(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 788 075**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2007** **PCT/EP2007/011099**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2008** **WO08077529**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2007** **E 07856831 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020** **EP 2125004**

(54) Título: **Uso terapéutico sinérgico de concentrados de complejo de protrombina con concentrados de FVIII**

(30) Prioridad:

22.12.2006 EP 06026748

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2020

(73) Titular/es:

CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE

(72) Inventor/es:

DICKNEITE, GERHARD

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 788 075 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

Uso terapéutico sinérgico de concentrados de complejo de protrombina con concentrados de FVIII

El campo de la invención es el tratamiento del sangrado adquirido, una afección clínica asociada con un sangrado traumático, peri o postoperatorio severo. Se propone un nuevo tratamiento en el que se explotan las propiedades procoaguladoras sinérgicas de los concentrados de complejo de protrombina (PCC) junto con medicamentos que comprenden FVIII y, opcionalmente, VWF.

El sangrado como resultado de una coagulopatía adquirida sin un trastorno genético subyacente puede ocurrir en una variedad de constelaciones clínicas. El trauma, la hemorragia peri o postoperatoria o la sobredosis de anticoagulantes pueden dañar el sistema de coagulación. En casos severos, la coagulopatía se asocia con pérdida masiva de sangre, que debe corregirse mediante reemplazo de volumen y/o transfusión de eritrocitos. La dilución de los elementos funcionales del sistema de coagulación conduce a un riesgo elevado de sangrado. Además del cierre quirúrgico de la herida, la restitución del potencial hemostático alterado del paciente es obligatoria (Hardy, 2006). La hemostasia es un sistema complejo para prevenir la pérdida de sangre circulante. Sus elementos principales son los factores de coagulación plasmática y el grupo de plaquetas circulantes. El evento inicial después de una lesión es la unión de la plaqueta al colágeno subendotelial recién expuesto a través de su receptor GPIb. Esta unión está mediada por el factor von Willebrand (VWF), una gran proteína multimérica. El VWF tiene un sitio de unión (A1) para el receptor GPIb de plaquetas, el dominio A3 es responsable de la unión al colágeno (Ruggeri, 1993). El factor tisular expuesto en el subendotelio se une al FVII circulante y activa los sistemas de coagulación extrínseca al formar FVIIa activado de una manera actualmente desconocida (Morrissey, 2001). El complejo TF/FVIIa activa el Factor X a FXa para formar una pequeña cantidad de trombina. Esta trombina inicial activa las plaquetas en el sitio de la lesión y también las coenzimas FV y FVIII a FVa y FVIIIa, respectivamente. FXa luego se une a la plaqueta activada donde se convierte en FXa por el complejo FIXa/FVIIIa. El complejo FXa/Va unido a plaquetas convierte la protrombina en trombina y, de este modo, media la explosión de trombina (Monroe et al., 2002). Una coagulopatía dilucional es causada por el consumo, la dilución y las pérdidas y afecta todos los aspectos de la coagulación: Las enzimas y proenzimas de la cascada de coagulación, el fibrinógeno y los trombocitos (Hiippala et al., 1995, Hiippala 1998). Como los eritrocitos también contribuyen a la hemostasia, una disminución del hematocrito también afecta la hemostasia (McLoughlin et al., 1996, Sheiner, 2005). También se sabe que el uso de coloides conduce a una disminución de la polimerización de fibrina (Innerhofer et al., 2002). Se ha demostrado que la hipotermia perjudica la coagulación como se muestra en el plasma humano a diferentes temperaturas (Rohrer, 1992). Martini et al. (2005) demostraron en un estudio preclínico que la hipotermia causaba un retraso en la generación de trombina. Junto con la acidosis, la hipotermia y la coagulopatía forman el "ensayo letal" del trauma (Mikhail, 1999), se desarrolla una coagulopatía potencialmente mortal en los pacientes afectados (Cosgriff et. Al, 1997). La activación del sistema fibrinolítico podría agravar la situación por el consumo de fibrinógeno y fibrina (Vorweg et al., 2001).

