, de aproximadamente 1:9.500, de aproximadamente 1:8.500, de aproximadamente 1:7.500, de aproximadamente 1:6.500, de aproximadamente 1:5.500, de aproximadamente 1:4.500, de aproximadamente 1:3.500, de aproximadamente 1:2.500, de aproximadamente 1:1.500, de aproximadamente 1:950, de aproximadamente 1:900, de aproximadamente 1:850, de aproximadamente 1:800, de aproximadamente 1:750, de aproximadamente 1:700, de aproximadamente 1:650, de aproximadamente 1:600, de aproximadamente 1:550, de aproximadamente 1:500, de aproximadamente 1:450, de aproximadamente 1:400, de aproximadamente 1:350, de aproximadamente 1:300, de aproximadamente 1:250, de aproximadamente 1:200, de aproximadamente 1:150, de aproximadamente 1:100, de aproximadamente 1:95, de aproximadamente 1:90, de aproximadamente 1:85, de aproximadamente 1:80, de aproximadamente 1:75, de aproximadamente 1:70, de aproximadamente 1:65, de aproximadamente 1:60, de aproximadamente 1:55, de aproximadamente 1:50, de aproximadamente 1:45, de aproximadamente 1:40, de aproximadamente 1:35, de aproximadamente 1:30, de aproximadamente 1:25, de aproximadamente 1:20, de aproximadamente 1:15, de aproximadamente 1:10 o de aproximadamente 1:5.

En aún otras realizaciones, una composición farmacéutica para tratar trastornos hemorrágicos comprende al menos un excipiente y aproximadamente 0,1 mg/kg de FII y aproximadamente 800 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,15 mg/kg de FII y aproximadamente 700 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,2 mg/kg de FII y aproximadamente 600 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,25 mg/kg de FII y aproximadamente 500 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,3 mg/kg de FII y aproximadamente 400 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,35 mg/kg de FII y aproximadamente 300 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,4 mg/kg de FII y aproximadamente 200 ng/kg de FXa, aproximadamente 0,45 mg/kg de FII y aproximadamente 200 ng/kg de FXa, o aproximadamente 0,5 mg/kg de FII y aproximadamente 100 ng/kg de FXa. En otras realizaciones, una composición para tratar trastornos hemorrágicos comprende aproximadamente 0,44 mg/kg de FII y aproximadamente 826 ng/kg de FXa. En otras realizaciones, una composición para tratar trastornos hemorrágicos comprende aproximadamente 4,4 mg/kg de FII y aproximadamente 275 ng/kg de FXa.

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica para tratar trastornos hemorrágicos comprende al menos un excipiente y de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg de FII y de aproximadamente 600 ng/kg a aproximadamente 1100 ng/kg de FXa, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de FII y de aproximadamente 500 ng/kg a aproximadamente 1000 ng/kg de FXa, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg de FII y de aproximadamente 450 ng/kg a aproximadamente 950 ng/kg de FXa, de aproximadamente 2,0 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg de FII y de aproximadamente 400 ng/kg a aproximadamente 900 ng/kg de FXa, de aproximadamente 2,5 mg/kg a aproximadamente 3,0 mg/kg de FII y de aproximadamente 350 ng/kg a aproximadamente 850 ng/kg de FXa, de aproximadamente 3,5 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg de FII y de aproximadamente 300 ng/kg a aproximadamente 600 ng/kg de FXa, o de aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 5,5 mg/kg de FII y de aproximadamente 200 ng/kg a aproximadamente 600 ng/kg de FXa. En otras realizaciones, una composición para tratar trastornos hemorrágicos comprende de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de FII y de aproximadamente 560 ng/kg a aproximadamente 1100 ng/kg de FXa. En otras realizaciones, una composición para tratar trastornos hemorrágicos comprende de aproximadamente 1,2 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de FII y de aproximadamente 200 ng/kg a aproximadamente 540 ng/kg de FXa.

Para determinar la razón molar de FXa con respecto a FII útil en el tratamiento de trastornos hemorrágicos, se usó un enfoque de traducción de *in vitro* a *in vivo*. En primer lugar, se sometieron a prueba las combinaciones *in vitro* para determinar su potencial procoagulante en comparación con FEIBA® usando un sistema de ensayo hemostático global con plasma humano. En segundo lugar, se tradujeron concentraciones plasmáticas de FII/FXa seleccionadas en dosis para conejos inducidos por hemofilia y se evaluó la eficacia en un modelo de hemorragia aguda.

Los experimentos para la evaluación *in vitro* e *in vivo* de diferentes razones de FII y FXa humanos se realizaron con proteínas derivadas de plasma comercialmente disponibles cuidadosamente seleccionadas de Enyzme Research Laboratories. Para la selección, se han sometido a prueba proteínas de diferentes proveedores para determinar la pureza (tinción con plata, inmunotransferencia de tipo Western), actividad (generación de trombina en plasma humano y de conejo), concentración y cálculo del precio.

Conociendo la composición y los componentes activos del FEIBA® multicomponente, se generó una combinación de dos factores de coagulación: FII y FXa humano. Se aplicó un ensayo de trombografía automatizada calibrada (CAT) basado en plasma humano para identificar las combinaciones de FII/FXa a razones específicas que tenían un efecto procoagulante *in vitro* similar en plasma inhibido por FVIII como FEIBA®. Se seleccionaron tres razones FII/FXa, se tradujeron en dosis preclínicas y se evaluó la eficacia en un modelo de hemorragia en conejo. Tres composiciones, la primera con el 100% de FII y FXa (igual que en FEIBA®), la segunda con protrombina al 10% y FXa al 300%, y FEIBA®, mostraron eficacia estadísticamente significativa. La última dosis contiene ~20 veces menos de FII y 4 veces más FXa en comparación con los estudios previos. La dosis con FII al 25% y FXa al 200% no fue eficaz. El efecto hemostático observado parece que no está mediado ni por FII ni por FXa solo. En conclusión, la razón de FII y FXa se ajustó de manera que no se alteraran la actividad y la eficacia *in vivo* y se mantuviera viable la producción de proteínas recombinantes para una versión recombinante de FII/FXa.

