(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 761 730**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2014 PCT/IB2014/058494**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14118677**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2014 E 14704915 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2950813**

(54) Título: **Composiciones y procedimientos para contrarrestar la inhibición del factor Xa**

(30) Prioridad:

31.01.2013 US 201361759332 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2020

(73) Titular/es:

PFIZER INC. (50.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US y
THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA (50.0%)

(72) Inventor/es:

CAMIRE, RODNEY;
FRUEBIS, JOACHIM y
PITTMAN, DEBRA D.

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 761 730 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para contrarrestar la inhibición del factor Xa

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N.° 61/759,332, presentada el 31 de enero de 2013.

Referencia al listado de secuencias

El Listado de Secuencias se presenta concurrentemente de conformidad con 37 CFR §1.821 en un formato legible por computadora (CRF) a través de EFS-Web y con nombre de archivo PC072006_SEQLIST_ST25.txt.

Antecedentes de la invención

La anticoagulación farmacológica es la base del tratamiento para pacientes con afecciones protrombóticas. Durante más de cincuenta años, el único anticoagulante oral disponible fue la warfarina, un inhibidor de la vitamina K epóxido reductasa (VKOR) que recicla la vitamina K oxidada. La warfarina tiene muchos inconvenientes, incluida la farmacocinética impredecible que requiere un monitoreo frecuente de los parámetros de coagulación y el ajuste de la dosis. Sin embargo, en caso de hemorragia de emergencia o la necesidad de cirugía urgente, existen antídotos que permiten una reversión rápida y completa.

Los inhibidores orales directos de FXa son anticoagulantes emergentes que tienen el potencial de simplificar los esquemas de dosificación y la monitorización hemostática en pacientes con enfermedades protrombóticas en comparación con los tratamientos estándar, como la warfarina. Aunque estos medicamentos tienen muchas ventajas sobre la warfarina, no hay disponible un agente de reversión completamente eficaz para estos novedosos anticoagulantes.

La falta de una medida correctiva específica a sus efectos, sin embargo, es una necesidad clínica insatisfecha crítica que podría limitar la adopción generalizada de estos agentes debido al temor a una hemorragia inmanejable.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones. Los solicitantes han abordado esta necesidad clínica insatisfecha crítica proporcionando composiciones y procedimientos para contrarrestar los efectos de los inhibidores del Factor X (FXa) activados directamente. La invención es como se establece en las reivindicaciones, en particular la presente invención comprende; una variante del Factor Xa que comprende una sustitución en el aminoácido correspondiente a la posición 235 en la SEQ ID NO: 1 seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en: Thr o Leu, o una composición farmacéutica de los mismos, para su uso en la reducción o prevención de la hemorragia en un sujeto tratado con un inhibidor directo del Factor Xa; opcionalmente en el que el uso efectúa la reversión urgente de la coagulopatía adquirida debido a la terapia de inhibición de FXa en un sujeto con hemorragia grave aguda.

De acuerdo con algunas realizaciones, la invención proporciona una variante del Factor Xa para su uso en la reducción o prevención de hemorragias en un sujeto que está siendo tratado con un inhibidor directo del Factor Xa (FXa) administrando una composición que comprende una variante del Factor Xa que contiene al menos una modificación incluyendo la sustitución del aminoácido de tipo silvestre en la posición 16 (usando el sistema de numeración de quimotripsina) con Thr, Leu, de acuerdo con la divulgación Phe, Asp o Gly, o de acuerdo con la divulgación, la sustitución del aminoácido de tipo silvestre en la posición 17 (usando el sistema de numeración de quimotripsina) con Leu, Ala o Gly. En ciertas realizaciones, de acuerdo con la invención, el uso de una composición que comprende una variante de FXa da como resultado al menos una reducción del 50% en la hemorragia. De acuerdo con ciertas realizaciones, los inhibidores directos del Factor Xa incluyen rivaroxabán o apixabán. En algunas realizaciones de acuerdo con la invención, la concentración plasmática del inhibidor directo de FXa es una cantidad terapéutica típica o una cantidad supraterapéutica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la concentración plasmática de rivaroxabán puede ser de aproximadamente 500 nM, o adicionalmente de acuerdo con la divulgación, y la concentración plasmática de apixabán puede ser de aproximadamente 250 nM, o adicionalmente de acuerdo con la divulgación. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, la variante de FXa contiene la sustitución I16L. En algunas realizaciones, la variante de FXa es capaz de contrarrestar el efecto del inhibidor directo del Factor Xa hasta una concentración plasmática que es al menos 100 veces menor que la concentración plasmática del inhibidor del Factor Xa. En ciertas realizaciones de la invención, la composición que comprende la variante de FXa se administra antes de una cirugía planificada, después de una lesión o después de una sobredosis intencional o accidental con un inhibidor directo de FXa. En algunas divulgaciones, la hemostasia en el sujeto se monitorea usando un ensayo de hemostasia después de una primera dosis con una variante de FXa y, si no se alcanza una hemostasia adecuada en un tiempo predeterminado, se administra al menos una

segunda dosis de la variante de FXa para lograr una hemostasia suficiente. De acuerdo con algunas realizaciones, el tiempo predeterminado es de aproximadamente 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos o 60 minutos después de que se administra la primera dosis de la variante de FXa. Otros tiempos también son posibles. En algunas otras realizaciones de la invención, se administra al menos un segundo procoagulante además de la variante de FXa, que incluye, por ejemplo, una variante de FXa diferente, factor IX, factor XIa, factor XIIa, factor VIII, factor VIIa, FEIBA o concentrado de complejo de protrombina (PCC).

La divulgación proporciona procedimientos para aumentar la cantidad de trombina producida en respuesta a la activación de la vía de coagulación extrínseca o intrínseca en un sujeto que está siendo tratado con un inhibidor directo del Factor Xa (FXa) administrando una composición que comprende una variante del Factor Xa que contiene al menos una modificación que incluye la sustitución del aminoácido de tipo silvestre en la posición 16 (usando el sistema de numeración de quimotripsina) con Thr, Leu, Phe, Asp o Gly, o la sustitución del aminoácido de tipo silvestre en la posición 17 (usando la numeración de quimotripsina sistema) con Leu, Ala o Gly. De acuerdo con ciertas divulgaciones, los inhibidores directos del Factor Xa incluyen rivaroxabán o apixabán. En algunas divulgaciones, la concentración plasmática del inhibidor directo de FXa es una cantidad terapéutica típica o una cantidad supraterapéutica. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, la concentración plasmática de rivaroxabán puede ser de aproximadamente 500 nM o mayor, y la concentración plasmática de apixabán puede ser de aproximadamente 250 nM o mayor. De acuerdo con ciertas realizaciones, la variante de FXa contiene la sustitución I16L. De acuerdo con ciertas divulgaciones, la cantidad de trombina producida aumenta en aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% o más. En algunas divulgaciones, la variante de FXa es capaz de contrarrestar el efecto del inhibidor directo del Factor Xa hasta una concentración plasmática que es al menos 100 veces menor que la concentración plasmática del inhibidor del Factor Xa. En ciertas divulgaciones, la composición que comprende la variante de FXa se administra antes de una cirugía planificada, después de una lesión o después de una sobredosis intencional o accidental con un inhibidor directo de FXa. En algunas divulgaciones, la hemostasia en el sujeto se monitorea usando un ensayo de hemostasia después de una primera dosis con una variante de FXa y, si no se alcanza una hemostasia adecuada en un tiempo predeterminado, se administra al menos una segunda dosis de la variante de FXa para lograr una hemostasia suficiente. De acuerdo con algunas divulgaciones, el tiempo predeterminado es de aproximadamente 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos o 60 minutos después de que se administra la primera dosis de la variante de FXa. Otros tiempos también son posibles. En algunas otras divulgaciones, se administra al menos un segundo procoagulante además de la variante de FXa, que incluye, por ejemplo, una variante de FXa diferente, factor IX, factor XIa, factor XIIa, factor VIII, factor VIIa, FEIBA o concentrado de complejo de protrombina (PCC).

De acuerdo con algunas divulgaciones, la divulgación proporciona procedimientos para disminuir el tiempo de coagulación (medido, por ejemplo, usando PT o INR, o algún otro ensayo) en un sujeto que está siendo tratado con un inhibidor directo del Factor Xa (FXa) administrando un composición que comprende una variante del Factor Xa que contiene al menos una modificación que incluye la sustitución del aminoácido de tipo silvestre en la posición 16 (usando el sistema de numeración de quimotripsina) con Thr, Leu, Phe, Asp o Gly, o la sustitución del aminoácido de tipo silvestre en la posición 17 (usando el sistema de numeración de quimotripsina) con Leu, Ala o Gly. De acuerdo con ciertas divulgaciones, los inhibidores directos del Factor Xa incluyen rivaroxabán o apixabán. En algunas divulgaciones, la concentración plasmática del inhibidor directo de FXa es una cantidad terapéutica típica o una cantidad supraterapéutica. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, la concentración plasmática de rivaroxabán puede ser de aproximadamente 500 nM o mayor, y la concentración plasmática de apixabán puede ser de aproximadamente 250 nM o mayor. De acuerdo con ciertas divulgaciones, la variante de FXa contiene la sustitución I16L. De acuerdo con ciertas divulgaciones, el tiempo de coagulación se reduce en aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más. En algunas divulgaciones, la variante de FXa es capaz de contrarrestar el efecto del inhibidor directo del Factor Xa hasta una concentración plasmática que es al menos 100 veces menor que la concentración plasmática del inhibidor del Factor Xa. En ciertas divulgaciones, la composición que comprende la variante de FXa se administra antes de una cirugía planificada, después de una lesión o después de una sobredosis intencional o accidental con un inhibidor directo de FXa. En algunas divulgaciones, la hemostasia en el sujeto se monitorea usando un ensayo de hemostasia después de una primera dosis con una variante de FXa y, si no se alcanza una hemostasia adecuada en un tiempo predeterminado, se administra al menos una segunda dosis de la variante de FXa para lograr una hemostasia suficiente. De acuerdo con algunas divulgaciones, el tiempo predeterminado es de aproximadamente 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos o 60 minutos después de que se administra la primera dosis de la variante de FXa. Otros tiempos también son posibles. En algunas otras divulgaciones, se administra al menos un segundo procoagulante además de la variante de FXa, que incluye, por ejemplo, una variante de FXa diferente, factor IX, factor XIa, factor XIIa, factor VIII, factor VIIa, FEIBA o concentrado de complejo de protrombina (PCC).

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-B muestran la inhibición de wt-FXa libre o FXa^{I16L} por rivaroxabán. La velocidad inicial de la hidrólisis del sustrato peptidílico (SpecXa; 200 uM) por A) wt-FXa (2 nM) o B) FXa^{I16L} (6 nM) se determinó a concentraciones crecientes de rivaroxabán. El valor K_i se brinda en cada gráfico.

Las Figuras 2A-B muestran la inhibición por rivaroxabán de wt-FXa o FXa^{I16L} ensamblados en protrombinasa. La velocidad inicial de la hidrólisis del sustrato peptidílico (SpecXa; 200 uM) por A) wt-FXa (2 nM) o B) FXa^{I16L} (6 nM) en presencia de PCPS (20 uM) y FVa (40 nM) se determinó a concentraciones crecientes de rivaroxabán.

La Figura 3 muestra el efecto de diferentes concentraciones de FXa^{I16L} al revertir los efectos sobre la generación de trombina de rivaroxabán.

Las Figuras 4A-D muestran el efecto de FXa^{I16L} al revertir los efectos de rivaroxabán. Se incubó plasma humano normal con rivaroxabán 500 nM y en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de FXa^{I16L}. Después del análisis de datos, se trazaron la trombina pico (A y C) y la trombina total generada (ETP; B y D).

Las Figuras 5A-B muestran que FXa^{I16L} revierte los efectos de la dosis alta de rivaroxabán. Se incubó plasma humano normal con rivaroxabán 7,5 uM y en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de FXa^{I16L}. Después del análisis de datos, se trazaron la trombina pico (A) y la trombina total generada (ETP; B).

Las Figuras 6A-B muestran que FXa^{I16L} o FXa^{I16T} revierten los efectos de 250 nM de apixabán. Se incubó plasma humano normal con apixabán 250 nM y en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de FXa^{I16L} o FXa^{I16T}. Después del análisis de datos, se trazaron la trombina pico (A) y la trombina total generada (ETP; B).

Las Figuras 7A-B muestran que FXa^{I16L} o FXa^{I16T} revierten los efectos de la dosis alta de apixabán. El plasma humano normal se incubó con Apixabán 2,0 uM y en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de FXa^{I16L} o FXa^{I16T}. Después del análisis de datos, se trazaron la trombina pico (A) y la trombina total generada (ETP; B).

Las Figuras 8A-B muestran que FXa^{I16L} corrige la coagulación de la sangre total en presencia de rivaroxabán. La tromboelastografía de sangre total se utilizó para evaluar la capacidad de FXa^{I16L} para revertir los efectos de rivaroxabán en una dosis típica (A) y alta (B).

Las Figuras 9A-B muestran que FXa^{I16L} corrige la coagulación de sangre total en presencia de apixabán. La tromboelastografía de sangre total se utilizó para evaluar la capacidad de FXa^{I16L} para revertir los efectos de apixabán a una dosis típica (A) y alta (B).

Las Figuras 10A-B muestran que FXa^{I16L} contrarresta rivaroxabán en un ensayo de generación de trombina. La Figura 10A muestra una respuesta a la dosis de rivaroxabán y la Figura 10B muestra una respuesta a la dosis de FXa^{I16L} en presencia de rivaroxabán.

La Figura 11 muestra que FXa^{I16L} contrarresta rivaroxabán en un modelo de hemorragia de clip de cola de ratón.

La Figura 12 demuestra que el rivaroxabán administrado a ratones retrasa el tiempo de coagulación de la sangre total medido usando ROTEM y que la administración con FXa^{I16L} responde a la dosis en respuesta al efecto del rivaroxabán.

La Figura 13 muestra que el rivaroxabán administrado a un ratón previene la formación de coágulos en un sitio de lesión vascular en el músculo cremáster causado por láser y que la administración con FXa^{I16L} contrarresta el efecto del rivaroxabán. La formación de coágulos se visualizó usando microscopía intravital y anticuerpos marcados con fluorescencia contra fibrina y plaquetas. La Figura 13A muestra la formación de coágulos en un ratón no tratado. La Figura 13B muestra que el rivaroxabán retrasó y redujo la acumulación de plaquetas y evitó la deposición de fibrina. Por el contrario, la Figura 13C muestra que en un ratón administrado se produjo la formación de coágulos de rivaroxabán y FXa^{I16L} en el sitio de la lesión.

La Figura 14 es la secuencia de aminoácidos de la preproteína del Factor X humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). La péptido señal corresponde a los aminoácidos 1-23. El propéptido corresponde a los aminoácidos 24-40. La cadena ligera madura del Factor X activado (FXa) corresponde a los aminoácidos 41-179. La cadena pesada madura de FXa activado (después de la eliminación del péptido de activación) corresponde a los aminoácidos 235-488. El péptido de activación (AP) corresponde a los aminoácidos 183-234.

La Figura 15 es la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la preproteína del Factor X humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2). La secuencia de codificación corresponde a los nucleótidos 58 a 1524.

Descripción detallada

La divulgación proporciona composiciones y procedimientos para contrarrestar el efecto anticoagulante de un

inhibidor directo de FXa en un sujeto que lo necesita. Los solicitantes han descubierto que ciertas variantes de FXa contrarrestan rápida y completamente el efecto de un inhibidor directo de FXa de una manera dependiente de la dosis. Más específicamente, los solicitantes han descubierto que una cantidad relativamente pequeña de una variante de FXa restaura la actividad de coagulación normal *in vivo* en presencia de inhibidor FXa a concentraciones terapéuticas e incluso a concentraciones supraterapéuticas. Al proporcionar antídotos rápidos y efectivos para los efectos anticoagulantes de los inhibidores directos de FXa, la divulgación de los solicitantes contribuye a cumplir la promesa de estos anticoagulantes ventajosos.

El factor de coagulación X (FX) es un zimógeno que, tras la activación por el factor intrínseco IX/factor VIII o la vía extrínseca (factor tisular/factor VIIa), se convierte en FXa, que es el resto proteasa de la protrombinasa. Después de la escisión proteolítica del enlace escindible Arg-Ile, liberando un péptido de activación (AP), una serie de cambios estructurales bien definidos en el zimógeno conduce el procedimiento de activación a la serina proteasa activa madura (consulte Toso et al., (2008) J Biol. Chem. 283, 18627-18635; Bunce et al., (2011) Blood 117, 290-298; e Ivanciu et al., (2011) Nat. Biotechnol. 29, 1028-1033, incorporados por referencia en la presente memoria descriptiva en su totalidad). El FXa maduro tiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene el dominio catalítico. El FXa maduro se convierte en una serina proteasa activa tras la formación del complejo de protrombinasa, que incluye la unión de un cofactor activado, Factor Va (FVa).

Se han desarrollado formas variantes de FX que tras la escisión de activación producen una variante de FXa similar a zimógeno. Es decir, una vez escindida, la variante de FXa resultante tiene una función de sitio activa deficiente y es más resistente a la inactivación por inhibidores circulantes (es decir, antitrombina III y TFPI). Las variantes de FXa, por lo tanto, tienen vidas medias más largas en plasma que FXa de tipo silvestre. La variante de FXa se une a FVa, membrana lipídica y calcio para formar un complejo de protrombinasa completamente activo que activa de manera eficiente la protrombina.

Las variantes similares a zimógeno de FXa circulan en la conformación similar a zimógeno y no parecen ser trombogénicas (consulte Toso et al., (2008) J. Biol. Chem. 283, 18627-18635 e Ivanciu et al., (2011) Nat. Biotechnol. 29, 1028-1033, incorporados por referencia en la presente memoria descriptiva en su totalidad). Ejemplos de tales variantes de FXa se describen en la publicación de patente internacional WO2007/059513, incorporada por referencia en la presente en su totalidad.