La sustitución con factores de coagulación y elementos celulares como eritrocitos y plaquetas es obligatoria para restablecer el equilibrio hemostático (Spivey, 2005, Spahn, 2004). El uso generalizado de plasma fresco congelado (FFP) para corregir una coagulopatía contrasta con la poca evidencia de efectividad en la literatura publicada (para revisión véase Stanworth, 2004). El uso de FFP a veces se asocia con el desarrollo de transfusiones relacionadas con la lesión pulmonar aguda (TRALI, Bux, 2005). El crioprecipitado del plasma congelado se usa ampliamente en este entorno. En base a las preocupaciones de eficacia y seguridad pobres, la búsqueda de nuevos conceptos para superar una coagulopatía dilucional, por lo tanto, sigue siendo un desafío clínico.

La invención se basa en el uso de PCC en este entorno clínico. El PCC en combinación con diversos factores de coagulación se ha propuesto anteriormente como un antídoto contra diferentes anticoagulantes, por ejemplo, contra hirudina (EP 0700684). También se han revelado composiciones farmacéuticas que comprenden al menos 2 componentes altamente purificados seleccionados del grupo que consiste en los factores II, V, Va, X y Xa opcionalmente en combinación con otros factores de coagulación para el tratamiento de pacientes con inhibidores de la hemofilia A (documento EP0796623).

En contraste con los PCC mencionados anteriormente que comprenden factores de coagulación FII, FVII, FIX y FX no activados, en el contexto clínico también se usan PCC activados. Ejemplos de esos PCC activados son FEIBA® (Immuno-Baxter) y Autoplex® (Hyland). Estos PCC activados comprenden los factores de coagulación FII, FVII, FIX y FX en forma activada. El uso de PCC activados conlleva el riesgo inherente de efectos secundarios protrombóticos, lo que hace que el uso de PCC no activados sea favorable.

En H. H. Brackmann et al., "Massive factor-VIII infusion in haemophiliac with factor-VIII inhibitor, high responder", Lancet, 29 Oct 1977, vol. 2, no. 8044, page 933, el PCC FEIBA® activado se usó en combinación con FVIII. Esta referencia revela el esquema de tratamiento de un hemofílico con inhibidor del factor VIII, que fue tratado durante varios meses con altas concentraciones de factor VIII y Feiba®.

En E. Scheibel et al., "Long-term high dose factor-VIII treatment of 3 Haemophiliacs with factor VIII inhibitor", Scandinavian Journal of Haematology, vol. 34, no. 5, 1985, pages 378-384, los PCC FEIBA® y Autoplex® activados se usaron en combinación con FVIII. Esta referencia se refiere al tratamiento de un paciente hemofílico con inhibidor

del factor VIII, que fue tratado con grandes cantidades de Factor VIII diariamente durante varios meses, mientras que en caso de sangrados agudos, se administró PCC activado adicional.

En P. L. Leggett et al., "Elective cardiac operation in a patient with severe hemophilia and acquired factor VIII antibodies", Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, vol. 87, no. 4, 1984, pages 556-560, el PCC FEIBA® activado se usó en combinación con FVIII. Esta referencia describe el tratamiento de un paciente hemofílico con un inhibidor del factor VIII adquirido sometido a cirugía cardíaca. El PCC activado se administró durante 5 días después de un cateterismo de diagnóstico, seguido de 3 meses sin ninguna dosis de factores de coagulación sanguínea. Durante y después de la operación, el factor VIII se administró durante ocho días, mientras que el día 5 después de la operación se inició el tratamiento con PCC hasta al menos el día 16 después de la operación.

En un modelo de coagulopatía por dilución resultante de la pérdida de sangre prevista y el reemplazo de líquidos recientemente, se encontró que una combinación de PCC y fibrinógeno es beneficiosa (Fries et al., 2006).

Sin embargo, en vista de la considerable morbilidad y mortalidad causadas por la coagulopatía adquirida, existe un alto interés clínico y un fuerte incentivo para aumentar aún más la eficacia del tratamiento de tales afecciones clínicas. El objeto de la presente invención es, de este modo, proporcionar terapias mejoradas adicionales para el tratamiento de coagulopatías adquiridas.