Ejemplo 1: evaluación *In vitro* de una combinación de FXa/FII en un ensayo de generación de trombina

El ensayo de trombografía automatizada calibrada (CAT) se ha usado para monitorizar los efectos pro y anticoagulantes de sustancias en plasma humano. El trombograma describe la concentración de trombina en plasma de coagulación y la CAT es por tanto una prueba de la función fisiológica general del sistema hemostático. El ensayo se basa en la medición de la fluorescencia que se genera mediante la escisión del sustrato fluorogénico Z-G-G-R-AMC por trombina a lo largo del tiempo tras el inicio de la coagulación por el factor tisular (TF). El ensayo se realiza en un dispositivo Thrombograph™, un fluorómetro de placas de 96 pocillos disponible de Thermo Scientific, y usa un calibrador de trombina que es necesario para corregir el efecto del filtro interno, la variabilidad de donante a donante en el color del plasma, la depleción del sustrato y las diferencias instrumentales.

Se evaluó la actividad procoagulante de diversas combinaciones de FII (140-1400 nM) y FXa (0,035-0,21 nM) derivados de plasma mediante CAT en plasma inhibido por FVIII. Se trató una mezcla de plasma humano normal (George King Biomedical) con 50 unidades Bethesda (UB)/ml de plasma anti-FVIII de cabra (Baxter). Se añadió inhibidor de tripsina de maíz (CTI, 40 μg/ml, Haematologic Technologies) para inhibir la activación previa por el factor XIIa. Se provocó la coagulación con TF 1 pM + fosfolípidos (PL) 4 μM (reactivo PPP LOW, Trombinaoscope BV). Se monitorizó la generación de trombina a 37ºC durante 90 min en un lector Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific; longitud de onda de 390/460 nm) después de la recalcificación. Se realizaron mediciones duplicadas para cada muestra.

Se usó un protocolo de CAT optimizado para plasma de conejo (40 μl/ml de CTI, dilución de plasma final de 1:3, TF 0,6 pM y PL 4 μM) para confirmar en estudios puntuales que FII y FXa humanos son activos también en plasma de conejo. Se usó el mismo protocolo de CAT para el análisis de muestras de plasma de conejo *ex vivo* en el contexto del estudio de hemorragia de corte de uñas.

Se sometió a prueba primero la viabilidad de la reducción de la cantidad de FII dentro de la combinación de FII/FXa combinación en un ensayo de CAT basado en plasma humano. El punto de inicio fue la razón de FXa:FII tal como se encontró en FEIBA® (1:20.000), que es equivalente a concentraciones plasmáticas de FXa 0,07 nM y FII 1400 nM. En la figura 1 se muestra el efecto de la disminución de la concentración de FII desde 1400 nM (FII al 100%) hasta 140 nM (FII al 10%) mientras se mantiene la concentración de FXa constante 0,14 nM (200%). Se observó que FXa 0,14 nM solo corrigió la generación de trombina en plasma inhibido por FVIII así como 1 U/ml de FEIBA®. La presencia de FII aumentó el potencial de trombina endógeno (PTE) de una manera dependiente de la dosis y dio como resultado una generación de trombina mayor de 1 U/ml de FEIBA®.

Posteriormente, se realizó la valoración cruzada de un intervalo de concentraciones más amplio de FII (de 105 nM a 1400 nM) y FXa (de 0,035 a 0,21 nM) en el ensayo de CAT (figura 2). Se estableció un intervalo objetivo para la actividad procoagulante deseada de FII/FXa sometiendo a prueba el efecto de 20 lotes de FEIBA® diferentes a 1 U/ml. Se usó el PTE como parámetro de CAT comparativo ya que mostró el cambio más significativo en la respuesta a FII/FXa. Se identificaron unas pocas combinaciones de FII/FXa dentro del intervalo de actividad de FEIBA® en la corrección de la generación de trombina en plasma inhibido por FVIII, que dio como resultado protrombina del 100% al 7,5% y FXa del 100 al 300% como en FEIBA® (tabla 1). Una ligera disminución en la generación de trombina tras la reducción del FII puede compensarse mediante un aumento moderado en el FXa. Se seleccionaron tres combinaciones que iban a someterse a prueba en un modelo de eficacia *in vivo* en conejos inducidos por hemofilia A.

Tabla 1. Resumen de razones molares de FXa:FII que alcanzaron un efecto procoagulante (basándose en los valores de PTE) equivalentes a 1 U/ml de FEIBA® en un ensayo de CAT con sangre humana inhibida por FVIII.