Las enzimas de la coagulación son enzimas similares a la tripsina que pertenecen a la familia de proteasas peptidasa S1 que tienen un pliegue similar a la quimotripsina. Las proteasas de coagulación contienen dominios catalíticos que son altamente homólogos entre sí y con las proteasas de serina ancestrales de la digestión. La homología/identidad estructural es tan grande (> 70%) que los residuos en los dominios catalíticos de las enzimas de coagulación (incluido el Factor Xa) se numeran de acuerdo con los residuos correspondientes en quimotripsinógeno. (Sistema de numeración de quimotripsina; consulte Bajaj y Birktoft, Methods Enzymol. 1993; 222:96-128, Tabla 2, y Bode W, Mayr I, Bauman Y, et al. La estructura cristalina refinada de 1,9 Å de la alfa-trombina humana: interacción con D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona y la importancia del segmento de inserción Tyr-Pro-Trp. EMBO J 1989; 8 (11): 3467-3475, los cuales se incorporan por referencia en la presente memoria descriptiva en su totalidad). Por consiguiente, los aminoácidos se pueden referir aquí de conformidad con el sistema de numeración de quimotripsina, que es bien conocido por los expertos en la materia.

De acuerdo con la divulgación, una variante de FXa puede ser una proteína FXa que comprende una sustitución de aminoácidos que hace que la variante sea más parecida al zimógeno en comparación con una proteína FXa de tipo silvestre *in vivo* o *in vitro*. Las variantes de FXa de la divulgación recuperan sustancialmente la actividad de FXa de tipo silvestre tras la formación de protrombinasa. Ejemplos de variantes de FXa que son útiles en los usos de la invención son variantes que comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en: a) Ile en la posición 16 es Thr, Leu, de acuerdo con la divulgación Phe, Asp o Gly y b) Val en la posición 17 es Leu, Ala o Gly, de conformidad con el sistema de numeración de quimotripsina. Los aminoácidos 16 y 17 en el sistema de numeración de quimotripsina se producen en los aminoácidos 235 y 236, respectivamente, de la SEQ ID NO: 1 (preproproteína del Factor X humano). En ciertas realizaciones de la invención, las variantes de FXa son FXa^{I16L} y FXa^{I16T} (la nomenclatura utilizada aquí para las variantes de FXa recita el aminoácido original en la posición numerada de acuerdo con el sistema de numeración de quimotripsina seguido por el aminoácido sustituido). Las variantes de FXa pueden ser variantes de cualquier FXa de mamífero. Sin embargo, son de particular interés las variantes de FXa de FXa humano.

En ciertas divulgaciones, la variante de FX que se activa en una variante de FXa de la divulgación puede modificarse adicionalmente insertando un sitio de escisión proteolítica intracelular no nativo. En un ejemplo no limitante, para expresar variantes de FXa similares a zimógeno "activadas" en células de mamífero, se puede insertar un sitio de escisión proteolítica intracelular no nativa entre Arg en la posición 234 de la SEQ ID NO: 1 (posición 15 en la quimotripsina sistema de numeración) y el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 235 de la SEQ ID NO: 1 (posición 16 en el sistema de numeración de quimotripsina) en la variante de FX de zimógeno. En ciertas divulgaciones, el sitio de escisión de la proteasa intracelular no nativa es Arg-Lys-Arg o Arg-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg (SEQ ID NO: 3). Estos sitios de escisión son reconocidos eficientemente por las

proteasas (enzimas similares a la furina/PACE) dentro de la célula y se eliminan. Esta escisión puede dar como resultado una variante procesada de FXa en la que la cadena pesada madura de la molécula ahora comienza en el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 235 de la SEQ ID NO: 1 (posición 16 en el sistema de numeración de quimotripsina). La introducción de este sitio de escisión en dicha posición permite la conversión intracelular de FX a FXa.

En ciertas divulgaciones, la secuencia de aminoácidos completa del péptido de activación de variante de FX (AP) (es decir, los aminoácidos 183-234 de la SEQ ID NO: 1) se reemplaza con un sitio de escisión de proteasa intracelular no nativo. De acuerdo con ciertas divulgaciones, el sitio de escisión de proteasa intracelular no nativo es Arg-Lys-Arg o Arg-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg (SEQ ID NO: 3). Como se explicó anteriormente, esta modificación permite la escisión intracelular de la variante de FX expresada por las células. La escisión intracelular convierte la variante de FX en una variante de FXa de tipo zimógeno activado que luego es secretada por las células para su posterior purificación. Este enfoque evita la necesidad de una escisión extracelular que, de otro modo, sería necesaria para activar el factor de coagulación variante, por ejemplo, después de aislar la proteína o justo antes de la coagulación de la sangre.

En ciertas divulgaciones, las variantes de FXa de la divulgación se derivan de preproteínas variantes de FX que comprenden una secuencia de señal humana de tipo silvestre nativa y/o una secuencia de propéptido. En otras divulgaciones, las secuencias de señal FX y/o el propéptido de especies no humanas se pueden usar en lugar de las secuencias de aminoácidos nativas correspondientes. Y en otras divulgaciones, la secuencia señal y/o la secuencia de propéptido de otras proteínas secretadas humanas o no humanas se pueden usar en lugar de las secuencias de aminoácidos nativas correspondientes.

En una realización ejemplar de la invención, una variante de FXa comprende los aminoácidos 41-179 y los aminoácidos 235-488 de la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 235 (isoleucina en la secuencia de tipo silvestre) se sustituye con un aminoácido diferente seleccionado, de acuerdo con la invención, del grupo que consiste en treonina (Thr), leucina (Leu), de acuerdo con la divulgación, fenilalanina (Phe), ácido aspártico (Asp) o glicina (Gly). Estas sustituciones pueden escribirse respectivamente utilizando la nomenclatura I235T, I235L, I235F, I235D e I235G, en la que la primera letra es el código de letra única para isoleucina y la última letra es el código de letra única para el aminoácido que se sustituye en la secuencia de tipo silvestre. Debido a que la posición 235 de la SEQ ID NO: 1 es equivalente a la posición 16 en el sistema de numeración de quimotripsina, se pueden escribir las mismas sustituciones I16T, I16L, I16F, I16D e I16G. En una realización de la invención, una variante de FXa comprende los aminoácidos 41-179 y los aminoácidos 235-488 de la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 235 está sustituido con Thr (es decir, I235T o I16T). En una realización de la invención, una variante de FXa comprende los aminoácidos 41-179 y los aminoácidos 235-488 de la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 235 está sustituido con Leu (es decir, I235L o I16L). En una divulgación, una variante de FXa comprende los aminoácidos 41-179 y los aminoácidos 235-488 de la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 235 está sustituido con Phe (es decir, I235F o I16F). En una divulgación, una variante de FXa comprende los aminoácidos 41-179 y los aminoácidos 235-488 de la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 235 está sustituido con Asp (es decir, I235D o I16D). En una divulgación, una variante de FXa comprende los aminoácidos 41-179 y los aminoácidos 235-488 de la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 235 está sustituido con Gly (es decir, I235G o I16G).

De acuerdo con otra divulgación ejemplar, una variante de FXa comprende los aminoácidos 41-179 y los aminoácidos 235-488 de la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 236 (valina en la secuencia de tipo silvestre) está sustituido con un aminoácido diferente seleccionado del grupo que consiste en leucina (Leu), alanina (Ala) o glicina (Gly). Estas sustituciones pueden escribirse respectivamente usando la nomenclatura V236L, V236A y V236G, en la que la primera letra es el código de letra única para valina y la última letra es el código de letra única para el aminoácido que se sustituye en la secuencia de tipo silvestre. Debido a que la posición 236 de la SEQ ID NO: 1 es equivalente a la posición 17 en el sistema de numeración de quimotripsina, se pueden escribir las mismas sustituciones V17L, V17A y V17G. En una divulgación, una variante de FXa comprende los aminoácidos 41-179 y los aminoácidos 235-488 de la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 236 está sustituido con Leu (es decir, V236L o V17L). En una divulgación, una variante de FXa comprende los aminoácidos 41-179 y los aminoácidos 235-488 de la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 236 está sustituido con Ala (es decir, V236A o V17A). En una divulgación, una variante de FXa comprende los aminoácidos 41-179 y los aminoácidos 235-488 de la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 236 está sustituido con Gly (es decir, V236G o V17G).

En otras divulgaciones, las variantes de FXa de la divulgación, incluidas las variantes específicas descritas en los párrafos anteriores, pueden incluir diversas isoformas de la cadena pesada ligera y/o madura de la proteína. Las isoformas ejemplares no limitantes de la cadena pesada madura variante de FXa incluyen las versiones alfa y beta de la cadena pesada madura. Jesty et al., J Biol Chem. 25 de junio de 1975; 250(12):4497-504, incorporado por referencia en la presente memoria. Las composiciones de la divulgación pueden incluir proteínas variantes de FXa en las que están representadas una u otra o ambas isoformas de cadena pesada madura alfa y beta.

De acuerdo con otras divulgaciones adicionales, las isoformas de las proteínas variantes de FXa, incluidas las variantes específicas descritas en los párrafos anteriores, pueden incluir isoformas en las que un número variable de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más aminoácidos) faltan o se agregan al extremo terminal carboxi de la cadena ligera y/o las cadenas pesadas maduras de la proteína.

De acuerdo con ciertas divulgaciones, las variantes de FXa de la divulgación incluyen proteínas con un cierto grado mínimo de homología o identidad de secuencia en comparación con la secuencia de aminoácidos de FXa de tipo silvestre en la SEQ ID NO: 1. De este modo, por ejemplo, las variantes de FXa incluyen proteínas que contienen una cadena ligera y una cadena pesada madura que tienen al menos una secuencia homóloga o idéntica al 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% con las cadenas ligera y pesada madura de FXa de tipo silvestre en la SEQ ID NO: 1, en la que tales variantes de FXa también incluyen una sustitución en la posición de aminoácidos correspondiente a la posición 235 de la SEQ ID NO: 1 con Thr, Leu, Phe, Asp, o Gly, o una sustitución en la posición de aminoácidos correspondiente a la posición 236 de la SEQ ID NO: 1 con Leu, Ala o Gly, y además en el que dichas variantes de FXa son zimogénicas hasta que se incorporan al complejo de protrombinasa. En la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la secuencia de cadena ligera FXa de tipo silvestre corresponde a los aminoácidos 41 a 179 y la secuencia de cadena pesada madura de FXa de tipo silvestre corresponde a los aminoácidos 235 a 488. El porcentaje de homología de secuencia de aminoácidos o la identidad se puede determinar fácilmente utilizando un software como Protein BLAST disponible en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

De acuerdo con otras divulgaciones no limitantes, las variantes de FXa de la divulgación también pueden incluir variantes de FXa que contienen una o más modificaciones postraduccionales que incluyen, sin limitación, uno o más grupos de carbohidratos unidos a O o N o un número variable de residuos de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla). Las variantes de FXa de la divulgación pueden incluir además proteínas variantes de FXa modificadas químicamente. También son posibles otras variantes de FXa útiles en los procedimientos de la divulgación.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término FXa^{I16x} se refiere a una variante del Factor X activado en el que el aminoácido correspondiente a la posición 235 en la SEQ ID NO: 1 (correspondiente a la posición 16 en el sistema de numeración de quimotripsina) se cambia del aminoácido en la secuencia de tipo silvestre (isoleucina) a un aminoácido diferente denominado "x". En algunas divulgaciones ejemplares no limitantes, el aminoácido "x" puede ser treonina (Thr o T), leucina (Leu o L), fenilalanina (Phe o F), ácido aspártico (Asp o D) o glicina (Gly o G).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término FXa^{V17y} se refiere a una variante del Factor X activado en el que el aminoácido correspondiente a la posición 236 en la SEQ ID NO: 1 (correspondiente a la posición 17 en el sistema de numeración de quimotripsina) se cambia del aminoácido en la secuencia de tipo silvestre (valina) a un aminoácido diferente denominado "y". En algunas divulgaciones ejemplares no limitantes, el aminoácido "y" puede ser leucina (Leu o L), alanina (Ala o A) o glicina (Gly o G).

Los términos FXa^{I16x} y FXa^{V17y} no están limitados por la secuencia de proteínas establecida en la SEQ ID NO: 1. Más bien, estos términos incluyen adicionalmente la variedad de isoformas y proteínas homólogas descritas en la presente memoria descriptiva con las mutaciones de sustitución especificadas en las posiciones 16 o 17 en el sistema de numeración de quimotripsina que se comportan como zimógenos hasta que se incorporan al complejo de protrombinasa.

Se puede producir una variante de FXa de la divulgación por cualquier técnica para expresar una proteína.

Una "proteína aislada", "polipéptido aislado" o "variante aislada" es una proteína, polipéptido o variante que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociada con componentes asociados naturalmente que la acompañan en su estado nativo, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) es expresado por una célula de una especie diferente o (4) no ocurre en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente será "aislado" de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína también puede volverse sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente por aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

Una proteína o polipéptido es "sustancialmente puro", "sustancialmente homogéneo" o "sustancialmente purificado" cuando al menos aproximadamente 60 a 75% de una muestra exhibe una sola especie de polipéptido. El polipéptido o proteína puede ser monomérico o multimérico. Un polipéptido o proteína sustancialmente puro comprenderá usualmente aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80% o 90% p/p de una muestra de proteína, más usualmente aproximadamente 95%, y puede tener una pureza superior al 99%. La pureza u homogeneidad de las proteínas puede indicarse por varios medios bien conocidos en la técnica, tales como la electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de la visualización de una única banda de polipéptidos al teñir el gel con una tinción bien conocida en la técnica. Para ciertos fines, se puede proporcionar una resolución más alta usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica para la purificación.

Los procedimientos de la divulgación son útiles para contrarrestar un inhibidor directo de FXa. Un inhibidor directo de FXa es un inhibidor que se une directamente a FXa y se une selectivamente a FXa sobre otras proteasas. Los inhibidores directos de FXa son inhibidores no competitivos de FXa con respecto a la protrombina. Se unen a la hendidura de unión al sustrato e inhiben FXa de forma competitiva con respecto a sustratos peptídicos pequeños que también se unen a esta región. Inhiben FXa con alta afinidad picomolar y están altamente unidos a proteínas en plasma. Ejemplos de inhibidores directos de FXa son rivaroxabán, apixabán, betrixabán, darexabán, edoxabán y otamixabán. En ciertas divulgaciones, los inhibidores directos de FXa se seleccionan de rivaroxabán y apixabán.

De acuerdo con la divulgación, se puede usar una variante de FXa para contrarrestar un inhibidor directo de FXa que se une a FXa o que se une a FXa que ha formado protrombinasa. Los inhibidores directos de FXa pueden o no requerir cofactores de FXa para la inhibición. De acuerdo con los procedimientos de la divulgación, una variante de FXa, como FXa^{I16L} y FXa^{I16T}, se administra a un sujeto cuya sangre contiene un inhibidor directo de FXa.

La divulgación abarca el uso de una variante de FXa para contrarrestar los inhibidores directos de FXa, que incluyen, pero no se limitan a inhibidores sintéticos, inhibidores de molécula pequeña, inhibidores disponibles por vía oral o inhibidores reversibles. El inhibidor de FXa puede ser cualquier combinación de estas características, como un inhibidor de molécula pequeña reversible, sintético, disponible por vía oral. En ciertas realizaciones de la invención, los inhibidores directos de FXa pueden seleccionarse de rivaroxabán, apixabán o, como se describe, betrixabán, darexabán, edoxabán y otamixabán (consulte Perzborn et al., Nat Rev Drug Discov. 2011 enero; 10(1):61-75; Turpie, Arterioscler Thromb Vasc Biol.2007 Jun; 27(6):1238-47; Pinto et al., Expert Opin. Ther. Patents 22:645-661 (2012); Pinto, et al., J Med. Chem. 50:5339-5356 (2007)). En ciertas realizaciones de la invención, los inhibidores directos de FXa se seleccionan de rivaroxabán o apixabán.

En algunas realizaciones, se puede administrar una variante de FXa de la divulgación a un sujeto para revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa, en la que dicho inhibidor se produce a concentraciones terapéuticas. En otras realizaciones de la invención, se puede administrar una variante de FXa de acuerdo con la invención a un sujeto para revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa cuando dicho inhibidor se produce a concentraciones supraterapéuticas. Una concentración supraterapéutica es una que es más alta que la que normalmente se considera necesaria para lograr de forma segura la anticoagulación en un sujeto o clase de sujetos en particular. Las concentraciones supraterapéuticas de un inhibidor directo de FXa pueden ser el resultado de una sobredosis accidental o intencional. Las concentraciones supraterapéuticas de un inhibidor directo de FXa también pueden ser el resultado de efectos inesperados en sujetos particulares, como una sensibilidad inesperadamente alta a estos medicamentos, o una tasa de eliminación inesperadamente lenta, debido a, por ejemplo, interacciones farmacológicas u otros factores. La determinación de lo que sería una concentración terapéutica o una concentración supraterapéutica del inhibidor directo de FXa en un sujeto particular o clase de sujetos está dentro del conocimiento de los expertos en la materia.

De acuerdo con la divulgación, se usa una variante de FXa para contrarrestar un inhibidor directo de FXa o inhibidores que se unen selectivamente a FXa sobre otras proteasas similares a la tripsina en al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 1.000 veces, al menos 5.000 veces o al menos 10.000 veces.