Se descubrió sorprendentemente que un tratamiento de coagulopatía adquirida con PCC aislado en combinación con una preparación farmacéutica que comprende FVIII aislado y, opcionalmente, VWF aislado conduce a una eficacia sinérgicamente mayor en comparación con el tratamiento con ya sea PCC o una preparación que comprende FVIII y VWF. La preparación para combinar con PCC aislado comprende FVIII y, opcionalmente, VWF y opcionalmente otros componentes que también pueden contribuir a la hemostasia. Una realización de la invención es la combinación de un PCC aislado con un medicamento que consiste esencialmente en FVIII y VWF.

"Aislado" en el sentido de esta invención significa, que el factor de coagulación respectivo o la mezcla de factores de coagulación se ha purificado ya sea de plasma humano o, si se produce de forma recombinante, del medio de cultivo. Purificado en el sentido de esta invención significa cualquier tipo de purificación que conduzca a una mayor actividad biológica de dicho factor de coagulación o mezcla de factores de coagulación por mg de contenido proteico total o a una mayor actividad biológica de dicho factor de coagulación o mezcla de factores de coagulación por ml de líquido que finalmente se administra al paciente, en comparación con la solución a partir de la cual se obtuvo originalmente el factor de coagulación respectivo o la mezcla de factores de coagulación.

El "uso simultáneo" en el sentido de la invención significa que la composición que comprende factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII aislados y la composición que comprende FVIII aislado y, opcionalmente, VWF aislado se mezclan y luego se administran como una mezcla a un paciente.

El "uso por separado" en el sentido de la invención significa que la composición que comprende factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII aislados y la composición que comprende FVIII aislado y, opcionalmente, VWF aislado se administran tanto al mismo tiempo o por separado uno tras otro, por lo que la secuencia de dichas administraciones no es relevante.

"Uso secuencial" en el sentido de la invención significa que la composición que comprende factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII aislados y la composición que comprende FVIII aislado y, opcionalmente, VWF aislado se administran por separado, por lo que la secuencia de dicha administración no es relevante, y por lo que el intervalo de tiempo entre ambas administraciones es como máximo 2 días, preferencialmente como máximo 1 día y más preferentemente como máximo 4 horas.

Se usó un modelo animal de una coagulopatía por dilución en cerdos hipotérmicos normotensos mediante extracción de sangre fraccionada y sustitución con hidroxietil almidón (HES) para investigar la eficacia del tratamiento propuesto. Se indujo un trauma por una incisión en el bazo, se determinó la pérdida de sangre y el tiempo de hemostasia.

La terapia de sustitución se realizó con Beriplex P/N® y ya sea Helixate® o HaemateP®. Beriplex P/N® es un concentrado de complejo de protrombina (PCC) que comprende los factores de coagulación II, VII, IX y X dependientes de la vitamina K (Schulman, 2007). Además, Beriplex P/N® contiene proteína C y proteína S. Helixate® consiste en FVIII recombinante como el componente activo. Haemate P®, es un producto que consiste esencialmente en FVIII y también en VWF.

Se indujo una coagulopatía dilucional por la retirada gradual de aproximadamente el 60% del volumen sanguíneo circulante y la retransfusión de eritrocitos. Se controló la disminución de los factores de coagulación circulantes. La función del sistema de coagulación se detectó mediante tromboelastografía y tiempo de protrombina (PT). La función plaquetaria se controló por agregación y adhesión. Un estudio de sustitución consistió en los siguientes grupos: grupo de control no tratado (sin coagulopatía dilucional), coagulopatía dilucional sin tratamiento, PCC, PCC + fibrinógeno, PCC + VWF/FVIII, PCC + rec. FVIII, VWF/FVIII, rec. FVIIa, FIX/FX y PCC + VWF. Se determinó la restauración del sistema de coagulación y el sangrado después de una lesión en el bazo.