FII (nM)	FXa (nM)	FII (% de cantidad en FEIBA)	FXa (% de cantidad en FEIBA)	Razón molar de FXa:FII
1400*	0,07*	100	100	1:20.000*
700	0,07	50	100	1:10.000
350	0,07	50	100	1:5000
350	0,14	25	200	1:2500
140	0,14	10	200	1:1000
140	0,21	10	300	1:670
105	0,21	7,5	300	1:500

(* indica la razón que se encontró en FEIBA®. Las combinaciones marcadas en gris se seleccionaron para un estudio *in vivo*)

Ejemplo 2: estudio demostrativo preliminar de eficacia *in vivo* de concepto en modelo de conejo inducido por hemofilia

El objetivo de este estudio demostrativo preliminar era evaluar la eficacia de tres dosis de FII/FXa administradas

juntas o solas en un modelo de hemorragia de corte de uñas en conejos inhibidos por FVIII (figura 3A). La dosis con la cantidad más alta de FII fue de 4,4 mg/kg de FII + 275 ng/kg de FXa y se definió como “razón de FEIBA®” y el 100% para ambos de FII y FXa. La segunda dosis de 1,1 mg/kg de FII + 551 ng/kg de FXa tuvo FII reducido al 25% y FXa aumentado al 200%. La tercera dosis de 0,44 mg/kg de FII + 826 ng/kg de FXa tuvo FII reducido al 10% y FXa aumentado al 300%. Se determinó la eficacia para cada tratamiento en cuanto a hemorragia reducida después del tratamiento en comparación con el grupo de control solo con tampón. FEIBA® (75 U/kg) sirvió como control positivo.

A conejos blancos Nueva Zelanda (NZW) conscientes se les administró por vía intravenosa 2 ml/kg de inhibidor de FVIII (17.000 UB/kg) para deplecionar el FVIII endógeno. Después de aproximadamente 20 min, se anestesiaron los animales mediante inyección subcutánea con 5 mg/kg de xilazina y 75 mg/kg de ketamina. Se colocaron los conejos sobre una almohadilla térmica para prevenir la hipotermia, y se afeitó el pelo del dígito II de la extremidad posterior derecha. Se cortó la uña 3 mm desde el borde distal de la matriz de aporte de sangre 45 minutos después de la aplicación de plasma inhibidor. Luego se recogió sangre durante 30 minutos en un tubo con solución salina (temperatura ambiente) sumergiendo la uña sangrante. Después de este primer periodo de observación, se cambiaron los tubos de solución salina para evitar el secado de la herida infligida. Se utilizaron seis conejos NZW machos por grupo. Los animales recibieron tratamiento intravenoso con prueba o elemento de control. Diez minutos después de la aplicación del elemento de prueba o control, se insertó la uña sangrante en un tercer tubo con solución salina y se recogió sangre nuevamente durante 30 minutos. Para cada tubo, se midió la cantidad de sangre de manera gravimétrica. El procedimiento experimental se representa en la figura 3A. Se sacrificaron los conejos al final del segundo periodo de observación inyectando una sobredosis de pentobarbital.

Se resumió la hemorragia dentro de 30 min antes y después de la aplicación del tratamiento mediante el grupo de tratamiento usando medianas, intervalos intercuartiles (IQR), intervalos (de mínimo a máximo), medias aritméticas y coeficientes de variación tal como se representa en la figura 3B. La dosis eficaz de aproximadamente 826 ng/kg de FXa y de aproximadamente 0,44 mg/kg de FII tiene una cantidad de FII reducida del 90% en comparación con la razón FEIBA®. Los resultados demostraron que reducir la cantidad de FII y aumentar ligeramente la de FXa es suficiente para corregir la hemorragia en un modelo animal de hemofilia.

Se trataron previamente los animales con inhibidor del FVIII para lograr hemofilia A transitoria, imitando de cerca la situación en pacientes hemofílicos con inhibidores. Se evaluaron la eficacia de la prueba y el elemento de control usando un modelo de hemorragia de corte de uñas; se realizaron ensayo de tromboelastografía y de CAT para obtener información adicional (véase el ejemplo 3). En el ensayo de hemorragia de corte de uñas, hubo una hemorragia menor de manera estadísticamente significativa con FEIBA® (75 U/kg) que con tampón (p=0,02273) proporcionando evidencia estadística de que el sistema experimental complejo se operó de manera correcta. Desde un punto de vista explorador, el tratamiento con FII (4,38 mg/kg) + FXa (275 ng/kg) y FII (0,44 mg/kg) + FXa (826 ng/kg) mostró una hemorragia menor de manera estadísticamente significativa que con tampón (p≤0,01403). En conclusión, es viable reducir la cantidad de FII en la combinación de FII/FXa de manera drástica aumentando ligeramente la cantidad de FXa sin perder la eficacia hemostática. Esto facilita la producción comercial de FII recombinante para una combinación recombinante de FII/FXa más fácil de manera económica.

Ejemplo 3: análisis *ex vivo* de sangre completa o plasma de conejo mediante ensayo de tromboelastografía y de CAT

Se analizaron muestras de sangre de conejos inhibidos por FVIII después de la administración de FEIBA®, FII o FXa solos o en combinación o tampón *ex vivo* mediante tromboelastografía (TEG). Se realizaron mediciones usando un analizador de hemostasia de TEG 5000 (Haemonetics Corp, EE.UU.) a 37ºC. Se tomaron muestras de sangre antes y 45 min después de la administración de plasma inhibidor del FVIII, inmediatamente después de la administración del elemento de prueba o control, y al final del segundo periodo de observación de hemorragia (aproximadamente 40 minutos después de la administración del elemento de prueba). Se tomaron muestras de sangre puncionando una arteria del oído central usando una jeringa de 2 ml (aguja de calibre 20) llena con 0,1 ml de citrato de sodio y 21 µl de CTI (Haematologic Technologies, 3 mg/ml). Se desangraron los animales mediante punción cardíaca al final del segundo periodo de observación de hemorragia. Se extrajo 1 ml de sangre completa citrada (sangre:citrato = 10:1). Se mezcló cada muestra de sangre (320 µl) con 20 µl de TF (concentración final 0.04 pM), y se volvió a calcificar con 20 µl de una disolución de $CaCl_2$ 0,2 M en una cubeta de TEG calentada previamente a 37ºC. Se inició la medición inmediatamente y se midieron los duplicados en paralelo para cada muestra de sangre. Se detuvo la ejecución de TEG después de obtener todas las mediciones relevantes o se canceló después de 2 h si no se formó un coágulo. Se registraron los parámetros TEG de tiempo de coagulación (tiempo R), velocidad de formación de coágulos (tiempo K), rapidez de fortalecimiento del coágulo (ángulo) y máxima firmeza del coágulo (MA).