El inhibidor directo de FXa puede unirse a una variante de FXa con un K_i de aproximadamente 2×10^{-7} M o menos. "K_i" se refiere a la constante de inhibición de una interacción particular inhibidor-diana, que es la concentración requerida para producir la mitad de la inhibición máxima. Se puede determinar el K_i utilizando procedimientos conocidos en la técnica. La descripción contempla, por lo tanto, contrarrestar un inhibidor directo de FXa que se une a una variante de FXa libre del complejo de protrombinasa con un K_i de aproximadamente 2×10^{-8} M o menos, aproximadamente 1×10^{-8} M o menos, aproximadamente 9×10^{-9} M o menos, aproximadamente 8×10^{-9} M o menos, aproximadamente 7×10^{-9} M o menos, aproximadamente 6×10^{-9} M o menos, aproximadamente 5×10^{-9} M o menos, aproximadamente 4×10^{-9} M o menos, aproximadamente 3×10^{-9} M o menos, aproximadamente 2×10^{-9} M o menos, aproximadamente 1×10^{-9} M o menos, aproximadamente 9×10^{-10} M o menos, aproximadamente 8×10^{-10} M o menos, aproximadamente 7×10^{-10} M o menos, aproximadamente 6×10^{-10} M o menos, aproximadamente 5×10^{-10} M o menos, aproximadamente 4×10^{-10} M o menos, aproximadamente 3×10^{-10} M o menos, aproximadamente 2×10^{-10} M o menos, aproximadamente 1×10^{-10} M o menos, aproximadamente 9×10^{-11} M o menos, aproximadamente 8×10^{-11} M o menos, aproximadamente 7×10^{-11} M o menos, aproximadamente 6×10^{-11} M o menos, aproximadamente 5×10^{-11} M o menos, aproximadamente 4×10^{-11} M o menos, aproximadamente 3×10^{-11} M o menos, aproximadamente 2×10^{-11} M o menos, aproximadamente 1×10^{-11} M o menos, aproximadamente 9×10^{-12} M o menos, aproximadamente 8×10^{-12} M o menos, aproximadamente 7×10^{-12} M o menos, aproximadamente 6×10^{-12} M o menos, aproximadamente 5×10^{-12} M o menos, aproximadamente 4×10^{-12} M o menos, aproximadamente 3×10^{-12} M o menos, aproximadamente 2×10^{-12} M o menos, o aproximadamente 1×10^{-12} M o menos, o menos. El inhibidor directo de FXa para ser contrarrestado por una variante de FXa de acuerdo con los procedimientos de la divulgación puede unirse a un FXa de tipo silvestre con un K_i de al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos

6 veces, al menos 7 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, o al menos 50 veces menos de lo que une la variante de FXa. El inhibidor directo de FXa puede unirse a un FXa de tipo silvestre con una K_i de al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% menos que el K_i con una variante de FXa libre del complejo de protrombinasa. El inhibidor directo de FXa puede unirse a un complejo de protrombinasa que comprende un FXa de tipo silvestre con aproximadamente el mismo K_i que se une a un complejo de protrombinasa que comprende una variante de FXa.

En un aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para contrarrestar los efectos de un inhibidor directo de FXa en un sujeto que está sangrando (interna o externamente) o está en riesgo de hemorragia (por ejemplo, en el curso de una cirugía planificada) administrando una variante de FXa. En algunas divulgaciones, el inhibidor directo de FXa puede estar presente en el sujeto a una concentración terapéutica o concentraciones más altas (es decir, una concentración supraterapéutica). En algunas divulgaciones, la concentración terapéutica puede ser una sobredosis en personas sensibles. Los procedimientos de la divulgación, por lo tanto, son útiles para proporcionar un antídoto contra una sobredosis de un inhibidor directo de FXa. En diversas divulgaciones, el sujeto de tratamiento puede ser un sujeto humano o veterinario.

La sobredosis de inhibidor directo puede detectarse basándose en la existencia de síntomas o signos de capacidad de coagulación excesivamente reducida. Ejemplos no limitantes incluyen evidencia de hemorragia gastrointestinal, incluyendo heces oscuras alquitranadas, heces con sangre y vómitos de sangre. Otros ejemplos incluyen hemorragias nasales y una mayor tendencia a, o severidad de, hematomas o hemorragia por cortes menores y rasguños.

En un entorno clínico, la sobredosis de inhibidor directo puede detectarse directamente o midiendo la capacidad de coagulación de la sangre del sujeto y detectando desviaciones del grado esperado de anticoagulación. El potencial de coagulación de la sangre se puede medir de formas familiares para los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede sospechar una sobredosis cuando el tiempo de protrombina de un sujeto se prolonga excesivamente. En ciertas realizaciones, la sobredosis se confirma cuando se mide el tiempo de protrombina expresado como una Relación Normalizada Internacional (INR) mayor que aproximadamente 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o mayor.

La variante de FXa se puede administrar siempre que se desee contrarrestar los efectos del inhibidor directo de FXa, incluyendo, entre otros, antes de una cirugía planificada, después de una lesión que resulta en hemorragia externa o interna o después de una sobredosis de inhibidor directo de FXa. De acuerdo con la divulgación, la variante de FXa se puede administrar al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 3 horas, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 10 minutos, o al menos aproximadamente 5 minutos de cuando se necesita el efecto deseado de contrarrestar, como antes de una cirugía planificada, después de una lesión que resulta en una hemorragia externa o interna o después de una sobredosis de inhibidor directo de FXa.

De acuerdo con otra realización, la invención proporciona una variante de FXa para su uso de acuerdo con la invención para efectuar la reversión urgente de la coagulopatía adquirida debido a la terapia de inhibición de FXa en un sujeto con hemorragia grave aguda. En algunas divulgaciones, los sujetos son pacientes humanos adultos. En otras divulgaciones, los sujetos son pacientes pediátricos humanos.

En algunas realizaciones, la hemorragia grave aguda es causada por un trauma. En otras realizaciones, la hemorragia grave aguda ocurre durante la cirugía o como se describe otro tipo de procedimiento de intervención. Los procedimientos de intervención no limitativos divulgados ejemplares incluyen incisiones, drenaje, cirugía vascular, apendicectomía, herniotomía o hernioplastia, cirugía abdominal, colecistectomía, trepanación (preforación craneal), punción lumbar, inserción de marcapasos cardíacos, cirugía de fractura de cadera y otros. En otras divulgaciones, la hemorragia grave aguda puede ser una hemorragia espontánea sin causa aparente.

Sin limitación, los sitios de hemorragia grave aguda incluyen hemorragia gastrointestinal, hemorragia subcutánea o intramuscular, hemorragia de vejiga, hemartrosis, hematoma subdural, hemorragia nasal, hemorragia peritoneal, hemorragia uterina y otros sitios de hemorragia.

El tratamiento eficaz con variantes de FXa de la divulgación puede revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa. La reversión exitosa de tales efectos por una variante de FXa se puede determinar de varias maneras y medirse o monitorearse usando diferentes ensayos, procedimientos o criterios de valoración.

En algunas divulgaciones, el tratamiento con una variante de FXa para revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa se controla usando pruebas o ensayos realizados en sangre o plasma de un sujeto tratado con la variante de FXa. Se puede tomar una muestra de sangre de un sujeto en un momento predeterminado después del tratamiento con la variante de FXa. La sangre, o el plasma preparado a partir de esta, se somete a una o más

pruebas para determinar si ciertos parámetros farmacodinámicos hemostáticos se han normalizado a pesar de la presencia del inhibidor directo de FXa. Si se encuentra la normalización, entonces el sujeto no necesita ser tratado con la variante de FXa. Sin embargo, si no se encuentra la normalización, entonces puede ser necesario un tratamiento adicional con la variante de FXa de acuerdo con los procedimientos de la divulgación para revertir el efecto de un inhibidor directo de FXa. Las pruebas para monitorear la eficacia del tratamiento con una variante de FXa incluyen pruebas que miden directa o indirectamente la capacidad de coagulación o que miden la actividad de un inhibidor directo de FXa. Las pruebas ejemplares no limitantes incluyen el tiempo de protrombina o la Relación Normalizada Internacional relacionada, el ensayo de tiempo de coagulación inducido por protrombinasa, tromboelastometría, tromboelastografía, ensayo cromogénico anti-FXa, ensayo de generación de trombina, nivel de fragmento de protrombina 1 + 2, nivel del complejo de trombina-antitrombina III, tiempo de tromboplastina parcial activada y tiempo de tromboplastina parcial. También son posibles otras pruebas dentro del conocimiento de los expertos en la materia.

De acuerdo con algunas divulgaciones, revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa en un sujeto mediante la administración de una variante de FXa reduce la hemorragia en el sujeto. En algunas realizaciones de la invención, la variante de FXa para uso de acuerdo con la invención reduce la hemorragia en un sujeto al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 99% en presencia de un inhibidor directo de FXa en comparación con la ausencia de tratamiento con la variante de FXa. En otras realizaciones de la invención, la variante de FXa para uso de acuerdo con la invención reduce la hemorragia en un sujeto aproximadamente 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70% -75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95% o 95%-100%.

De acuerdo con algunas divulgaciones, revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa en un sujeto mediante la administración de una variante de FXa reduce la actividad de un inhibidor directo de FXa en el sujeto. En algunas divulgaciones, el tratamiento con la variante de FXa reduce la actividad del inhibidor directo de FXa en un sujeto al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 99% en presencia de un inhibidor directo de FXa en comparación con la ausencia de tratamiento con la variante de FXa. En otras divulgaciones, el tratamiento con la variante de FXa reduce la actividad de un inhibidor directo de FXa en un sujeto aproximadamente 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95% o 95%-100%.

La actividad de un inhibidor directo de FXa se puede controlar usando un ensayo cromogénico anti-FXa, como el descrito en Asmis, et al., Thromb Res., 129: 492-498 (2012), o Barrett, et al., Thromb Haemost. 104: 1263-71 (2010), cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia.

De acuerdo con algunas divulgaciones, revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa en un sujeto mediante la administración de una variante de FXa aumenta la cantidad de trombina producida en la sangre o el plasma del sujeto. En algunas divulgaciones, el tratamiento con la variante de FXa aumenta la producción de trombina en un sujeto al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, al menos 50 veces o más en presencia de un inhibidor directo de FXa en comparación con la ausencia de una variante de FXa. La producción de trombina en la sangre o el plasma de un sujeto se puede determinar usando el ensayo de generación de trombina (TGA) u otra técnica familiar para los expertos en la materia.

De acuerdo con algunas divulgaciones, revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa en un sujeto mediante la administración de una variante de FXa aumenta la coagulación en el sujeto. En algunas divulgaciones, el tratamiento con la variante de FXa aumenta la coagulación en un sujeto al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, al menos 50 veces, o más en presencia de un inhibidor directo de FXa en comparación con la ausencia de una variante de FXa.

De acuerdo con algunas divulgaciones, revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa en un sujeto mediante la administración de una variante de FXa reduce el tiempo de coagulación en el sujeto. En algunas divulgaciones, el tratamiento con la variante de FXa reduce el tiempo de coagulación en un sujeto al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% en la presencia de un inhibidor directo de FXa en comparación con la ausencia de tratamiento con la variante de FXa. En otras divulgaciones, el tratamiento con la variante de FXa reduce el tiempo de coagulación en un sujeto aproximadamente 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, 75% -80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95% o 95%-100%.

De acuerdo con algunas divulgaciones, el tiempo de coagulación se determina midiendo el tiempo de protrombina (PT) del sujeto que disminuye a medida que se restablece la hemostasia. El PT es la cantidad de tiempo que tarda el suero en coagularse después de la adición del factor tisular. Por lo tanto, el PT mide la capacidad del sistema de coagulación extrínseca para soportar la coagulación. El PT puede variar según los reactivos particulares que utiliza un laboratorio para realizar la prueba, pero un PT normal es de aproximadamente 11 a 13 segundos. El

tiempo de coagulación también se puede expresar utilizando la Relación Normalizada Internacional (INR), que elimina la variabilidad de laboratorio a laboratorio en las mediciones del tiempo de coagulación. Usando la INR, una relación de 0,8 a 1,1 indica coagulación normal. PT o INR se pueden determinar en un momento predeterminado después de que se administra una variante de FXa a un sujeto que necesita revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa.

En algunas divulgaciones, el tratamiento con una variante de FXa para revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa reduce el PT de un sujeto a aproximadamente 25 segundos, 24 segundos, 23 segundos, 22 segundos, 21 segundos, 20 segundos, 19 segundos, 18 segundos, 17 segundos, 16 segundos, 15 segundos, 14 segundos, 13 segundos, 12 segundos, 11 segundos, 10 segundos o menos. En otras divulgaciones, el tratamiento con una variante de FXa reduce el INR o un sujeto a aproximadamente 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7 o menos. De acuerdo con otras divulgaciones, el tratamiento con la variante de FXa reduce el TP o INR en un sujeto aproximadamente 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30% - 35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95% o 95%-100%.

El tiempo de protrombina se puede medir a una velocidad predeterminada después de la administración de una variante de FXa. Por lo tanto, en algunas divulgaciones no limitantes, el PT se mide 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 45 minutos, 50 minutos, 60 minutos o más después de la administración de FXa. Otros tiempos también son posibles de acuerdo con el conocimiento de los expertos en la materia.

El tiempo de coagulación también se puede medir usando el ensayo de tiempo de coagulación inducido por protrombinasa (PiCT) en un solo paso como se describe en Graff, et al., Monitoring effects of direct FXa-inhibitors with a new one-step prothrombinase-induced clotting time (PiCT) assay: comparative in vitro investigation with heparin, enoxaparin, fondaparinux and DX 9065a (Monitoreo de los efectos de los inhibidores directos de FXa con un nuevo tiempo de coagulación inducido por protrombinasa (PiCT) en un solo paso: investigación comparativa *in vitro* con heparina, enoxaparina, fondaparinux y DX 9065a), Int J Clin Pharmacol Ther., 45:237-43 (2007) y Harder, et al., Monitoring direct FXa-inhibitors and fondaparinux by Prothrombinase-induced Clotting Time (PiCT): relation to FXa-activity and influence of assay modifications (Monitoreo de inhibidores directos de FXa y fondaparinux por tiempo de coagulación inducido por protrombinasa (PiCT): relación con la actividad FXa e influencia de las modificaciones del ensayo), Thromb Res., 123: 396-403 (2008), cada uno de los cuales se incorpora por referencia en la presente.

En otras divulgaciones, los procedimientos de tromboelastometría o tromboelastografía se pueden usar para analizar la formación de coágulos o el tiempo de coagulación.

De acuerdo con algunas divulgaciones, revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa en un sujeto mediante la administración de una variante de FXa aumenta el nivel de fragmento de protrombina 1 + 2 (PF1 + 2) en la sangre o el plasma del sujeto. En algunas divulgaciones, el tratamiento con la variante de FXa aumenta PF1 + 2 en un sujeto al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, al menos 50 veces o más en presencia de un inhibidor directo de FXa en comparación con la ausencia de una variante de FXa.

De acuerdo con algunas divulgaciones, revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa en un sujeto mediante la administración de una variante de FXa aumenta el nivel del complejo de trombina-antitrombina III (TAT) en la sangre o plasma del sujeto. En algunas divulgaciones, el tratamiento con la variante de FXa aumenta la TAT en un sujeto al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, al menos 50- veces o más en presencia de un inhibidor directo de FXa en comparación con la ausencia de una variante de FXa.

De acuerdo con algunas divulgaciones, revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa en un sujeto mediante la administración de una variante de FXa reduce el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) en el sujeto. En algunas divulgaciones, el tratamiento con la variante de FXa reduce el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) en un sujeto al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 99% en presencia de un inhibidor directo de FXa en comparación con la ausencia de tratamiento con la variante de FXa. En otras divulgaciones, el tratamiento con la variante de FXa reduce el aPTT en un sujeto aproximadamente 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95% o 95%-100%.

De acuerdo con algunas divulgaciones, revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa en un sujeto mediante la administración de una variante de FXa reduce el tiempo parcial de tromboplastina (PTT) en el sujeto. En algunas divulgaciones, el tratamiento con la variante de FXa reduce el tiempo parcial de tromboplastina (PTT) en un sujeto al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 99% en presencia de un inhibidor directo de FXa en comparación con la ausencia de tratamiento con la variante de FXa. En otras divulgaciones, el tratamiento

con la variante de FXa reduce el PTT en un sujeto aproximadamente 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95% o 95%-100%.

En otras divulgaciones, se puede confiar en los criterios de valoración clínicos para determinar si la hemostasia se ha restaurado adecuadamente en un sujeto tratado con una variante de FXa para revertir los efectos de un inhibidor directo de FXa. Por ejemplo, cuando un sujeto se presenta con hemorragia aguda, la eficacia hemostática clínica se puede calificar como "muy buena" cuando se produce la interrupción inmediata de la hemorragia existente después del tratamiento con la variante de FXa; "satisfactorio" cuando hay un retraso de 1-2 horas en la interrupción de la hemorragia; "cuestionable" cuando hay un retraso mayor a 2 horas en la interrupción de la hemorragia; y "ninguno" cuando no existe un efecto sobre la hemorragia. Cuando se determina que el tratamiento con la variante de FXa es menos que satisfactorio, se puede administrar una dosis adicional de la variante de FXa para lograr una hemostasia adecuada. En otro ejemplo, cuando un sujeto se somete a un procedimiento de intervención, la eficacia clínica hemostática se puede calificar como "muy buena" cuando se alcanza la hemostasia normal durante el procedimiento; "satisfactorio" cuando la hemostasia intraprocedural es levemente anormal según se juzga por la cantidad o calidad de la pérdida de sangre (por ejemplo, supuración leve); "cuestionable" cuando la hemostasia intraprocedural es moderadamente anormal según se juzga por la cantidad o calidad de la pérdida de sangre (por ejemplo, hemorragia controlable); y "ninguno" cuando la hemostasia intraprocedural es severamente anormal según se juzga por la cantidad o calidad de la pérdida de sangre (por ejemplo, hemorragia refractaria severa).

Una dosis terapéuticamente eficaz de un inhibidor directo de FXa depende de numerosos factores que son bien conocidos por un médico experto en la materia. Una concentración plasmática terapéutica típica de rivaroxabán es de aproximadamente 500 nM. Sin embargo, de acuerdo con la invención, se puede administrar una variante de FXa para su uso de acuerdo con la invención para contrarrestar concentraciones más bajas o más altas de inhibidor. La concentración plasmática de rivaroxabán en un sujeto a tratar con una variante de FXa puede ser menor o mayor que la concentración terapéutica típica, por ejemplo, de acuerdo con la invención, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 300 nM, aproximadamente 400 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 600 nM, aproximadamente 700 nM, de acuerdo con la divulgación, aproximadamente 800 nM, aproximadamente 900 nM o aproximadamente 1.000 nM.