La coagulopatía condujo a una disminución de los factores de coagulación a aproximadamente el 30% de la concentración basal. El número de plaquetas disminuyó de aproximadamente 400,000 a 100,000/µl, además, la agregación y la adhesión se vieron afectadas. PCC podría sustituir los factores de falta de protrombina (II, VII, IX y X) y mejorar la coagulación. Después de la lesión del bazo, la PCC redujo significativamente el tiempo de hemostasia y la pérdida de sangre en comparación con el control dilucional. Por otro lado, VWF/FVIII solo no cambió el resultado del estudio, ni el tratamiento con FIX o FVIIa respectivamente. En contraste, la combinación de PCC con ya sea FVIII o VWF/FVIII redujo significativamente el tiempo de hemostasia y la pérdida de sangre a valores casi normales. Esto muestra que la combinación de FVIII y, opcionalmente, VWF con PCC es significativamente más efectiva que la monoterapia con PCC sola, lo que indica un efecto sinérgico.

En el grupo tratado con VWF/FVIII, además, la capacidad de adhesión de las plaquetas aumentó significativamente, lo que indica que también la función plaquetaria alterada se podría normalizar.

En los últimos años se han realizado intentos para sustituir en condiciones de sangrado con un único componente del complejo de protrombina, a saber, la forma activada de FVII que está disponible como rec. FVIIa (para una revisión, véase Holcomb, 2005). Rec. FVIIa se puede unir directamente a la plaqueta activada e iniciar la conversión de FX a FXa sin pasar por la vía de tenase (FIXa/VIIIa). Esta es la base de la conocida eficacia de rec. FVIIa en el tratamiento de pacientes con hemofilia A y B con inhibidores de FVIII o FIX (Habermann et al., 2004). Mientras que los pacientes con inhibidores de la hemofilia tienen suficiente FX y protrombina, la situación en un paciente con una coagulopatía de dilución severa es diferente. Si FX disminuye bajo un nivel crítico rec. FVIIa carecerá de sustrato. Un agente terapéutico multicomponente tal como PCC puede ofrecer ventajas en una situación de disminución general de los factores de coagulación. La PCC sustituyó a las proteínas del complejo de protrombina, factores II, VII, IX y X. La primera y principal tarea del sistema de coagulación es asegurar la generación de trombina. La trombina tiene múltiples funciones en el sistema de coagulación: la formación de fibrina a partir del fibrinógeno, la activación de los cofactores V y VIII, la activación de FXIII y la activación de plaquetas a través del receptor de trombina. La generación de trombina requiere suficiente protrombina (FII) como sustrato del complejo de protrombinasa que contiene la forma activada de FX como la serina proteasa activa. La forma activada de FIX es la enzima del complejo tenase, que junto con FVIII convierte FX a FXa. Es tentador creer que las cuatro enzimas del complejo de protrombina son indispensables para generar trombina. Nuestros datos sugieren que es obligatorio suministrar suficientes factores complejos de protrombina para iniciar el estallido de trombina y que la combinación de PCC con FVIII y, opcionalmente, composiciones que comprenden VWF reconstituye efectivamente la cascada de coagulación deteriorada y acorta significativamente el tiempo de hemostasia.

La invención se refiere a dos composiciones farmacéuticas según la reivindicación 1 que, cuando se combinan, muestran un efecto sinérgico.

La primera composición farmacéutica que comprende factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII aislados para usar en la presente invención y la segunda composición farmacéutica que comprende FVIII aislado y, opcionalmente, VWF aislado, se pueden fabricar como dos composiciones independientes, que se pueden vender por separado, o se pueden combinar en un kit como composiciones farmacéuticas separadas o se pueden fabricar para que estén compuestas en una sola composición farmacéutica como una mezcla de todos los componentes.

Por lo tanto, la invención se refiere a una composición que comprende factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII aislados y una composición que comprende FVIII aislado y, opcionalmente, VWF aislado para uso simultáneo, separado o secuencial en un procedimiento de tratamiento de sangrado adquirido, en el que las composiciones comprenden factores de coagulación que no han sido activados.

La invención se refiere además al uso de una composición que comprende factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII aislados y una composición que comprende FVIII aislado y, opcionalmente, VWF para la fabricación de preparaciones farmacéuticas para uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia de sangrado adquirido, en la que las composiciones comprenden factores de coagulación que no han sido activados.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de una composición que comprende factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII aislados y una composición que comprende FVIII aislado y, opcionalmente, VWF para la fabricación de una preparación farmacéutica combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia de sangrado adquirido, en el que las composiciones comprenden factores de coagulación que no han sido activados. Todas las composiciones de la invención comprenden factores de coagulación que no han sido activados.