El análisis *ex vivo* de sangre completa de conejo mediante TEG (figura 4) 5 min después del tratamiento con 75 U/kg de FEIBA® mostró una reducción estadísticamente significativa en el tiempo R en comparación con el tampón (p<0,001). Lo mismo era cierto para todos los demás grupos de tratamiento (p<0,001). El efecto aún se observó al final del estudio, aproximadamente 40 minutos después de la administración del artículo de prueba, excepto para el grupo de FII solo en el que el tiempo de coagulación volvió al nivel de sangre inhibida por FVIII. En general, el ensayo de TEG parecía ser muy sensible a FXa. Mientras que FXa solo no fue eficaz para la reducción de la hemorragia relativa *in vivo,* las muestras de sangre mostraron tiempos R significativamente reducidos *ex vivo.*

Se analizaron también muestras de plasma de conejo mediante análisis de CAT. La figura 5 muestra perfiles de generación de trombina representativos para un animal de cada grupo de dosificación en los cuatro puntos de tiempo. El grupo dosificado con FII solo no está representado, pero no tuvo efecto sobre la generación de trombina. La administración del control positivo (75 U/ml de FEIBA®) condujo al mayor aumento en la generación de trombina 5 minutos después del tratamiento. El tratamiento combinado de conejos inhibidos por FVIII con FII y FXa humanos derivados de plasma mostró un efecto beneficioso sobre la generación de trombina en plasma de conejo y alcanzó valores de PTE que estaban más cerca de la referencia normal que el control de FEIBA®. Un aumento moderado en la generación de trombina es preferible a la generación masiva de trombina ya que esto puede ser un indicador de actividad trombogénica. La diferencia más obvia entre las diferentes dosis de FII/FXa en el ensayo de CAT son los altos valores de PTE (área bajo la curva) de los perfiles de trombina dependiendo de la concentración de FII. Esto puede explicarse mediante el sustrato adicional en la forma de protrombina que se introduce en la muestra de plasma, que activa rápidamente a trombina por el FXa. Los plasmas de animales dosificados con FII o FXa administrados solos y el tampón no afectaron significativamente a la generación de trombina.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, y así sucesivamente, usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones deben entenderse modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener mediante la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe al menos interpretarse a la luz del número de dígitos significativos informados y aplicando las técnicas de redondeo habituales. A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se informan con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

Los términos “un”, “una”, “el/la” y referentes similares usados en cuanto a la descripción de la invención (especialmente en cuanto a las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario aquí o se contradiga claramente por el contexto. La relación de intervalos de valores en el presente documento solo pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en este documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en este documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o expresiones a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en el presente documento tiene la intención de iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otra manera. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica un elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Las agrupaciones de elementos o realizaciones alternativas de la invención divulgadas en el presente documento no deben interpretarse como limitaciones. Cada miembro del grupo puede ser referido a y reivindicado individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos encontrados en el presente documento. Se anticipa que uno o más miembros de un grupo pueden ser incluidos o eliminados de un grupo por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produce dicha inclusión o eliminación, se considera que la memoria descriptiva contiene el grupo modificado, cumpliendo así la descripción escrita de todos los grupos Markush utilizados en las reivindicaciones adjuntas.

Determinadas realizaciones de esta invención se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, las variaciones en estas realizaciones descritas serán evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. El inventor espera que los expertos empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención se practique de otra manera que la específicamente descrita en el presente documento. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del contenido mencionado en las reivindicaciones adjuntas a éste, según lo permitido por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos se abarca por la invención a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

REIVINDICACIONES

1. Composición para su uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico que comprende protrombina (FII) y factor X activado (FXa) en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es más de 1:20.000.

2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que FII y FXa son derivados de plasma o recombinantes.

3. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el trastorno hemorrágico es hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, hemofilia congénita A con inhibidores o hemofilia adquirida A con autoanticuerpos inhibidores contra FVIII, hemofilia congénita B con inhibidores o hemofilia adquirida B con autoanticuerpos inhibidores contra FIX, hemorragia de un traumatismo, deficiencia de FVII, deficiencia de FV, deficiencia de FX, deficiencia de FXI, deficiencia de FXIII, deficiencia de fibrinógeno, deficiencia de protrombina, coagulopatía por dilución, trombocitopenia, hemorragia de cirugías de alto riesgo, hemorragia cerebral, enfermedad de von Willebrand con inhibidores del factor de von Willebrand, o combinaciones de los mismos.

4. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se administra a través de inyección parenteral, inyección subcutánea, inyección intramuscular o inyección intravenosa.

5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es una composición farmacéutica.

6. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos un excipiente.

7. Composición para su uso según la reivindicación 6, en la que el excipiente se selecciona de un grupo que consiste en agua, NaCl u otras sales para isotonicidad, dextrosa al 5% en agua, disoluciones tamponadas con un pH de 2-8, trehalosa, manitol, sorbitol, tampones de fosfato, tampones de acetato, agentes de tonicidad tales como sales o aminoácidos y tensioactivo monooleato de polioxietilensorbitano (TWEEN 80).