Una concentración plasmática terapéutica típica de apixabán es de aproximadamente 250 nM. En ciertas realizaciones, la variante de FXa para uso de acuerdo con la invención se administra a un sujeto con una concentración plasmática de apixabán de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 300 nM, aproximadamente 400 nM, de acuerdo con la divulgación de aproximadamente 500 nM, aproximadamente 600 nM, aproximadamente 700 nM, aproximadamente 800 nM, aproximadamente 900 nM o aproximadamente 1.000 nM.

Del mismo modo, de acuerdo con la divulgación, se puede usar una variante de FXa para contrarrestar un inhibidor directo de FXa en casos de sobredosis, como cuando la concentración plasmática del inhibidor es al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99% o al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, a al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, o al menos 50 veces más que la concentración plasmática terapéutica típica.

Las variantes de FXa son sorprendentemente efectivas para contrarrestar un inhibidor directo de FXa hasta una concentración plasmática que es inferior a la concentración plasmática del inhibidor directo de FXa. De acuerdo con la divulgación, la variante de FXa contrarresta el efecto de un inhibidor directo de FXa en una relación de concentración plasmática de variante a inhibidor de aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 1 a 25, aproximadamente 1 a 50, aproximadamente 1 a 100, aproximadamente 1 a 250, aproximadamente 1 a 500, aproximadamente 1 a 1.000, aproximadamente 1 a 2.500, aproximadamente 1 a 5.000 o aproximadamente 1 a 10.000. En ciertas realizaciones, la variante de FXa para uso de acuerdo con la invención contrarresta el efecto de un inhibidor directo de FXa hasta una concentración plasmática de al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 250 veces, al menos 500 veces, al menos 1.000 veces, al menos 2.500 veces, al menos 5.000 veces o al menos 10.000 veces menos que la concentración plasmática del inhibidor directo de FXa.

En otras realizaciones de la invención, la concentración plasmática de una variante de FXa suficiente para revertir el efecto de un inhibidor directo de FXa se calcula multiplicando la concentración plasmática del inhibidor directo por un factor de conversión que varía de aproximadamente $0,1 \times 10^{-4}$ a aproximadamente 1000×10^{-4}, de acuerdo con la divulgación de aproximadamente 4×10^{-4} a aproximadamente 40×10^{-4}, aproximadamente 20×10^{-4} a aproximadamente 200×10^{-4} u otros intervalos. En otras divulgaciones, el factor de conversión puede ser aproximadamente $0,1 \times 10^{-4}$, $0,5 \times 10^{-4}$, 1×10^{-4}, 2×10^{-4}, 3×10^{-4}, 4×10^{-4}, 5×10^{-4}, 6×10^{-4}, 7×10^{-4}, 8×10^{-4}, 9×10^{-4}, 10×10^{-4}, 11×10^{-4}, 12×10^{-4}, 13×10^{-4}, 14×10^{-4}, 15×10^{-4}, 16×10^{-4}, 17×10^{-4}, 18×10^{-4}, 19×10^{-4}, 20×10^{-4}, 21×10^{-4}, 22×10^{-4}, 23×10^{-4}, 24×10^{-4}, 25×10^{-4}, 26×10^{-4}, 27×10^{-4}, 28×10^{-4}, 29×10^{-4}, 30×10^{-4}, $31 \times$

10^{-4}, 32 × 10^{-4}, 33 × 10^{-4}, 34 × 10^{-4}, 35 × 10^{-4}, 36 × 10^{-4}, 37 × 10^{-4}, 38 × 10^{-4}, 39 × 10^{-4}, 40 × 10^{-4}, 45 × 10^{-4}, 50 × 10^{-4}, 55 × 10^{-4}, 60 × 10^{-4}, 65 × 10^{-4}, 70 × 10^{-4}, 75 × 10^{-4}, 80 × 10^{-4}, 85 × 10^{-4}, 90 × 10^{-4}, 95 × 10^{-4}, 100 × 10^{-4}, 110 × 10^{-4}, 120 × 10^{-4}, 130 × 10^{-4}, 140 × 10^{-4}, 150 × 10^{-4}, 160 × 10^{-4}, 170 × 10^{-4}, 180 × 10^{-4}, 190 × 10^{-4}, 200 × 10^{-4}, 250 × 10^{-4}, 300 × 10^{-4}, 350 × 10^{-4}, 400 × 10^{-4}, 450 × 10^{-4}, 500 × 10^{-4}, 550 × 10^{-4}, 600 × 10^{-4}, 650 × 10^{-4}, 700 × 10^{-4}, 750 × 10^{-4}, 800 × 10^{-4}, 850 × 10^{-4}, 900 × 10^{-4}, 950 × 10^{-4} o 1000 × 10^{-4}, y puede variar entre estos números. La concentración en plasma del inhibidor directo de FXa se puede medir de acuerdo con el conocimiento del experto en la materia, por ejemplo, por radioinmunoensayo (RIA) u otro procedimiento.

El logro de una concentración plasmática objetivo de la variante de FXa suficiente para revertir la sobredosis de un inhibidor directo de FXa está dentro del conocimiento de los expertos en la materia. En un ejemplo no limitativo, las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos relevantes, como el volumen plasmático del sujeto u otros parámetros, se pueden hacer en función del género, la altura y el peso del sujeto, u otros factores, y se pueden usar para calcular la cantidad de FXa que se debe administrar para lograr la concentración objetivo. Después de administrar la variante de FXa, las concentraciones plasmáticas se pueden controlar de acuerdo con el conocimiento de los expertos en la materia y esta información se utiliza para mantener la concentración en cualquier intervalo deseado.

Las composiciones y procedimientos de la divulgación incluyen una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de una variante de FXa. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la variante de FXa puede variar de acuerdo con factores como el estado de la enfermedad, la edad, el género y el peso del individuo, y la capacidad de la variante de FXa para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos compensan los efectos tóxicos o perjudiciales de la variante de FXa. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Por ejemplo, se puede administrar una dosis antes de una cirugía planificada.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de unidad de dosificación de la divulgación están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas de la variante de FXa y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se logrará, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de preparación de composiciones, tal como una variante de FXa para el tratamiento de individuos.

En ciertas realizaciones de la invención, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una variante de FXa administrada es de aproximadamente 0,0001 a 50 mg/kg, de aproximadamente 0,001 a 50 mg/kg, de aproximadamente 0,001 a 5 mg/kg, de aproximadamente 0,001 a 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,001 a 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg o aproximadamente 0,01 a 0,5 mg/kg.

En ciertas realizaciones de la invención, una concentración sérica terapéutica o profilácticamente eficaz de una variante de FXa de la divulgación es aproximadamente 0,0003 a 300 nM, aproximadamente 0,003 a 300 nM, aproximadamente 0,03 a 300 nM, aproximadamente 0,003 a 30 nM, aproximadamente 0,03 a 30 nM o aproximadamente 0,3 a 3 nM. La concentración de la variante de FXa, por ejemplo, en sangre o plasma, puede medirse por cualquier procedimiento conocido en la técnica.

Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con la concentración de inhibidor de FXa. Debe entenderse además que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en la presente memoria descriptiva son simplemente ejemplares y no están destinados a limitar el ámbito o la práctica de la composición reivindicada.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona kits que comprenden una variante de FXa o una composición que comprende dicha variante de FXa. Un kit puede incluir, además de la variante o composición FXa, agentes diagnósticos o terapéuticos adicionales. Un kit también puede incluir instrucciones de uso en un procedimiento terapéutico, así como material de empaque como, entre otros, hielo, hielo seco, espuma de poliestireno, espuma, plástico, celofán, plástico retráctil, plástico de burbujas, cartón y maní de almidón. En una realización, el kit incluye la variante de FXa o una composición que lo comprende y uno o más agentes terapéuticos que se pueden usar en

un procedimiento descrito en la presente memoria.

De acuerdo con la invención, la variante de FXa se puede administrar, por ejemplo, en una composición que la comprende, una o varias veces a un sujeto hasta que se restablezca la hemostasia adecuada o el inhibidor o inhibidores directos de FXa ya no sean eficaces. De acuerdo con la divulgación en la que se usan administraciones múltiples, pueden administrarse cada hora, diariamente o en cualquier otro intervalo apropiado, incluyendo por ejemplo dosis diarias múltiples. Se pueden administrar dosis múltiples en un esquema de dosificación tal como cada 10 minutos, cada 15 minutos, cada 20 minutos, cada 30 minutos, cada hora, cada dos horas, cada tres horas, cada cuatro horas, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días y una vez a la semana. La variante de FXa también se puede administrar de forma continua, por ejemplo, a través de una minibomba. La variante de FXa se puede administrar, por ejemplo, a través de una vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular). La variante de FXa generalmente se administrará como parte de una composición farmacéutica como se describe a continuación.

En otra realización de la invención, la variante de FXa puede coadministrarse con otro procoagulante que incluye otra variante de FXa, Factor IX, Factor XIa, Factor XIIa, Factor VIII, Factor VIIa, FEIBA y concentrado de complejo de protrombina (PCC).

La administración conjunta de una variante de FXa de la divulgación con un agente terapéutico adicional (terapia de combinación) abarca administrar una composición farmacéutica que comprende la variante de FXa y el agente terapéutico adicional, así como administrar dos o más composiciones farmacéuticas separadas, es decir, una que comprende la variante de FXa y otra que comprende los agentes terapéuticos adicionales. La administración conjunta o terapia combinada incluye además administrar la variante de FXa y el(los) agente(s) terapéutico(s) adicional(es) simultáneamente o secuencialmente, o ambas. Por ejemplo, la variante de FXa se puede administrar una vez cada tres días, mientras que el agente terapéutico adicional se administra una vez al día al mismo tiempo que la variante de FXa, o en un momento diferente. Se puede administrar una variante de FXa antes o después del tratamiento con el agente terapéutico adicional. De manera similar, la administración de una variante de FXa de la divulgación puede ser parte de un régimen de tratamiento que incluye otras modalidades de tratamiento, incluida la cirugía. La terapia combinada se puede administrar para prevenir la recurrencia de la afección. La terapia combinada se puede administrar de varias veces cada hora a la semana. Las administraciones pueden estar en un esquema de dosifiación tal como cada 10 minutos, cada 15 minutos, cada 20 minutos, cada 30 minutos, cada hora, cada dos horas, cada tres horas, cada cuatro horas, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez a la semana, o puede administrarse de forma continua, por ejemplo, a través de una minibomba. La terapia de combinación se puede administrar, por ejemplo, a través de una vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular).

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende una variante de FXa para su uso de acuerdo con la invención para contrarrestar un inhibidor directo de FXa en un sujeto. La composición puede comprender un portador, vehículo u otros ingredientes farmacéuticamente aceptables que sean fisiológicamente compatibles. Ejemplos no limitativos de tales portadores, vehículos y otros ingredientes incluyen solventes (por ejemplo, agua, etanol, solución salina, solución salina tamponada con fosfato), detergentes, tensioactivos, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos o antifúngicos, agentes isotonificantes, agentes retardantes de absorción, azúcares (por ejemplo, sacarosa, dextrosa, lactosa), polialcoholes (por ejemplo, glicerol, manitol, sorbitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio), agentes humectantes, agentes emulsionantes, conservantes, tampones y agentes capaces de mejorar la estabilidad o efectividad de la variante de FXa.

Una composición para su uso de acuerdo con la divulgación puede estar en cualquier forma adecuada para la administración a un sujeto, tal como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles). Las composiciones se pueden proporcionar en un formato premezclado listo para la administración a un sujeto, por ejemplo, en un vial o jeringa precargada. Dichos formatos no requieren reconstitución con diluyente antes de la administración. Alternativamente, las composiciones se pueden proporcionar en forma liofilizada que requiere reconstitución con diluyente (por ejemplo, agua estéril o solución salina) antes de la administración. Si ocurre lo anterior, se puede proporcionar diluyente con el liofilizado en un recipiente separado. De acuerdo con el conocimiento de los expertos en la materia, las composiciones pueden formularse para almacenamiento bajo refrigeración o a temperatura ambiente. La forma de la composición depende, al menos en parte, del modo de administración previsto. En ciertas divulgaciones, el modo de administración es parenteral, incluido, por ejemplo, la administración intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular.

Las composiciones terapéuticas usualmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, en liposomas u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando la variante de FXa en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso

de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada previamente estéril del mismo. La fluidez adecuada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

La presente divulgación contempla además que cualquiera de las composiciones de la presente memoria puede administrarse a un sujeto que está siendo tratado con un inhibidor directo de FXa.

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria descriptiva únicamente tienen fines ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos serán evidentes para los expertos en la materia y deben incluirse dentro de, y pueden realizarse sin apartarse de, el verdadero ámbito de la divulgación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Sensibilidad de FXa^{I16L} hacia rivaroxabán

Para probar la sensibilidad de FXa^{I16L} hacia rivaroxabán, se establecieron ensayos de inhibición. El rivaroxabán fue un inhibidor eficaz de FXa de tipo silvestre que exhibía una constante de inhibición (K_i) de 0,582 nM (**Figura 1A**). Debido a la naturaleza similar a zimógeno de FXa^{I16L}, el rivaroxabán unido con una afinidad reducida de -15 veces a esta variante (K_i = 9,3 nM) (**Figura 1B**). En contraste, cuando la variante se ensambló en el complejo de protrombinasa (es decir, después de la adición de FVa y vesículas de fosfolípidos), el K_i para rivaroxabán casi se restableció a un valor comparable al de la enzima de tipo silvestre (wt FXa, K_i = 2,67 nM (**Figura 2A**); FXa^{I16L}, K_i = 3,4 nM (**Figura 2B**).

Ejemplo 2: Variantes de FXa contrarrestan Rivaroxabán y Apixabán

El ensayo de generación de trombina (TGA) se usó para evaluar si las variantes de FXa similares a zimógeno pueden revertir los efectos de los inhibidores directos de FXa en un entorno más fisiológico. El TGA mide la producción de trombina en plasma a lo largo del tiempo después del inicio de la coagulación y se realizó como se describió previamente (consulte Bunce et al., (2011) Blood 117, 290-298, incorporado por referencia en la presente memoria descriptiva en su totalidad). La generación de trombina en plasma humano normal se midió durante 90 minutos a 37 °C en presencia o ausencia de rivaroxabán 500 nM. Para evaluar si FXa^{I16L} puede revertir el efecto de rivaroxabán, se agregaron cantidades crecientes de FXa^{I16L} al plasma que contenía rivaroxabán 500 nM. La generación de trombina se inició con factor tisular 2,0 pM/fosfolípido 4 uM, así como con $CaCl_2$ y un sustrato fluorógeno de trombina.

Los datos demostraron que el perfil de generación de trombina del plasma en presencia de rivaroxabán 500 nM se redujo sustancialmente en comparación con el plasma en ausencia de rivaroxabán. En contraste, las concentraciones crecientes de FXa^{I16L} de 0,03 a 1 nM restauraron la generación de trombina (**Figura 3**). Estos datos muestran que concentraciones inesperadamente bajas de FXa^{I16L} en el intervalo nanomolar y subnanomolar pueden revertir los efectos del inhibidor. El análisis de respuesta a la dosis de FXa^{I16L} en presencia de rivaroxabán 500 nM (una concentración plasmática terapéutica típica) muestra que la altura máxima de la generación de trombina (**Figura 4A y C**) y la trombina total producida (ETP) (**Figura 4 B y D**) esencialmente alcanzó un máximo y se restableció completamente a niveles normales entre 1-3 nM de FXa^{I16L} en estas condiciones. Experimentos adicionales mostraron que incluso en presencia de una alta concentración de rivaroxabán (7,5 μM; supraterapéutico), FXa^{I16L} todavía era bastante efectivo a una dosis relativamente baja (≤ 3,0 nM) para restaurar la trombina pico (**Figura 5A**), así como la trombina total generada (**Figura 5B**).

Se realizaron también experimentos similares para evaluar si las variantes de FXa de tipo zimógeno podrían revertir los efectos de otro inhibidor directo de FXa: el apixabán. En estos experimentos, también se comparó la eficacia de FXa^{I16L} con otra variante de FXa similar al zimógeno, FXa^{I16T}. FXa^{I16T} es similar a FXa^{I16L}, sin embargo, tiene una actividad intrínsecamente menor, tiene una vida media plasmática más larga y tiene una actividad reducida de 3-5 veces en comparación con FXa^{I16L} cuando se ensambla en el complejo de protrombinasa. De acuerdo con los datos de rivaroxabán, FXa^{I16L} podría restaurar la trombina máxima (**Figura 6A**) y la trombina total (**Figura 6B**) generada en presencia de apixabán 250 nM (una concentración plasmática terapéutica típica) de una manera dependiente de la dosis, que parece alcanzar un máximo entre 1-3 nM de FXa^{I16L}. FXa^{I16T} también fue eficaz para revertir los efectos de apixabán; sin embargo, parece que se necesitan concentraciones más altas de esta variante para restaurar completamente la generación de trombina (**Figura 6**). Ambas variantes seguían siendo eficaces incluso en presencia de una mayor concentración de apixabán (2 μM). Sin embargo, en estas condiciones, parece que se necesitan concentraciones más altas de ambas variantes para restaurar completamente la generación de trombina (**Figura 7A** y B).

Ejemplo 3: FXa^{I16L} contrarresta rivaroxabán y apixabán en sangre total

Se usó tromboelastometría de sangre total para evaluar la capacidad de la variante de FXa^{I16L} para revertir los efectos de los inhibidores directos de FXa en sangre total. En este sistema, se extrae sangre de voluntarios sanos. Los primeros 2 ml de sangre se descartaron y los 5 ml posteriores de sangre se recogieron en un aspirador (BD, Franklin Lakes, NJ). El inhibidor de tripsina de maíz y el citrato de sodio se encontraban en el tubo de recolección, antes de la recolección de la muestra de sangre, para lograr una concentración final de citrato de 0,105 M y un inhibidor de tripsina de maíz de 25 µg/ml (Haematologic Technologies, Burlington, VT) en la sangre. Se analizaron dos conjuntos de reacciones para cada donante. La reacción inicial se inició 5 minutos después de la recolección de sangre. La segunda reacción inició 1 hora después del inicio de la primera reacción (1 hora 5 minutos después de la recolección).