En una realización preferida de la invención, los factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII aislados son un concentrado de complejo de protrombina (PCC) derivado de sangre humana o un PCC reconstituido a partir de factores de coagulación expresados de forma recombinante en los que las proporciones de antígeno y actividad de dichos factores de coagulación expresados de forma recombinante FII, FIX, FX y FVII corresponden a PCC derivados de la sangre.

El concentrado de complejo de protrombina (PCC) en el sentido de la presente invención comprende una combinación de factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII. PCC también puede contener proteína C y proteína S.

Las composiciones de PCC aisladas que se enumeran en la Tabla I están abarcadas por la presente invención. El plasma fresco congelado contiene, por definición, 1 IU/ml, de este modo la concentración de los factores del complejo de protrombina se enriquece varias veces en PCC.

La PCC aislada en el sentido de la invención abarca composiciones de PCC en las que cada factor de coagulación individual está presente en un líquido o si se almacena liofilizado en el líquido después de la reconstitución antes de la inyección en al menos un factor de 2,5 en comparación con su concentración en sangre.

Tabla 1: Composiciones de PCC preferidas

a) componentes esenciales			
	La más preferida	Más preferida	Preferida
Factor II	20-48 IU/ml	10-90 IU/ml	5-180 IU/ml
Factor VII	10-25 IU/ml	5-50 IU/ml	2.5-100 IU/ml
Factor IX	20-35 IU/ml	10-60 IU/ml	5-120 IU/ml
Factor X	22-60 IU/ml	10-120 IU/ml	5-240 IU/ml
b) componentes opcionales			
	La más preferida	Más preferida	Preferida
Proteína C	15-45 IU/ml	8-90 IU/ml	4-180 IU/ml
Proteína S	13-26 IU/ml	6-50 IU/ml	3-100 IU/ml

El factor de coagulación funcional II (FII) muestra la actividad biológica de la protrombina, que representa la proenzima inactiva de la trombina (FIIa). Después de la activación de la cascada de coagulación, tiene lugar la conversión de protrombina en trombina, las últimas funciones de activación múltiple en el sistema de coagulación incluyen, entre otras, la conversión de fibrinógeno en fibrina, la activación del factor de coagulación XIII (FXIII) en el factor de coagulación XIII (XIIIa) activados, activación de FV y FVIII a FVa y VIIIa, activación de plaquetas después de la proteólisis parcial del receptor de trombina.

El factor de coagulación funcional IX (FIX) muestra la actividad biológica de FIX inactivo, que se convierte tras la activación de la coagulación en el FIXa activo. FIXa forma un complejo con su coenzima FVIIIa y representa el complejo tenase, que escinde el FX inactivo en su forma activa FXa.

El factor de coagulación funcional X (FX) muestra la actividad biológica del FX inactivo que se convierte en FXa activo después de la activación de la coagulación. FXa forma un complejo con su coenzima FVa que representa el complejo de protrombinasa que escinde la protrombina inactiva (FII) en la trombina activa (FIIa).

El factor de coagulación funcional FVII (FVII) muestra la actividad biológica del FVII inactivo que se convierte durante la activación de la coagulación en FVIIa. FVIIa junto con el factor tisular convierte el FX inactivo en el FXa activo. Además, FVIIa puede convertir FIX inactivo a FIXa activo.

El factor VIII funcional de coagulación (FVIII) muestra la actividad biológica de la coenzima FVIII, que se convierte en FVIIIa durante la activación de la coagulación. FVIIIa es la coenzima para la proteasa FIXa y forma un complejo con FIXa. El complejo FVIIIa/FIXa escinde el FX inactivo para formar FXa activado.

El FVIII aislado en el sentido de la invención abarca composiciones de FVIII en las que el FVIII está presente en un líquido o si se almacena liofilizado en el líquido después de la reconstitución antes de la inyección en una concentración que es al menos un factor de 2.5 mayor que la concentración de FVIII en sangre.