8. Composición para su uso en la ayuda en la reversión de la actividad anticoagulante que comprende protrombina humana (FII) y factor X activado (FXa) en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es más de 1:20.000.

9. Composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 8, en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es más de 1:10.000.

10. Composición para su uso según la reivindicación 9, en la que la razón molar de FXa con respecto a FII es más de 1:2.500.

FIG. 1

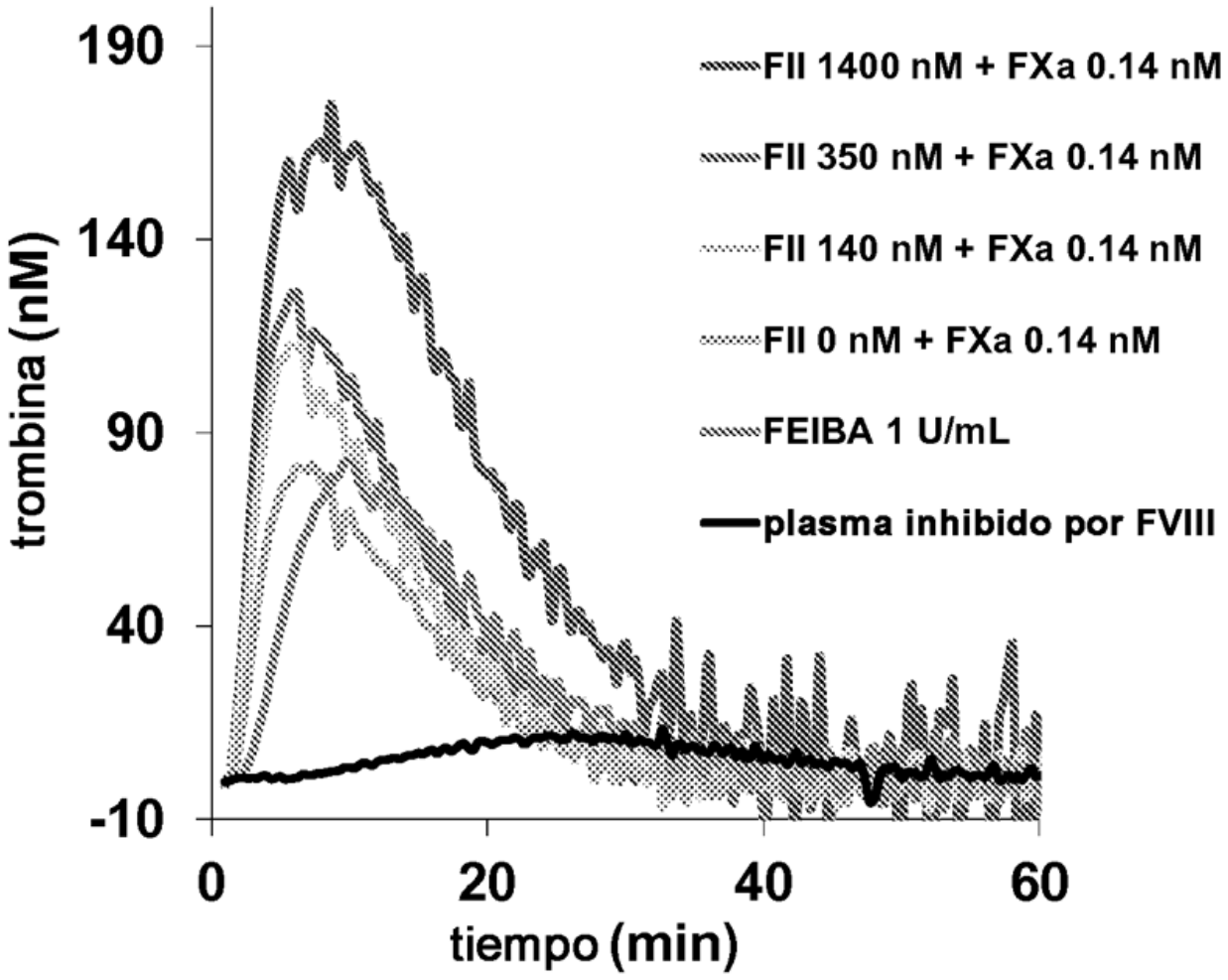

190
140
90
40
-10
trombina (nM)
0
20
40
60
tiempo (min)
FII 1400 nM + FXa 0.14 nM
FII 350 nM + FXa 0.14 nM
FII 140 nM + FXa 0.14 nM
FII 0 nM + FXa 0.14 nM
FEIBA 1 U/mL
plasma inhibido por FVIII