La sangre se analizó usando Tromboelastometría ROTEM®delta (Tem International GmbH, Munich, Alemania). Para la reacción: (1) 6 µl de vehículo, proteína y/o inhibidor se agregaron a la copa vacía, (2) 20 µl de $CaCl_2$ 0,2 M (concentración final 11,6 mM) y (3) 20 µl de Innovin (concentración final en la reacción 1:10.000; fuente de factor tisular) se añadieron a la copa. La sangre total recogida como se describió anteriormente se añadió a la reacción (300 µl) y se permitió que los registros continuaran durante aproximadamente 30-60 minutos. Los datos recopilados se analizaron utilizando el software del fabricante (Rotem Gamma Software Versión 1.1.1).

Se examinó la capacidad de FXa^{I16L} para acelerar la formación de coágulos de sangre total en presencia de rivaroxabán o apixabán usando tromboelastometría rotacional (ROTEM). Tanto los inhibidores directos de FXa solos como a dos concentraciones diferentes tienen un efecto sustancial sobre la formación de coágulos de sangre total: a dosis bajas (concentraciones terapéuticas), la formación de coágulos de sangre total se elimina parcialmente (**Figura 8A** y **Figura 9A**), mientras que a dosis altas (concentraciones supraterapéuticas), la formación de coágulos de sangre total se elimina casi por completo (**Figura 8B** y **Figura 9B**). El FXa^{I16L} podría revertir los efectos de rivaroxabán o apixabán sobre la formación de coágulos de sangre total. En presencia de rivaroxabán 500 nM o apixabán 250 nM, FXa^{I16L} 0,3 nM podría restaurar total o casi completamente la coagulación de la sangre total (**Figura 8A** y **Figura 9A**). Cuando se usaron concentraciones más altas de los inhibidores directos de FXa (~2 uM), la coagulación de la sangre total restaurada parcialmente FXa^{I16L} 0,3 nM y la FXa^{I16L} 3 nM restauraron completamente (**Figura 8B** y **Figura 9B**). Estos datos demostraron que una variante similar al zimógeno FXa puede revertir eficazmente el efecto anticoagulante de rivaroxabán o apixabán en ensayos de coagulación de sangre total y basados en plasma a concentraciones terapéuticas y supraterapéuticas del inhibidor.

Los resultados de estos estudios se confirmaron y ampliaron probando si FXa^{I16L} podría contrarrestar el efecto anticoagulante de rivaroxabán cuando ambos agentes se administraron *in vivo*. En estos experimentos, los ratones C57BL/6 se infundieron con rivaroxabán (1 mg/kg) o tampón a través de la vena de la cola. Los ratones se prepararon para exponer la vena yugular y la vena cava. Aproximadamente 10 minutos después, se infundió FXa^{I16L} (1 o 2 mg/kg) mediante inyección directa en la vena yugular. Cinco minutos después de la inyección, se recogió sangre a través de la vena cava en citrato e inhibidor de tripsina de maíz. La sangre recolectada fue luego analizada por ROTEM usando factor de tejido diluido (Innovin, dilución 1:42,000). La sangre total de los ratones a los que se administró tampón solo coaguló durante aproximadamente 2 minutos (**Figura 12**). La administración de 1 mg/kg de rivaroxabán prolongó sustancialmente el tiempo de coagulación a aproximadamente 10 minutos (**Figura 12**). La administración adicional de FXa^{I16L} acortó el tiempo de coagulación en presencia de rivaroxabán de una manera dependiente de la dosis (**Figura 12**).

Ejemplo 4: FXa^{I16L} contrarresta rivaroxabán en un ensayo de generación de trombina

El efecto de FXa^{I16L} sobre la inversión de rivaroxabán en plasma se examinó en un ensayo de generación de trombina (TGA) usando el sistema de trombografía automatizada calibrada (CAT) (Thrombinoscope BV, Maastricht, Países Bajos). Se obtuvo plasma humano normal de George $K_i$ng Biomedical (Overland Park, KS). En la reacción, se añadieron 20 µl de reactivo PPP LOW que contenía fosfolípidos 4 µM y factor tisular 1 pM a 70 µl de plasma humano normal citratado agrupado (tratado con rivaroxabán 250 nM, dentro del intervalo de concentración plasmática terapéutica) en una ronda Immulon 2HB. placa inferior de 96 pocillos con reacciones duplicadas. Inmediatamente antes del inicio de la reacción, se añadieron 10 µl de vehículo o FXa^{I16L} al plasma a concentraciones finales que varían de 0,03125 nM a 0,5 nM FXa^{I16L}, dado un volumen de reacción total de 120 µl. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 20 µl de tampón FluCa que contenía cloruro de calcio y sustrato fluorogénico. La fluorescencia de las reacciones plasmáticas se leyó a 37 °C a intervalos de 20 segundos en un fluorómetro de ascenso Fluoroskan y se comparó con las reacciones de calibrador de trombina de referencia para determinar las concentraciones de trombina. La intensidad de la señal de fluorescencia (FU) se monitoreó continuamente a 37 °C utilizando el CAT. Se analizaron las curvas de generación de trombina (trombina nM frente a tiempo) para extraer el tiempo de retraso, la altura del pico, el tiempo hasta el pico y el área bajo la curva que representa el potencial de trombina endógena (ETP) utilizando el software Thromboscope (versión Thrombinoscope BV).

Se observó una inhibición dependiente de la dosis de la generación de trombina en plasma humano normal con tratamiento con rivaroxabán *in vitro* (5-200 nM) (**Figura 10A**). El rivaroxabán resultó en un aumento en el tiempo de retraso junto con una disminución en el pico de trombina y una disminución en la ETP. La adición de FXa^{I16L} al plasma humano inhibido con rivaroxabán (250 nM) dio como resultado una inversión dependiente de la dosis de la inhibición de la trombina (**Figura 10B**): se restableció la generación pico de trombina, la fase de retraso fue más corta y aumentó la ETP. A una dosis baja de 0,03125 nM FXa^{I16L}, la generación de trombina se restableció a niveles comparables al plasma humano normal tratado con vehículo.

Ejemplo 5: FXa^{I16L} contrarresta rivaroxabán en un modelo de hemorragia de clip de cola de ratón

La capacidad de FXa^{I16L} para superar los efectos de rivaroxabán *in vivo* se evaluó en un modelo de hemorragia aguda en ratones normales. Los resultados demostraron que una variante de FXa similar al zimógeno podría revertir el efecto anticoagulante de un inhibidor directo de FXa.

Para establecer una dosis de rivaroxabán que prolongaría la hemorragia, los ratones C57Bl/6 machos (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) recibieron una inyección intravenosa única de rivaroxabán a una dosis de 10, 25 o 50 mg/kg. Treinta minutos después, los ratones se anestesiaron con isoflurano y se colocaron en una plataforma calentada, y la temperatura corporal de los ratones se mantuvo a 37 °C antes del corte de la cola. Las colas se sumergieron en 50 ml de solución salina tamponada con fosfato precalentada (PBS) a 37 °C durante 2 minutos. Se realizó un corte de cola de 3 mm y se recogió sangre en PBS durante un período de 10 minutos. Se determinó una evaluación cuantitativa de la cantidad de hemorragia por el contenido de hemoglobina de la sangre recogida en PBS. Los tubos se centrifugaron para recoger eritrocitos, se resuspendieron en 5 ml de tampón de lisis (8,3 g/l de NH_4Cl, 1,0 g/l de $KHCO_3$ y 0,037 g/l de EDTA), y la absorbancia de la muestra se midió a 575 nm. Los valores de absorbancia se convirtieron en pérdida de sangre total (µl) usando una curva estándar. La administración de rivaroxabán resultó en un aumento dependiente de la dosis en la pérdida de sangre después de un corte de cola (**Figura 11**).

En este modelo, una dosis de 50 mg/kg de rivaroxabán resultó en un aumento de la pérdida de sangre después de la transección de la cola. Los ratones se dosificaron con 50 mg/kg de rivaroxabán y 30 minutos más tarde se dosificaron por vía intravenosa 50 o 200 µg/kg de FXa^{I16L} a 37 °C antes del corte de la cola. Los ratones se anestesiaron luego con isoflurano y se colocaron en una plataforma calentada, y la temperatura corporal de los ratones se mantuvo a 37 °C antes del corte de la cola. Las colas se sumergieron en 50 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) precalentada a 37 °C durante 2 minutos. Se realizó un corte de la cola de 3 mm y se recogió sangre en PBS durante un período de 10 minutos y la evaluación de la cantidad de hemorragia se determinó por el contenido de hemoglobina como se describe. En este modelo, la administración de la variante hemostática FXa^{I16L} disminuyó la pérdida de hemorragia excesiva inducida con rivaroxabán (**Figura 11**).

Ejemplo 6: FXa^{I16L} contrarresta rivaroxabán en un modelo de hemorragia de ratón demostrado mediante microscopía intravital

Como se visualiza usando microscopía intravital, se demostró que rivaroxabán inhibe la formación de trombos en la microcirculación del músculo cremáster de ratón después de una lesión inducida por láser. La administración adicional de FXa^{I16L} podría contrarrestar el efecto anticoagulante de rivaroxabán en este sistema.

Mediante el uso de técnicas estándar, el músculo cremáster de ratones se expuso y se visualizó usando microscopía intravital. Luego se indujo una lesión vascular en el músculo usando un láser. Después de la lesión, se visualizó la formación de coágulos usando diferentes anticuerpos marcados con fluorescencia que reconocen específicamente la fibrina y las plaquetas. La coagulación está indicada por la presencia de señal fluorescente de ambos tipos de anticuerpos.

Después de la lesión por láser, un ratón no tratado formó rápidamente un coágulo en el sitio de la lesión que fue estable durante varios minutos (**Figura 13A**). En el cuadro de vídeo, el coágulo es visible como la coincidencia de la señal fluorescente asociada con los anticuerpos contra la fibrina y las plaquetas (región central gris claro que se superpone a la región gris más oscura). Sin embargo, la administración de 1 mg/kg de rivaroxabán a un ratón retrasó la acumulación de plaquetas en el sitio de la lesión y eliminó cualquier signo de fibrina (**Figura 13B**). En el cuadro de vídeo, solo se puede apreciar una extensión reducida de plaquetas según lo indicado por la región gris oscuro, que refleja la presencia de señal fluorescente asociada con anticuerpos antiplaquetarios. Por el contrario, cuando a un ratón se le administró 1 mg/kg de rivaroxabán seguido de 0,5 mg/kg de FXa^{I16L}, se formó rápidamente un coágulo en el sitio de la lesión (**Figura 13C**). En el cuadro de vídeo, el coágulo está indicado por el patrón característico de la señal fluorescente asociada con anticuerpos contra plaquetas y fibrina.

A menos que se defina lo contrario en la presente memoria descriptiva, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente divulgación tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la materia. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y

los términos plurales incluirán el singular. En general, la nomenclatura utilizada en conexión con las técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en la presente memoria descriptiva son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica.

Los procedimientos y técnicas de la presente divulgación se realizan generalmente de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook J. y Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio), 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (Protocolos cortos en Biología Molecular: Un Compendio de Métodos a partir de los Protocolos Actuales en Biología Molecular), Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane. Using Antibodies: A Laboratory Manual (El uso de Anticuerpos: Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); y Coligan et al., Short Protocols in Protein Science (Protocolos Cortos en la Ciencia de las Proteínas), Wiley, John & Sons, Inc. (2003), incorporados por referencia en la presente memoria descriptiva. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria descriptiva. La nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y medicinal descritas en la presente memoria descriptiva son los bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, se entenderá que la palabra "comprende" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de enteros.

Listado de secuencias

<110> PFIZER INC. EL HOSPITAL INFANTIL DE FILADELFIA

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA CONTRARRESTAR LA INHIBICIÓN DEL FACTOR XA

<130> PC072006A

<150> US 61/759,332
<151> 2013-01-31

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 488
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn
20 25 30

Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met
35 40 45

Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr
50 55 60

Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe
65 70 75 80

Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln
85 90 95

Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys
100 105 110

Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu
115 120 125

Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln
130 135 140

Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn
145 150 155 160

Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr
165 170 175

Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly
180 185 190

Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu
195 200 205

Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln
210 215 220

Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
225 230 235 240

Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu
245 250 255

Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu
260 265 270

Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val
275 280 285

Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu
290 295 300

Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp
305 310 315 320

Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met
325 330 335

Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr
340 345 350

Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His
355 360 365

Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr
370 375 380

Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln
385 390 395 400

Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln
405 410 415

Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe
420 425 430

Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys
435 440 445

Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg
450 455 460

Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu
465 470 475 480

Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
485

<210> 2
<211> 1560
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2

gactttgctc cagcagcctg tcccagtgag gacagggaca cagtactcgg ccacaccatg 60

gggcgcccac tgcacctcgt cctgctcagt gcctccctgg ctggcctcct gctgctcggg 120

gaaagtctgt tcatccgcag ggagcaggcc aacaacatcc tggcgagggt cacgagggcc 180

aattcctttc ttgaagagat gaagaaagga cacctcgaaa gagagtgcat ggaagagacc 240

tgctcatacg aagaggcccg cgaggtcttt gaggacagcg acaagacgaa tgaattctgg 300

aataaataca aagatggcga ccagtgtgag accagtcctt gccagaacca gggcaaatgt 360

aaagacggcc tcggggaata cacctgcacc tgtttagaag gattcgaagg caaaaactgt 420

gaattattca cacggaagct ctgcagcctg gacaacgggg actgtgacca gttctgccac 480

gaggaacaga actctgtggt gtgctcctgc gcccgcgggt acaccctggc tgacaacggc 540

aaggcctgca ttcccacagg gccctacccc tgtgggaaac agaccctgga acgcaggaag 600

aggtcagtgg cccaggccac cagcagcagc ggggaggccc ctgacagcat cacatggaag 660

ccatatgatg cagccgacct ggaccccacc gagaacccct tcgacctgct tgacttcaac 720

cagacgcagc ctgagagggg cgacaacaac ctcaccagga tcgtgggagg ccaggaatgc 780

aaggacgggg agtgtccctg gcaggccctg ctcatcaatg aggaaaacga gggtttctgt 840

ggtggaacca ttctgagcga gttctacatc ctaacggcag cccactgtct ctaccaagcc 900

aagagattca aggtgagggt aggggaccgg aacacggagc aggaggaggg cggtgaggcg 960

gtgcacgagg tggaggtggt catcaagcac aaccggttca caaaggagac ctatgacttc 1020

gacatcgccg tgctccggct caagaccccc atcaccttcc gcatgaacgt ggcgcctgcc 1080

tgcctccccg agcgtgactg ggccgagtcc acgctgatga cgcagaagac ggggattgtg 1140

agcggcttcg ggcgcaccca cgagaagggc cggcagtcca ccaggctcaa gatgctggag 1200

gtgccctacg tggaccgcaa cagctgcaag ctgtccagca gcttcatcat cacccagaac 1260

atgttctgtg ccggctacga caccaagcag gaggatgcct gccaggggga cagcgggggc 1320

ccgcacgtca cccgcttcaa ggacacctac ttcgtgacag gcatcgtcag ctggggagag 1380

ggctgtgccc gtaaggggaa gtacgggatc tacaccaagg tcaccgcctt cctcaagtgg 1440

atcgacaggt ccatgaaaac caggggcttg cccaaggcca agagccatgc cccggaggtc 1500

ataacgtcct ctccattaaa gtgagatccc actcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio de Escisión Proteolítica

<400> 3

Arg Lys Arg Arg Lys Arg
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una variante del Factor Xa que comprende una sustitución en el aminoácido correspondiente a la posición 235 en la SEQ ID NO: 1 seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en: Thr o Leu, o una composición farmacéutica de la misma, para su uso en la reducción o prevención de hemorragias en un sujeto tratado con un inhibidor directo del Factor Xa.

2. La variante del Factor Xa o composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el uso efectúa la reversión urgente de la coagulopatía adquirida debido a la terapia de inhibición de FXa en un sujeto con hemorragia grave aguda.

3. La variante del Factor Xa o la composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que hay una reducción en la hemorragia de al menos 5%-10%, 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95% o 95%-100%.

4. La variante del Factor Xa o la composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la variante del Factor Xa se administra antes de una cirugía planificada, después de una lesión o después de una sobredosis de inhibidor directo del Factor Xa.

5. La variante del Factor Xa o la composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la variante del Factor Xa se administra más de una vez.

6. La variante del Factor Xa o la composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se administra al menos un procoagulante adicional, opcionalmente, en la que el procoagulante se selecciona del grupo que consiste en: una variante del Factor Xa diferente, Factor IX, Factor XIa, Factor XIIa, Factor VIII, Factor VIIa, FEIBA y concentrado de complejo de protrombina (PCC).

7. La variante del Factor Xa o la composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la concentración plasmática del inhibidor directo de FXa es una cantidad supraterapéutica.

8. La variante del Factor Xa o la composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la variante del Factor Xa se administra en un intervalo de dosis de 0,0001 a 50 mg/kg, 0,001 a 50 mg/kg, 0,001 a 5 mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,001 a 0,05 mg/kg, 0,01 a 5 mg/kg, o 0,01 a 0,5 mg/kg.

9. La variante del Factor Xa o la composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la variante Factor Xa se administra para lograr una concentración sérica en un intervalo de 0,0003 a 300 nM, 0,003 a 300 nM, 0,03 a 300 nM, 0,003 a 30 nM, 0,03 a 30 nM, o 0,3 a 3 nM.

10. La variante del Factor Xa o la composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la variante del Factor Xa contrarresta el efecto del inhibidor directo de FXa hasta una concentración plasmática que es al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 250 veces, al menos 500 veces, al menos 1.000 veces, al menos 2.500 veces, al menos 5.000 veces o al menos 10.000 veces menor que la concentración plasmática del inhibidor directo de FXa.