El factor funcional de von Willebrand (VWF) muestra la actividad biológica de VWF, una proteína multimérica grande con múltiples sitios de unión responsables de colocar los trombocitos en el sitio de la lesión. El VWF se une al trombocito a través de su dominio A1 y al colágeno en el sitio de la lesión con su dominio A3. De este modo, media la adhesión de trombocitos. Además, la agregación de trombocitos se induce mediante la unión de VWF al receptor αIIb/β3 y VWF estabiliza el FVIII circulante.

El VWF aislado en el sentido de la invención abarca las composiciones de VWF en las que el VWF está presente en un líquido o si se almacena liofilizado en el líquido después de la reconstitución antes de la inyección en una concentración que es al menos un factor de 2,5 mayor que la concentración de VWF en sangre.

La actividad de los factores de coagulación discutidos anteriormente se puede medir según L. Thomas: Clinical Laboratory Diagnostics, TH-Books, Frankfurt, 1998, Chapter 17.

Las composiciones preferidas de una preparación combinada que comprende FVIII y VWF se indican en la tabla 2:

Tabla 2: Composiciones de preparaciones de combinación preferidas que comprenden FVIII y VWF

	La más preferida	Más preferida	Preferida
Factor VIII	20-40 IU/ml	10-60 IU/ml	5-120
VWF	50-100 IU/ml	25-160 IU/ml	13-320

Tabla 3: Combinaciones preferidas entre PCC y FVIII/VWF

(X_n representa respectivamente una de las nueve combinaciones preferidas de una concentración de PCC preferida y una concentración preferida de FVIII/VWF)			
Concentración preferida de FVIII/VWF (en base a unidades FVIII)	Concentración preferida PCC (en base a unidades FIX)		
	La más preferida 20-35 IU/ml	Más preferida 10-60 IU/ml	Preferida 5-120 IU/ml
La más preferida 20-40 IU/ml	X_1	X_2	X_3
Más preferida 10-60 IU/ml	X_4	X_5	X_6
Preferida 5-120 IU/ml	X_7	X_8	X_9

Los factores de coagulación usados en dichas composiciones farmacéuticas se pueden obtener a partir de plasma o suero humano o de forma recombinante. Los "factores de coagulación" como se usan en la presente invención comprenden proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos de los factores de coagulación humanos nativos. También se incluyen factores de coagulación con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal modificado que incluye deleciones o adiciones de aminoácidos N-terminales siempre que esas proteínas retengan sustancialmente la actividad de los factores de coagulación. Los "factores de coagulación" dentro de la definición anterior también comprenden variaciones alélicas naturales que pueden existir y ocurrir de un individuo a otro. Los "factores de coagulación" dentro de la definición anterior comprenden además variantes de tales factores de coagulación. Tales variantes difieren en uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de tipo salvaje. Los ejemplos de tales diferencias pueden incluir el truncamiento del terminal N y/o C por uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, de 1 a 10 residuos de aminoácidos), o la adición de uno o más residuos adicionales en el terminal N y/o C, por ejemplo, la adición de un residuo de metionina en el terminal N, así como sustituciones conservadoras de aminoácidos, esto es, sustituciones realizadas dentro de grupos de aminoácidos con características similares, por ejemplo, (1) aminoácidos pequeños, (2) aminoácidos ácidos, (3) aminoácidos polares, (4) aminoácidos básicos, (5) aminoácidos hidrófobos, (6) aminoácidos aromáticos. En la siguiente tabla se muestran ejemplos de tales sustituciones conservadoras.

(1)	Alanina	Glicina		
(2)	Ácido aspártico	Ácido glutámico		
(3a)	Asparagina	Glutamina		
(3b)	Serina	Treonina		
(4)	Arginina	Histidina	Lisina	
(5)	Isoleucina	Leucina	Metionina	Valina
(6)	Fenilalanina	Tirosina	Triptófano	

Los "factores de coagulación funcionales" tal como se usan en la presente invención comprenden moléculas de factor de coagulación que muestran actividad biológica en solución y/o en superficies celulares como se describe anteriormente.

El término "recombinante" significa, por ejemplo, que la variante se ha producido en un organismo huésped mediante técnicas de ingeniería genética.