FIG. 2

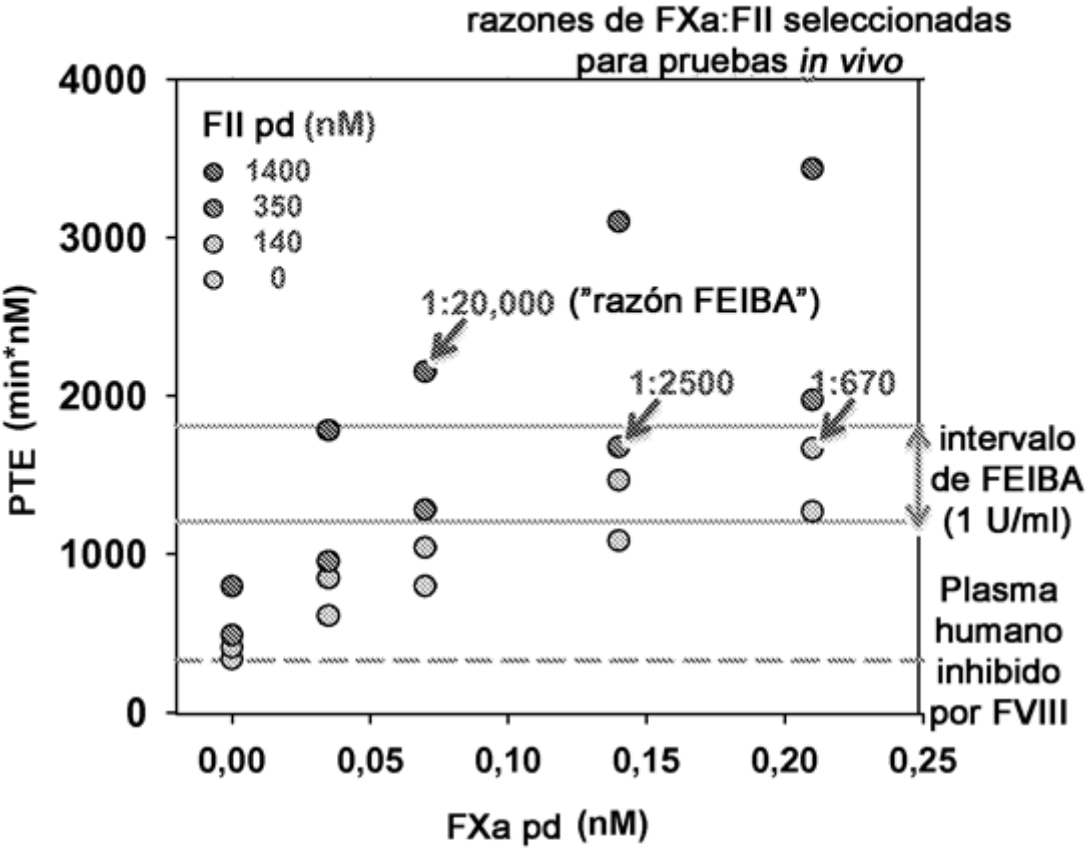

razones de FXa:FII seleccionadas
para pruebas *in vivo*
FII pd (nM)
1400
350
140
0
1:20,000 ("razón FEIBA")
1:2500
1:670
intervalo
de FEIBA
(1 U/ml)
Plasma
humano
inhibido
por FVIII
PTE (min*nM)
4000
3000
2000
1000
0
0,00
0,05
0,10
0,15
0,20
0,25
FXa pd (nM)

FIG. 3A

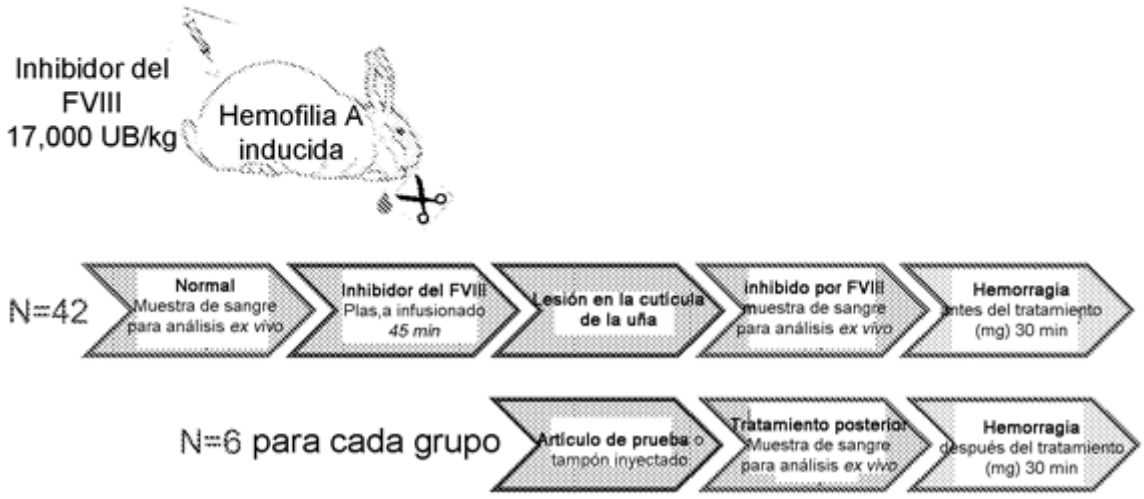

Inhibidor del
FVIII
17,000 UB/kg
Hemofilia A
inducida
N=42
Normal
Muestra de sangre
para análisis *ex vivo*
Inhibidor del FVIII
Plas,a infusionado
45 min
Lesión en la cutícula
de la uña
inhibido por FVIII
muestra de sangre
para análisis *ex vivo*
Hemorragia
ntes del tratamiento
(mg) 30 min
N=6 para cada grupo
Artículo de prueba o
tampón inyectado
Tratamiento posterior
Muestra de sangre
para análisis *ex vivo*
Hemorragia
después del tratamiento
(mg) 30 min