11. La variante del Factor Xa o la composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la variante del Factor Xa contrarresta el efecto del inhibidor directo de FXa hasta una concentración plasmática que se calcula multiplicando la concentración plasmática del inhibidor directo de FXa por un factor de conversión que varía de $0,1 \times 10^{-4}$ a 1000×10^{-4}.

12. La variante del Factor Xa o la composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el inhibidor directo de FXa es rivaroxabán o apixabán.

13. La variante del Factor Xa o la composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la concentración plasmática de rivaroxabán es al menos 100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM o 800 nM.

14. La variante del Factor Xa o la composición farmacéutica de la misma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la concentración plasmática de apixabán es al menos 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM, 350 nM o 400 nM.

FIG. 1A

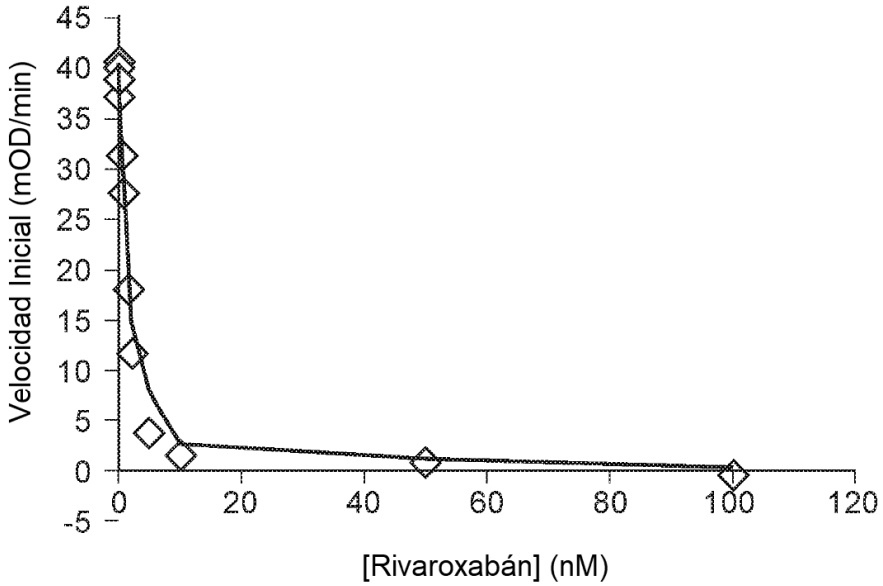

Velocidad Inicial (mOD/min)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
0
20
40
60
80
100
120
[Rivaroxabán] (nM)

FIG. 1B

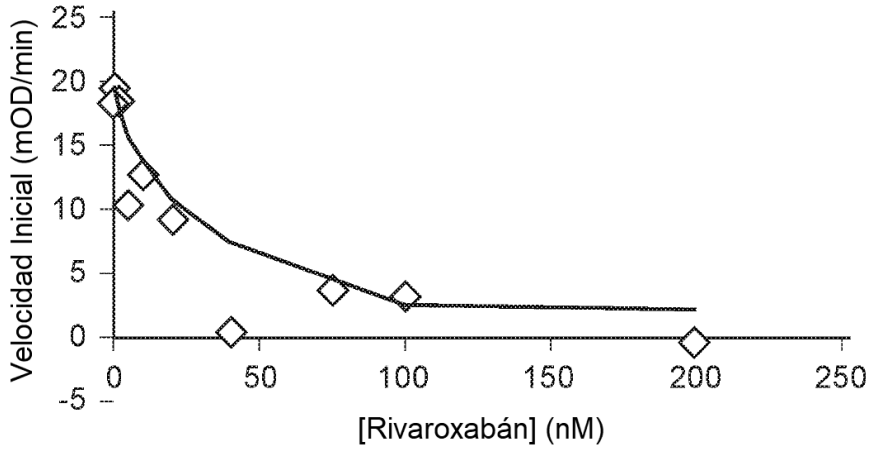

Velocidad Inicial (mOD/min)
25
20
15
10
5
0
-5
0
50
100
150
200
250
[Rivaroxabán] (nM)

FIG. 2A

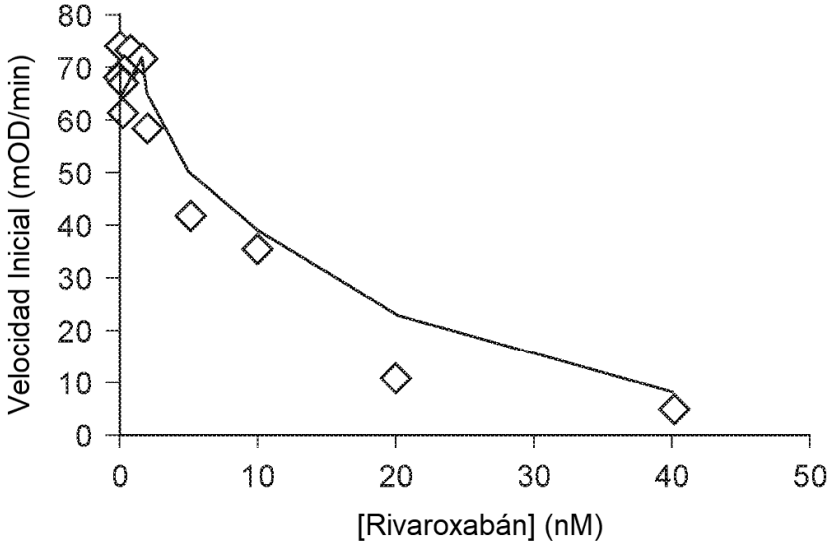

Velocidad Inicial (mOD/min)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
[Rivaroxabán] (nM)

FIG. 2B

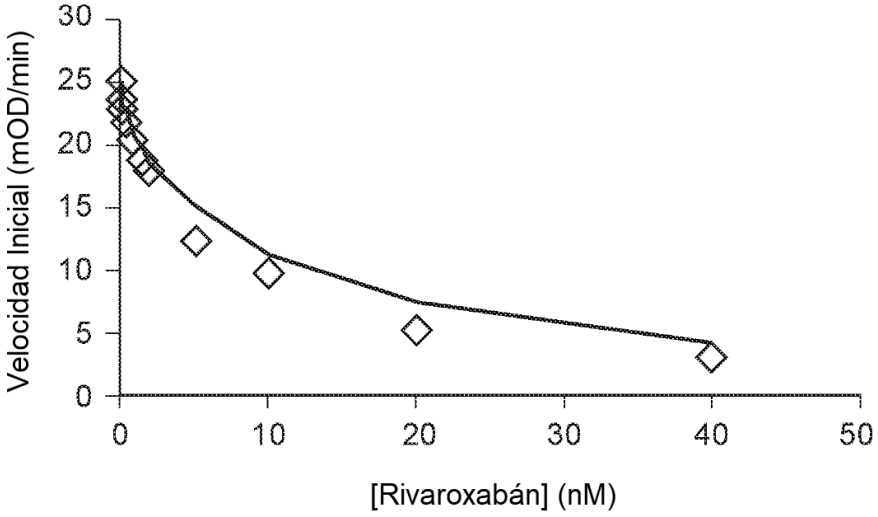

Velocidad Inicial (mOD/min)
30
25
20
15
10
5
0
0
10
20
30
40
50
[Rivaroxabán] (nM)

FIG. 3

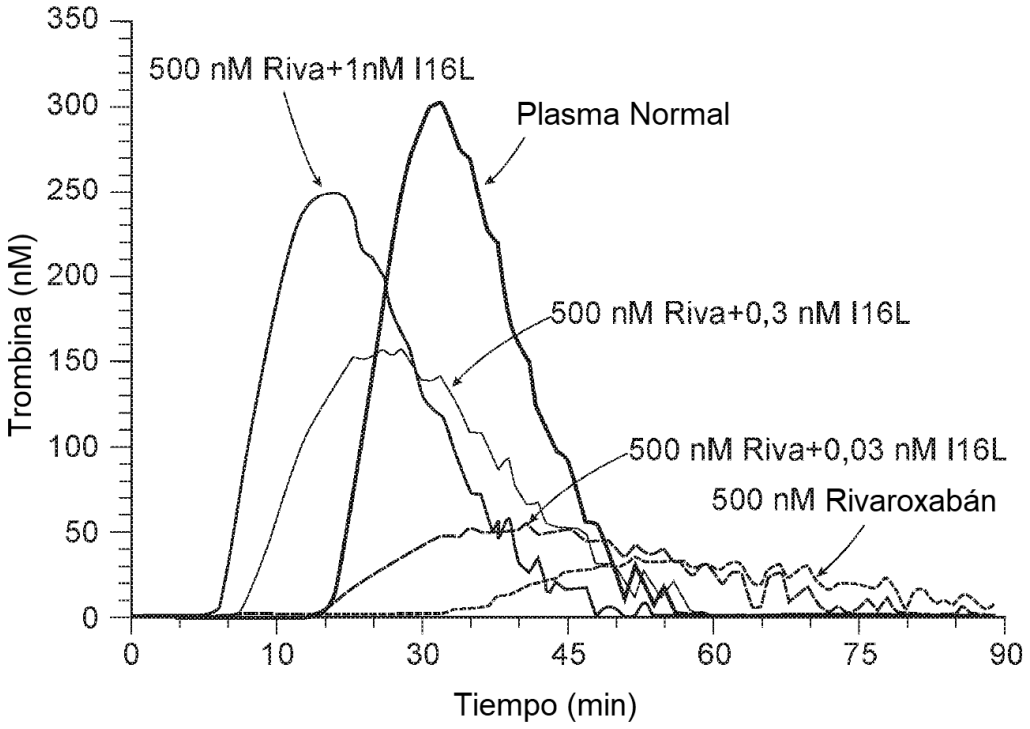

350
300
250
200
150
100
50
0
Trombina (nM)
0
10
30
45
60
75
90
Tiempo (min)
500 nM Riva+1nM I16L
Plasma Normal
500 nM Riva+0,3 nM I16L
500 nM Riva+0,03 nM I16L
500 nM Rivaroxabán

FIG. 4A

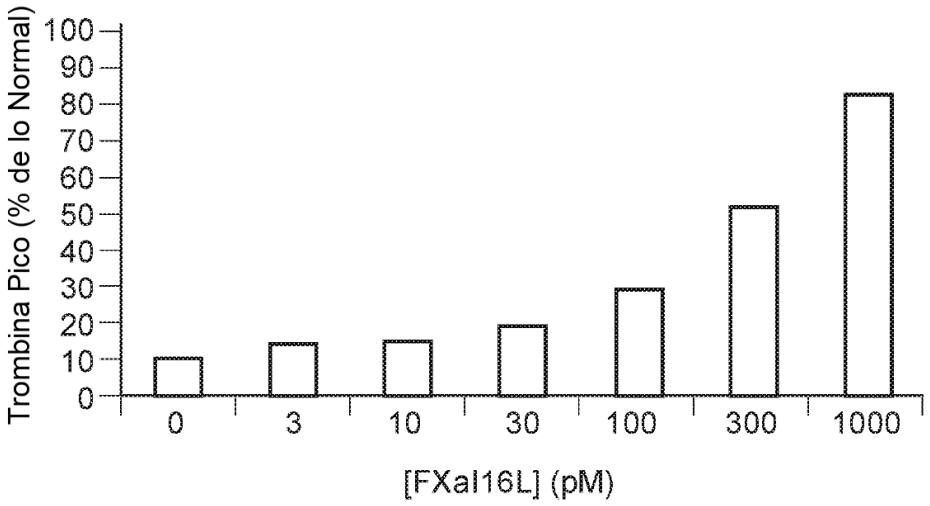

Trombina Pico (% de lo Normal)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
3
10
30
100
300
1000
[FXaI16L] (pM)

FIG. 4B

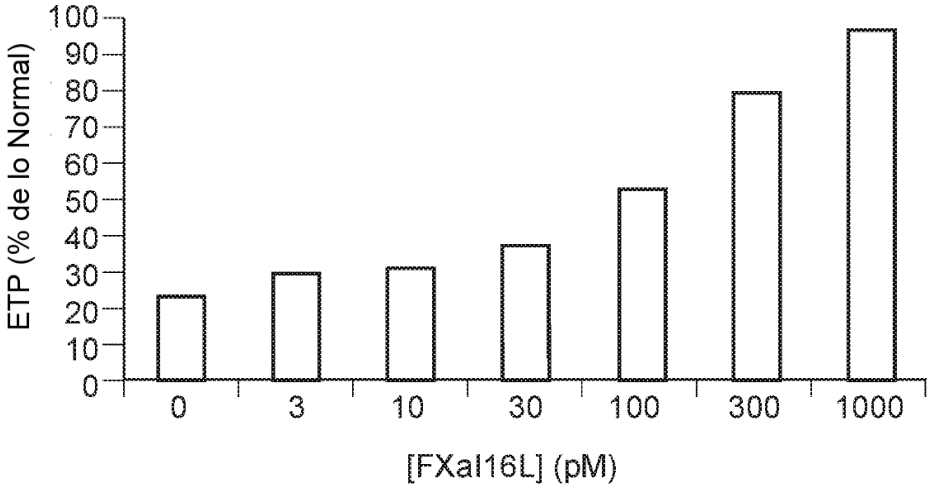

ETP (% de lo Normal)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
3
10
30
100
300
1000
[FXaI16L] (pM)

FIG. 4C

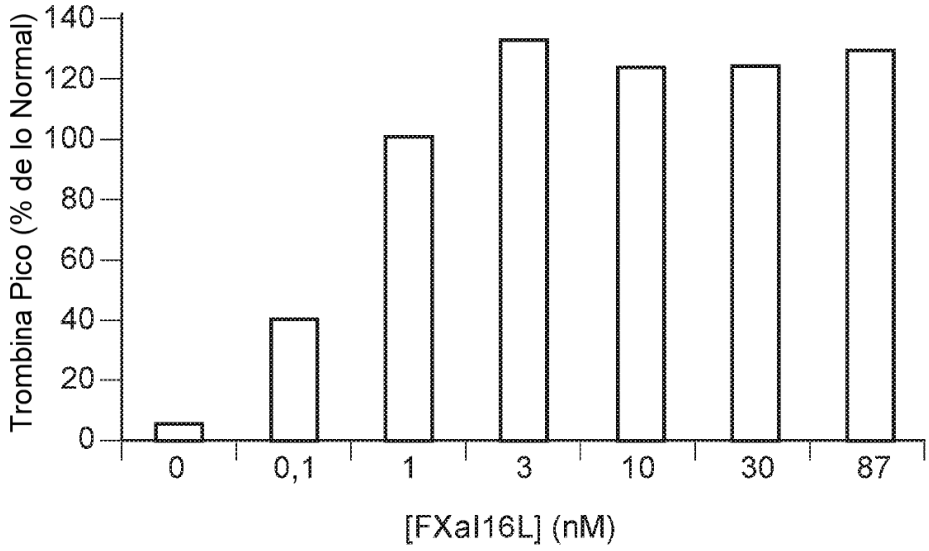

Trombina Pico (% de lo Normal)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
0,1
1
3
10
30
87
[FXaI16L] (nM)

FIG. 4D

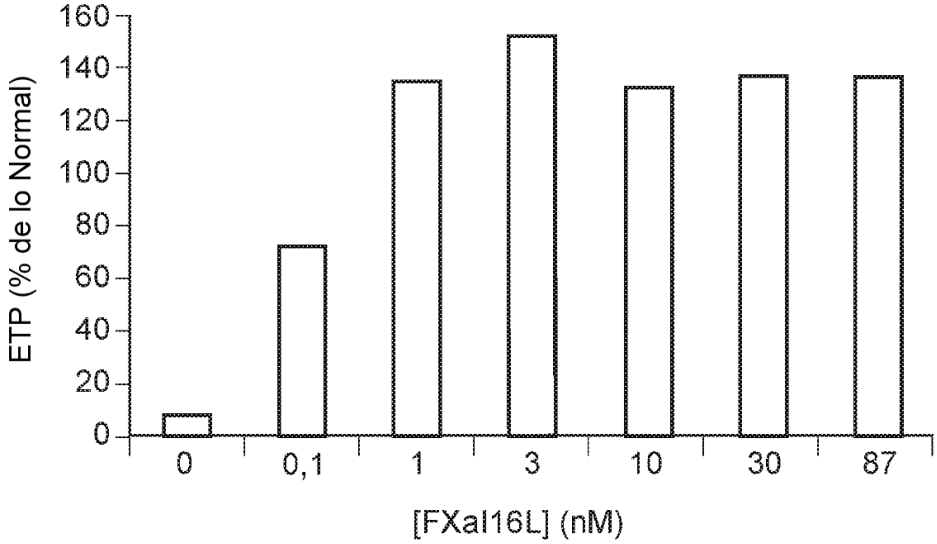

ETP (% de lo Normal)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
0,1
1
3
10
30
87
[FXaI16L] (nM)

FIG. 5A

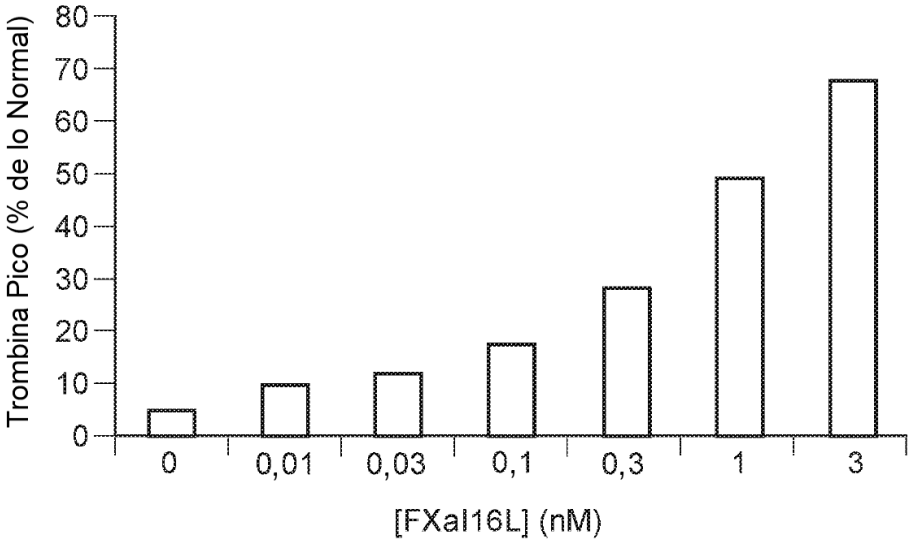

Trombina Pico (% de lo Normal)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0,01
0,03
0,1
0,3
1
3
[FXaI16L] (nM)

FIG. 5B

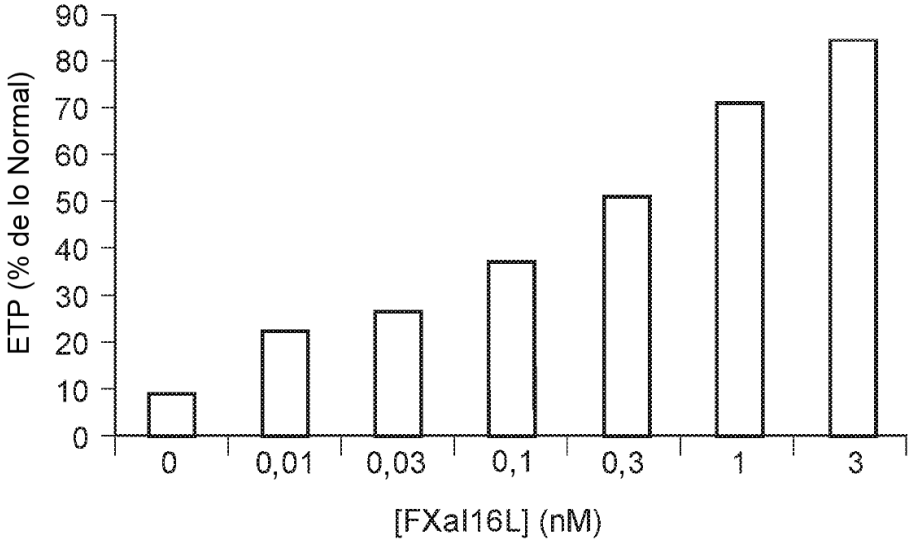

ETP (% de lo Normal)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0,01
0,03
0,1
0,3
1
3
[FXaI16L] (nM)

FIG. 6A

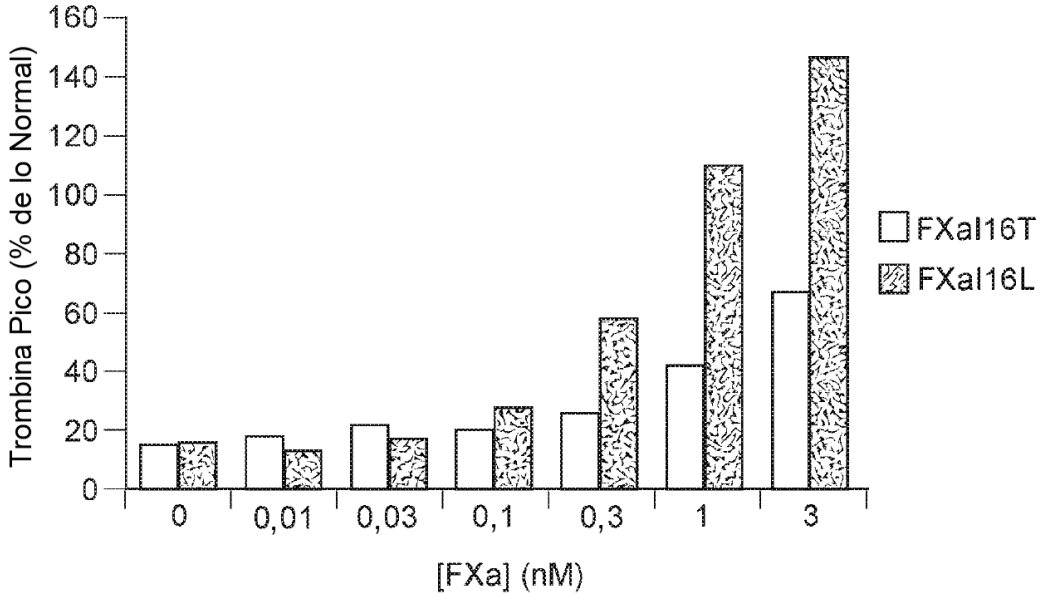

160
140
120
100
80
60
40
20
0
Trombina Pico (% de lo Normal)
0
0,01
0,03
0,1
0,3
1
3
[FXa] (nM)
FXaI16T
FXaI16L

FIG. 6B

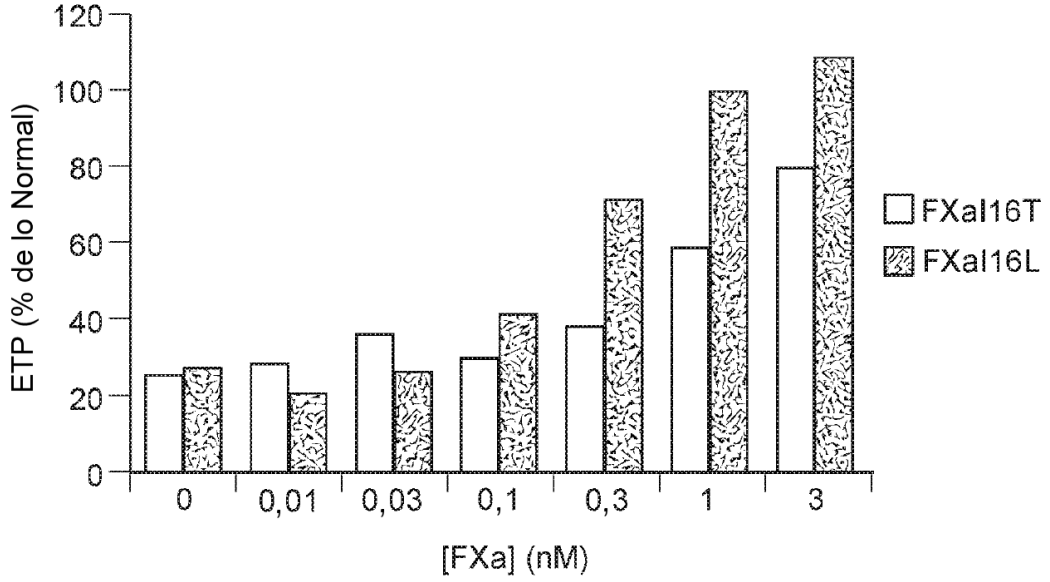

120
100
80
60
40
20
0
ETP (% de lo Normal)
0
0,01
0,03
0,1
0,3
1
3
[FXa] (nM)
FXaI16T
FXaI16L

FIG. 7A

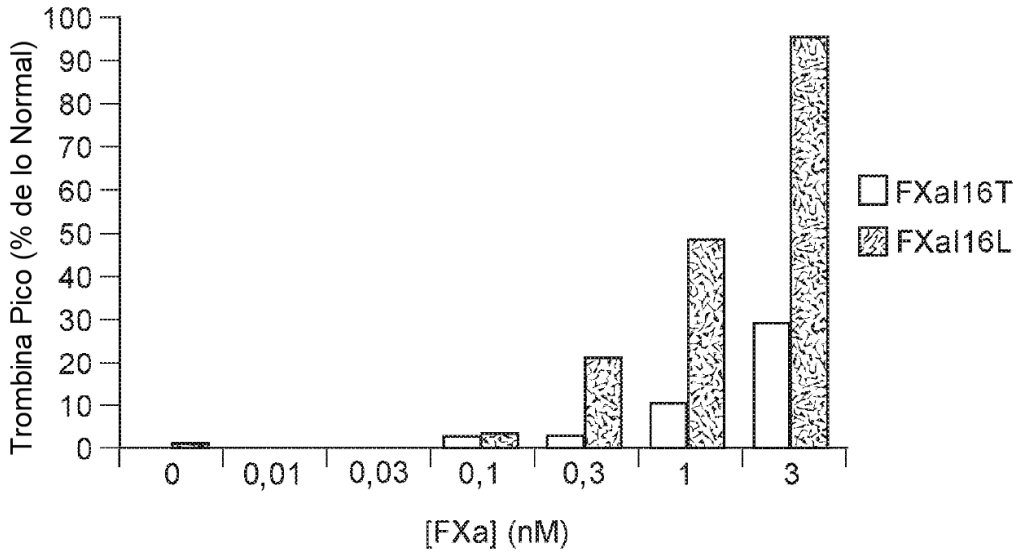
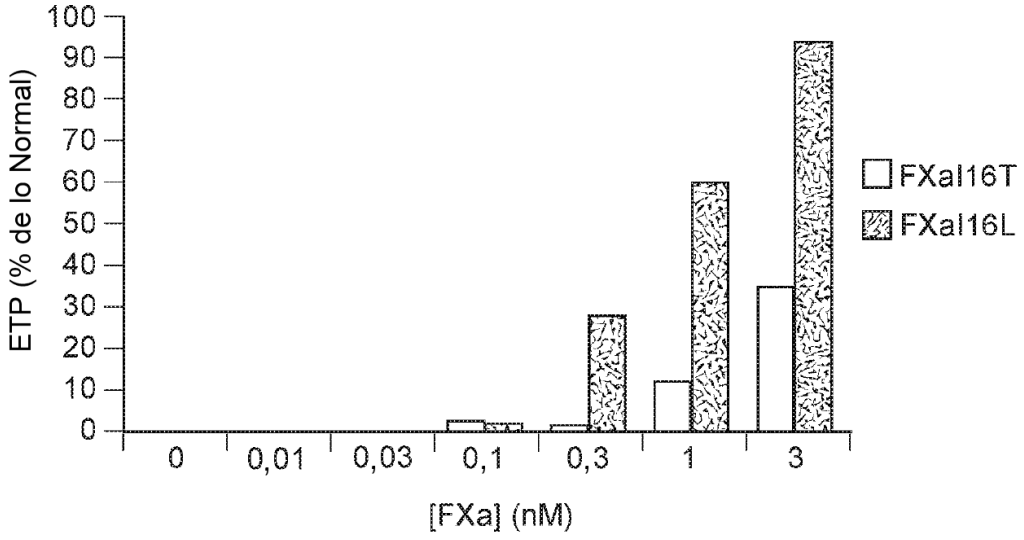

Trombina Pico (% de lo Normal)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0,01
0,03
0,1
0,3
1
3
[FXa] (nM)
FXaI16T
FXaI16L

FIG. 7B


ETP (% de lo Normal)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0,01
0,03
0,1
0,3
1
3
[FXa] (nM)
FXaI16T
FXaI16L

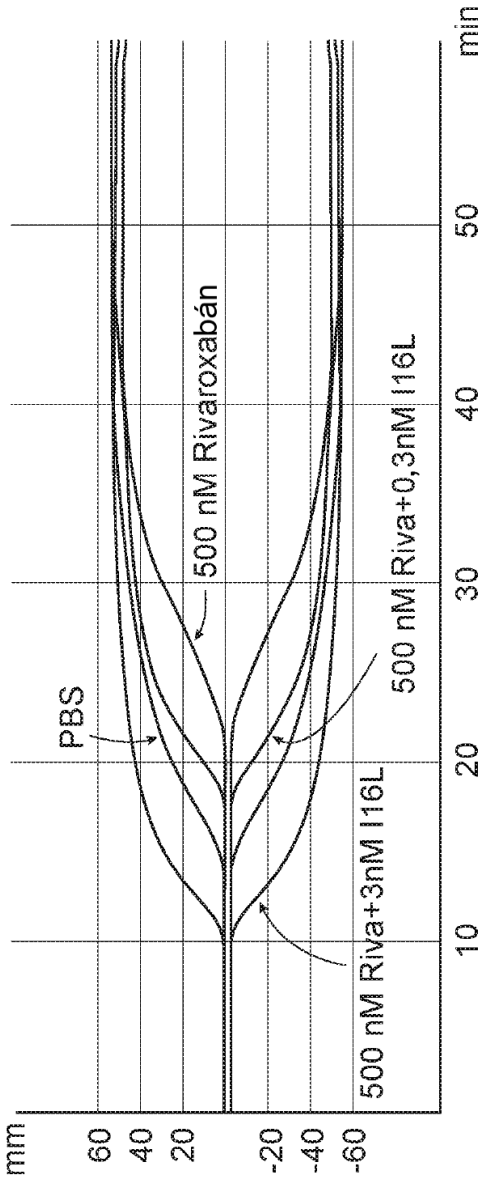

mm
60
40
20
-20
-40
-60
min
10
20
30
40
50
PBS
500 nM Rivaroxabán
500 nM Riva+0,3nM I16L
500 nM Riva+3nM I16L

FIG. 8A

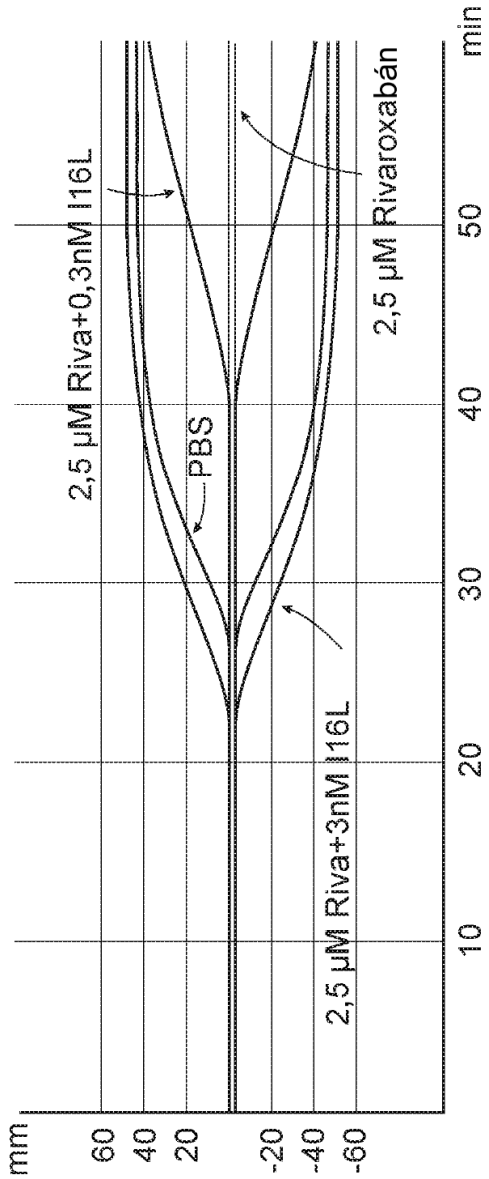

mm
60
40
20
-20
-40
-60
min
10
20
30
40
50
2,5 µM Riva+0,3nM I16L
PBS
2,5 µM Rivaroxabán
2,5 µM Riva+3nM I16L

FIG. 8B

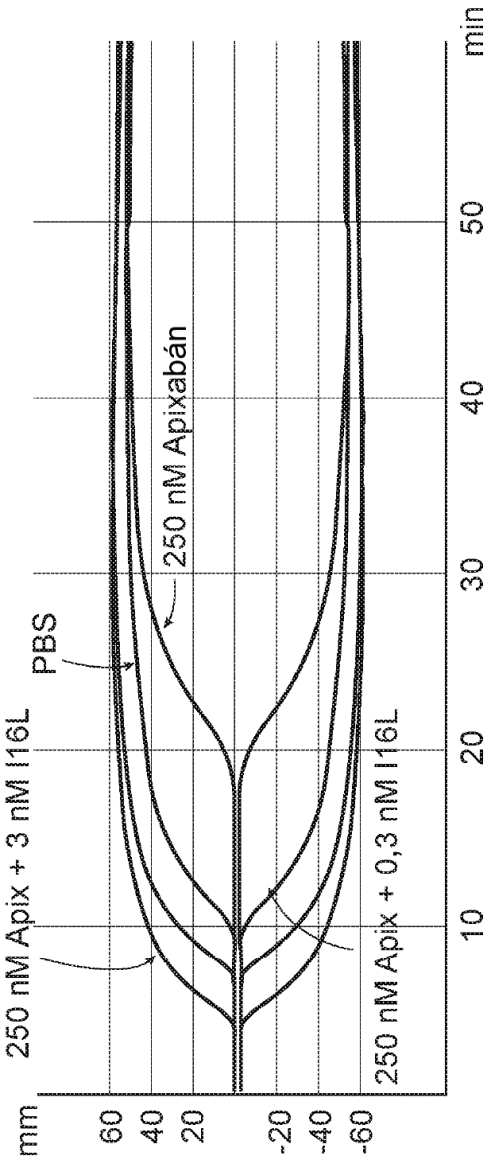

mm
60
40
20
-20
-40
-60
min
10
20
30
40
50
250 nM Apix + 3 nM I16L
PBS
250 nM Apixabán
250 nM Apix + 0,3 nM I16L