FIG. 3B

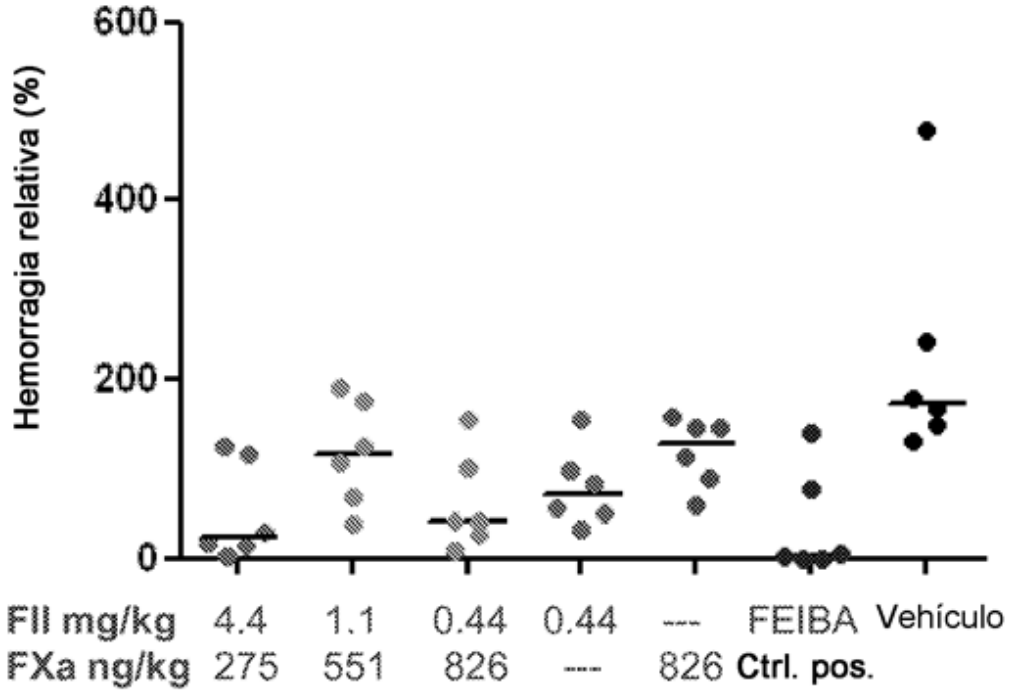

Hemorragia relativa (%)
600
400
200
0
FII mg/kg 4.4 1.1 0.44 0.44 --- FEIBA Vehículo
FXa ng/kg 275 551 826 --- 826 Ctrl. pos.

FIG. 4

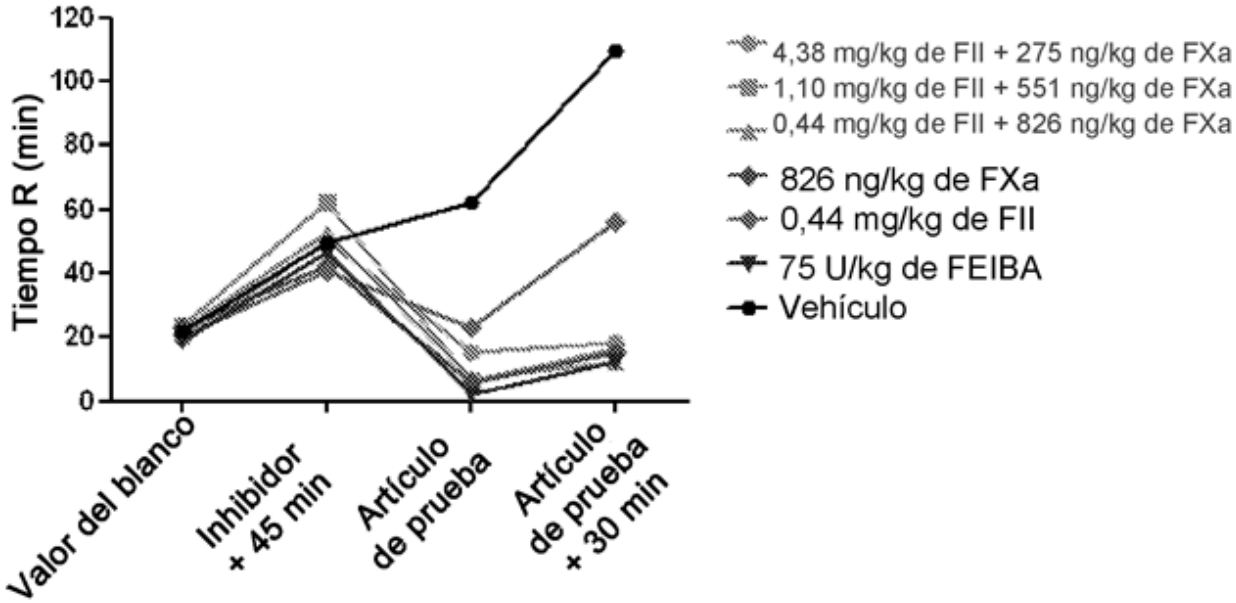
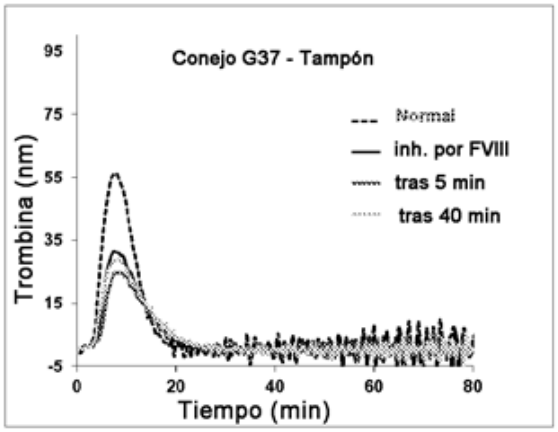
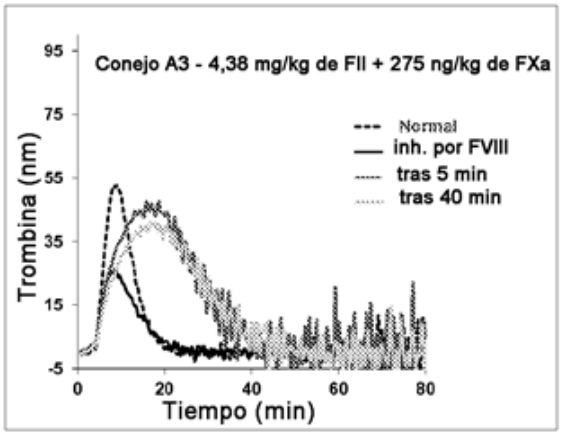
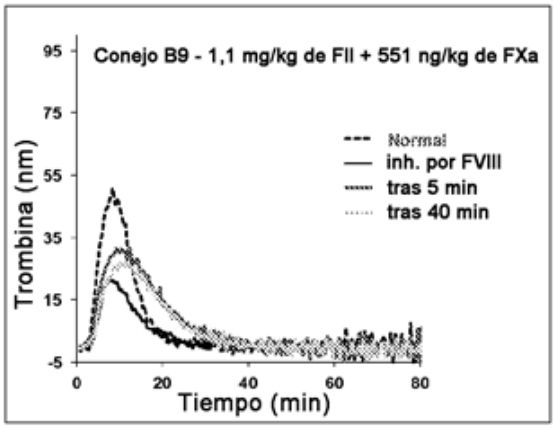
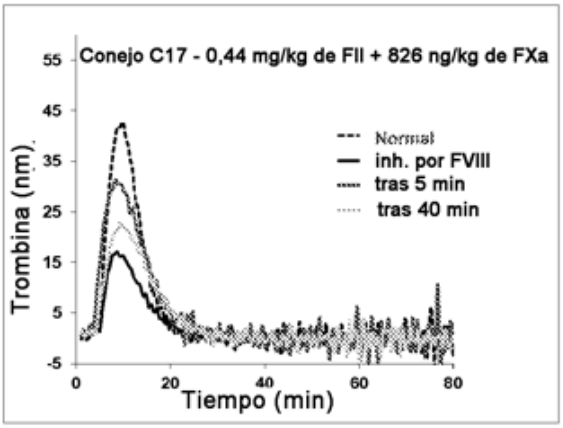

Tiempo R (min)
120
100
80
60
40
20
0
Valor del blanco
Inhibidor + 45 min
Artículo de prueba
Artículo de prueba + 30 min
4,38 mg/kg de FII + 275 ng/kg de FXa
1,10 mg/kg de FII + 551 ng/kg de FXa
0,44 mg/kg de FII + 826 ng/kg de FXa
826 ng/kg de FXa
0,44 mg/kg de FII
75 U/kg de FEIBA
Vehículo

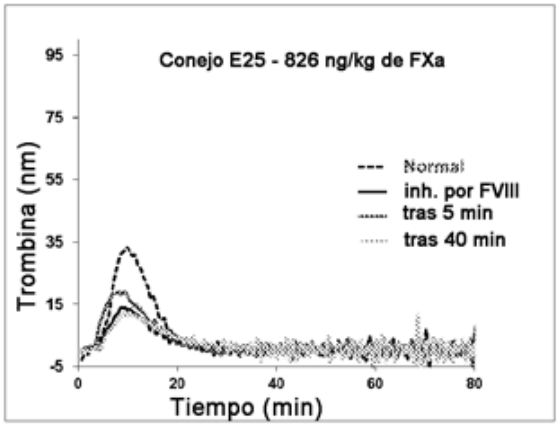
FIG. 5

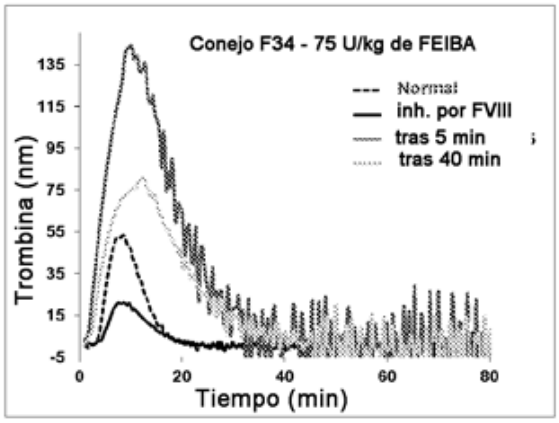

Conejo G37 - Tampón
Normal
inh. por FVIII
tras 5 min
tras 40 min
Trombina (nm)
Tiempo (min)


Conejo A3 - 4,38 mg/kg de FII + 275 ng/kg de FXa
Normal
inh. por FVIII
tras 5 min
tras 40 min
Trombina (nm)
Tiempo (min)


Conejo B9 - 1,1 mg/kg de FII + 551 ng/kg de FXa
Normal
inh. por FVIII
tras 5 min
tras 40 min
Trombina (nm)
Tiempo (min)


Conejo C17 - 0,44 mg/kg de FII + 826 ng/kg de FXa
Normal
inh. por FVIII
tras 5 min
tras 40 min
Trombina (nm)
Tiempo (min)


Conejo E25 - 826 ng/kg de FXa
Normal
inh. por FVIII
tras 5 min
tras 40 min
Trombina (nm)
Tiempo (min)


Conejo F34 - 75 U/kg de FEIBA
Normal
inh. por FVIII
tras 5 min
tras 40 min
Trombina (nm)
Tiempo (min)