FIG. 9A

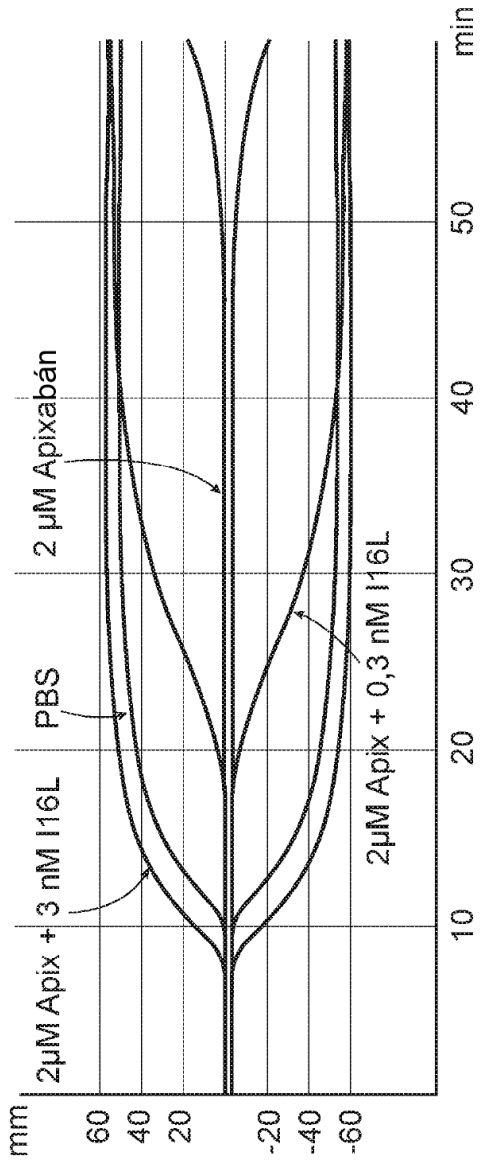

mm
60
40
20
-20
-40
-60
min
10
20
30
40
50
2µM Apix + 3 nM I16L
PBS
2 µM Apixabán
2µM Apix + 0,3 nM I16L

FIG. 9B

FIG. 10A

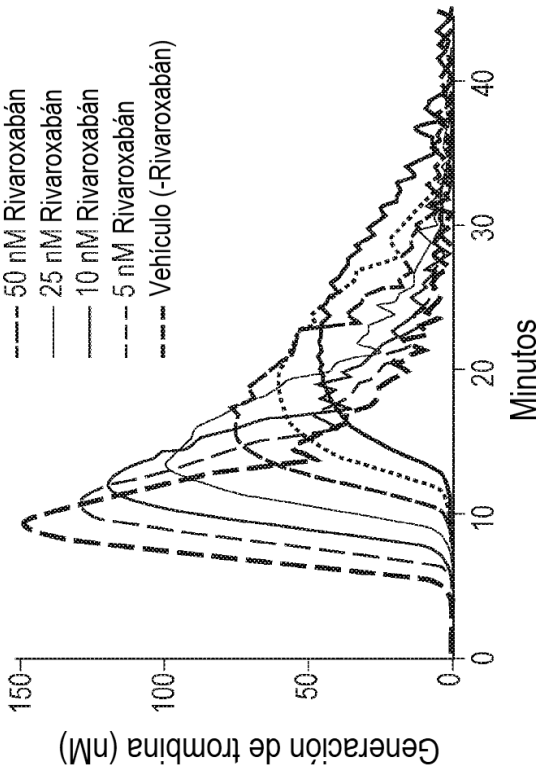


FIG. 10B

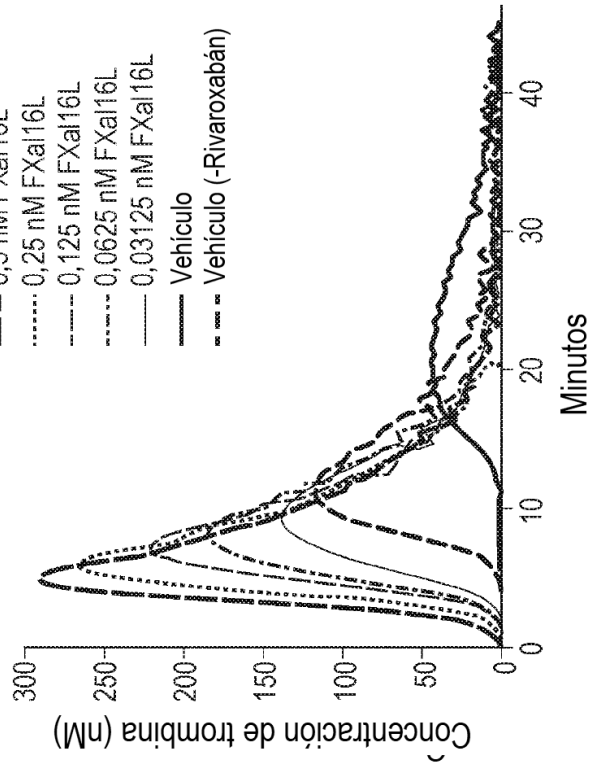


FIG. 11

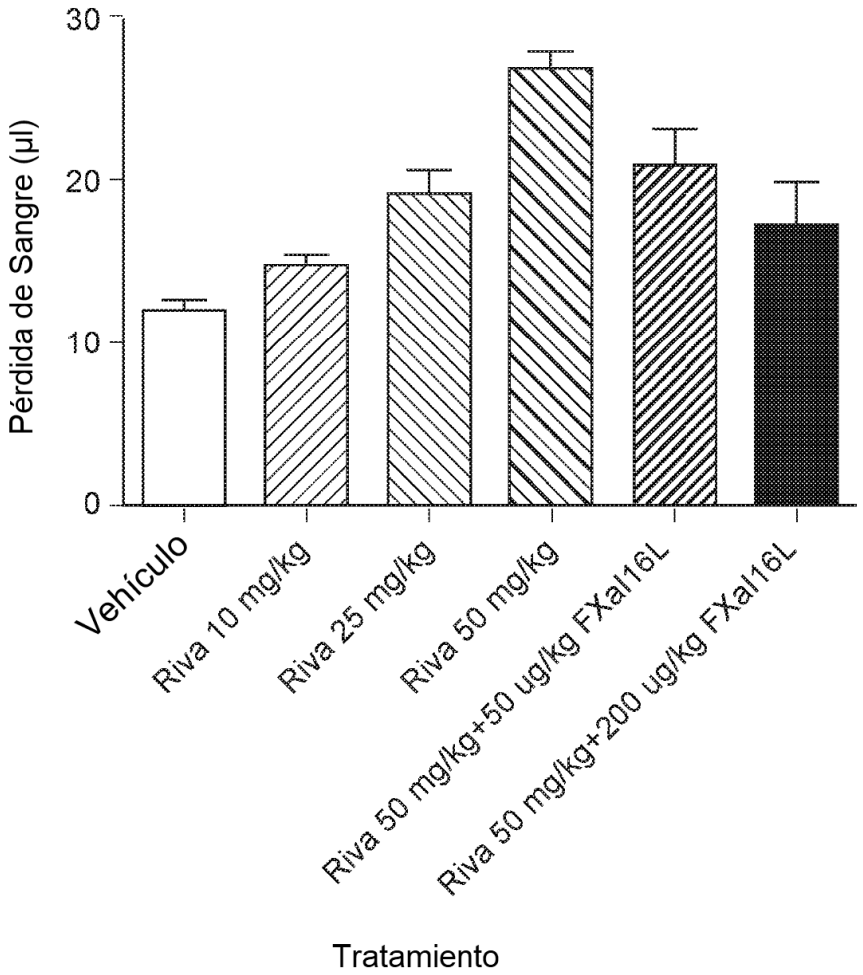

30
20
10
0
Pérdida de Sangre (µl)
Vehículo
Riva 10 mg/kg
Riva 25 mg/kg
Riva 50 mg/kg
Riva 50 mg/kg+50 ug/kg FXaI16L
Riva 50 mg/kg+200 ug/kg FXaI16L
Tratamiento

FIG. 12

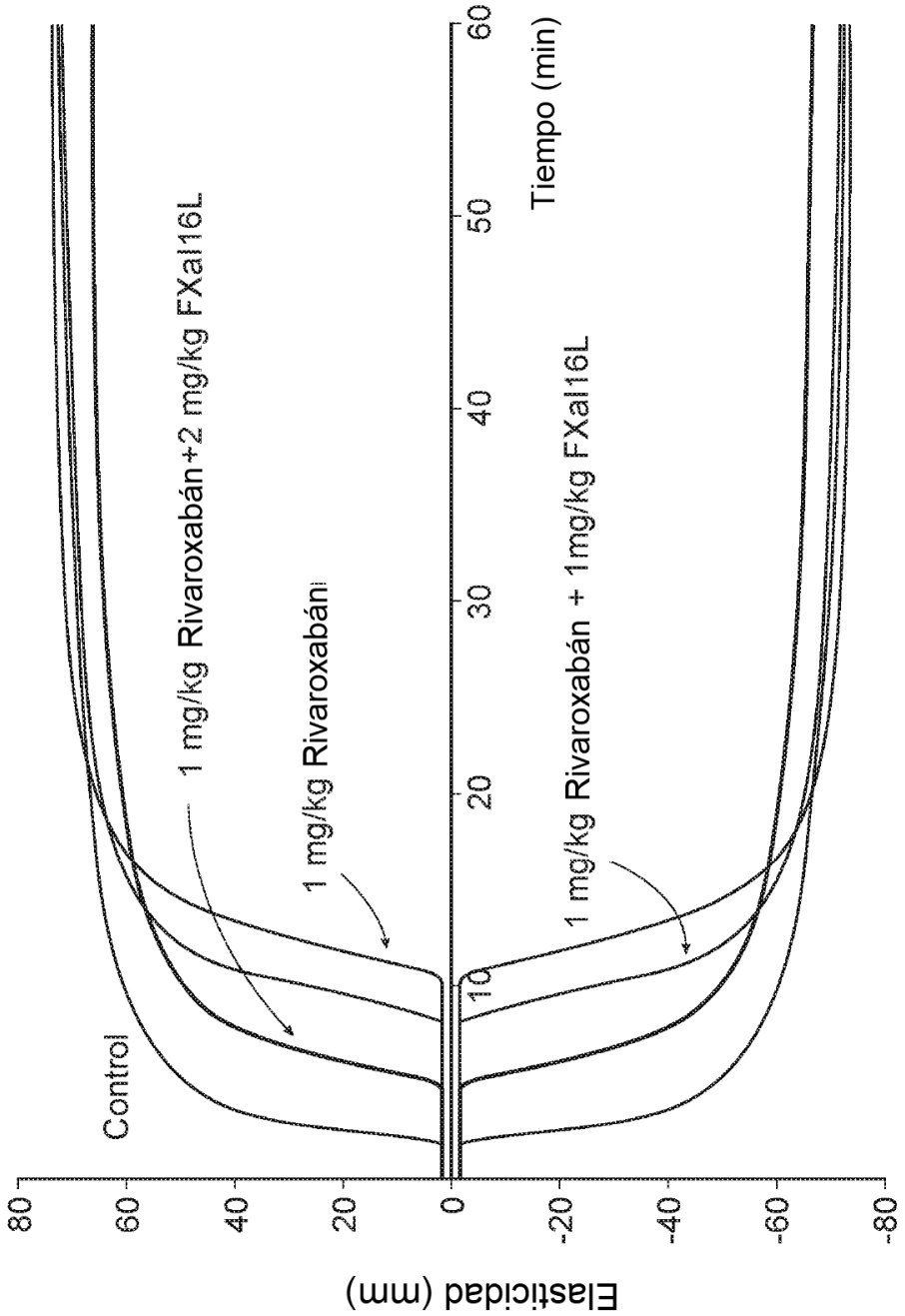

Control
1 mg/kg Rivaroxabán+2 mg/kg FXa116L
1 mg/kg Rivaroxabán
1 mg/kg Rivaroxabán + 1mg/kg FXa116L
Elasticidad (mm)
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
10
20
30
40
50
60
Tiempo (min)

FIG. 13A

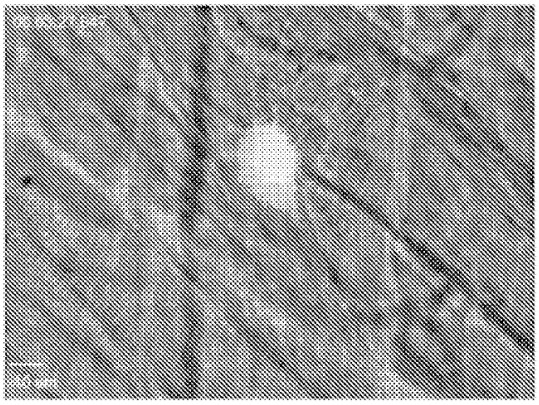


FIG. 13B

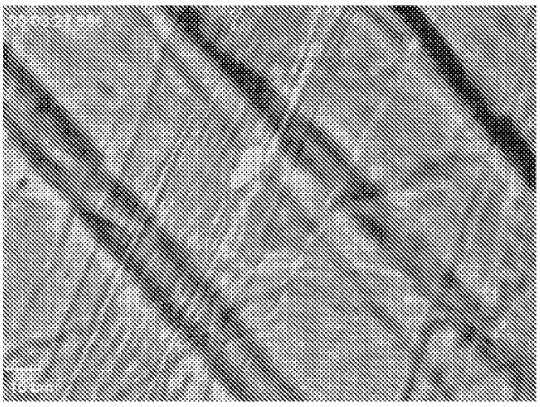


FIG. 13C

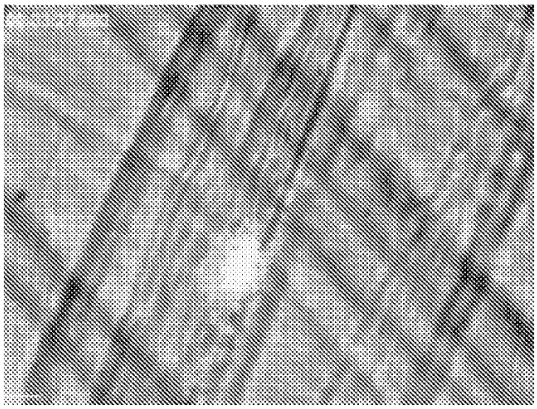


FIG. 14

Preproteína del Factor X Humano (SEQ ID NO: 1)

```
  1 MGRPLHLVLL SASLAGLLLL GESLFIRREQ ANNILARVTR ANSFLEEMKK GHLERECMEE
 61 TCSYEEAREV FEDSDKTNEF WNKYKDGDQC ETSPCQNQGK CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN
121 CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN GKACIPTGPY PCGKQTLERR
181 KRSVAQATSS SGEAPDSITW KPYDAADLDP TENPFDLLDF NQTQPERGDN NLTRIVGGQE
241 CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE
301 AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDIAVLRLKT PITFRMNVAP ACLPERDWAE STLMTQKTGI
361 VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ NMFCAGYDTK QEDACQGDSG
421 GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE
481 VITSSPLK
```

FIG. 15

ADNc de Preproteína del Factor X Humano (SEQ ID NO: 2)

```
  1 GACTTTGCTC CAGCAGCCTG TCCCAGTGAG GACAGGGACA CAGTACTCGG CCACACCATG
 61 GGGCGCCCAC TGCACCTCGT CCTGCTCAGT GCCTCCCTGG CTGGCCTCCT GCTGCTCGGG
121 GAAAGTCTGT TCATCCGCAG GGAGCAGGCC AACAACATCC TGGCGAGGGT CACGAGGGCC
181 AATTCCTTTC TTGAAGAGAT GAAGAAAGGA CACCTCGAAA GAGAGTGCAT GGAAGAGACC
241 TGCTCATACG AAGAGGCCCG CGAGGTCTTT GAGGACAGCG ACAAGACGAA TGAATTCTGG
301 AATAAATACA AAGATGGCGA CCAGTGTGAG ACCAGTCCTT GCCAGAACCA GGGCAAATGT
361 AAAGACGGCC TCGGGGAATA CACCTGCACC TGTTTAGAAG GATTCGAAGG CAAAAACTGT
421 GAATTATTCA CACGGAAGCT CTGCAGCCTG GACAACGGGG ACTGTGACCA GTTCTGCCAC
481 GAGGAACAGA ACTCTGTGGT GTGCTCCTGC GCCCGCGGGT ACACCCTGGC TGACAACGGC
541 AAGGCCTGCA TTCCCACAGG GCCCTACCCC TGTGGGAAAC AGACCCTGGA ACGCAGGAAG
601 AGGTCAGTGG CCCAGGCCAC CAGCAGCAGC GGGGAGGCCC CTGACAGCAT CACATGGAAG
661 CCATATGATG CAGCCGACCT GGACCCCACC GAGAACCCCT TCGACCTGCT TGACTTCAAC
721 CAGACGCAGC CTGAGAGGGG CGACAACAAC CTCACCAGGA TCGTGGGAGG CCAGGAATGC
781 AAGGACGGGG AGTGTCCCTG GCAGGCCCTG CTCATCAATG AGGAAAACGA GGGTTTCTGT
```

FIG. 15

(continuación)

```
 841 GGTGGAACCA TTCTGAGCGA GTTCTACATC CTAACGGCAG CCCACTGTCT CTACCAAGCC
 901 AAGAGATTCA AGGTGAGGGT AGGGGACCGG AACACGGAGC AGGAGGAGGG CGGTGAGGCG
 961 GTGCACGAGG TGGAGGTGGT CATCAAGCAC AACCGGTTCA CAAAGGAGAC CTATGACTTC
1021 GACATCGCCG TGCTCCGGCT CAAGACCCCC ATCACCTTCC GCATGAACGT GGCGCCTGCC
1081 TGCCTCCCCG AGCGTGACTG GGCCGAGTCC ACGCTGATGA CGCAGAAGAC GGGGATTGTG
1141 AGCGGCTTCG GGCGCACCCA CGAGAAGGGC CGGCAGTCCA CCAGGCTCAA GATGCTGGAG
1201 GTGCCCTACG TGGACCGCAA CAGCTGCAAG CTGTCCAGCA GCTTCATCAT CACCCAGAAC
1261 ATGTTCTGTG CCGGCTACGA CACCAAGCAG GAGGATGCCT GCCAGGGGGA CAGCGGGGGC
1321 CCGCACGTCA CCCGCTTCAA GGACACCTAC TTCGTGACAG GCATCGTCAG CTGGGGAGAG
1381 GGCTGTGCCC GTAAGGGGAA GTACGGGATC TACACCAAGG TCACCGCCTT CCTCAAGTGG
1441 ATCGACAGGT CCATGAAAAC CAGGGGCTTG CCCAAGGCCA AGAGCCATGC CCCGGAGGTC
1501 ATAACGTCCT CTCCATTAAA GTGAGATCCC ACTCAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
```