Las células huésped de la invención se pueden emplear en un procedimiento de producción de factores de coagulación humanos. El procedimiento comprende:

a) cultivar células huésped de la invención en condiciones tales que se expresen uno o más factores de coagulación humanos; y

b) opcionalmente recuperar uno o más factores de coagulación humanos de las células huésped o del medio de cultivo.

El grado y la ubicación de la glicosilación u otras modificaciones posteriores a la traducción pueden variar dependiendo de las células huésped elegidas y la naturaleza del entorno celular del huésped. Cuando se hace referencia a secuencias de aminoácidos específicas, las modificaciones postraduccionales de tales secuencias están incluidas en esta solicitud.

La producción de proteínas recombinantes a altos niveles en células huésped apropiadas requiere el ensamblaje de los ADNc modificados mencionados anteriormente en unidades transcripcionales eficientes junto con elementos reguladores apropiados en un vector de expresión recombinante, que se puede propagar en diversos sistemas de expresión según los procedimientos conocidos para los expertos en el arte. Los elementos reguladores transcripcionales eficientes se podrían derivar de virus que tienen células animales como sus huéspedes naturales o del ADN cromosómico de las células animales. Preferiblemente, las combinaciones de promotor-potenciador derivadas del Simian Virus 40, adenovirus, virus de polioma BK, citomegalovirus humano o la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, o combinaciones de promotor-potenciador que incluyen genes fuertemente transcritos constitutivamente en células animales como betaactina o GRP78 pueden ser usado. Para lograr altos niveles estables de ARNm transcrito a partir de los ADNc, la unidad transcripcional debe contener en su parte proximal 3' una región de ADN que codifique una secuencia de poliadenilación de terminación transcripcional. Preferiblemente, esta secuencia se deriva de la región transcripcional temprana Simian Virus 40, el gen de beta-globina de conejo o el gen activador de plasminógeno tisular humano.

Los ADNc se integran luego en el genoma de una línea celular huésped apropiada para la expresión de los factores de coagulación. Preferiblemente, esta línea celular debe ser una línea celular animal de origen vertebrado para asegurar el plegamiento correcto, la síntesis de Gladomain, la formación de enlaces disulfuro, la glicosilación ligada a asparagina, la glicosilación ligada a O y otras modificaciones postraduccionales, así como la secreción en el medio de cultivo. Ejemplos de otras modificaciones postraduccionales son la hidroxilación y el procesamiento proteolítico de la cadena polipeptídica naciente. Ejemplos de líneas celulares que se pueden usar son células COS de mono, células L de ratón, células C127 de ratón, células BHK-21 de hámster, células 293 de riñón embrionario humano y, preferentemente, células CHO de hámster. Debido a sus modificaciones postraduccionales complejas recombinantes. Los factores de coagulación se expresan preferiblemente en líneas celulares humanas.

El vector de expresión recombinante que codifica los ADNc correspondientes se puede introducir en una línea celular animal de varias maneras diferentes. Por ejemplo, se pueden crear vectores de expresión recombinantes a partir de vectores en base a diferentes virus animales. Ejemplos de estos son vectores en base a baculovirus, vaccinia virus, adenovirus y preferiblemente virus del papiloma bovino.

Las unidades de transcripción que codifican los ADN correspondientes también se pueden introducir en células animales junto con otro gen recombinante, que puede funcionar como un marcador seleccionable dominante en estas células para facilitar el aislamiento de clones celulares específicos, que han integrado el ADN recombinante en su genoma. Ejemplos de este tipo de genes marcadores seleccionables dominantes son Tn5 aminoglucósido fosfotransferasa, que confiere resistencia a la geneticina (G418), higromicina fosfotransferasa, confiere resistencia a la higromicina y puromicina acetil transferasa, que confiere resistencia a la puromicina. El vector de expresión recombinante que codifica dicho marcador seleccionable puede residir en el mismo vector que el que codifica el ADNc de la proteína deseada, o se puede codificar en un vector separado que se introduce e integra simultáneamente en el genoma de la célula huésped, con frecuencia resulta en un enlace físico estrecho entre las diferentes unidades de transcripción.

Otros tipos de genes marcadores seleccionables, que se pueden usar junto con el ADNc de la proteína deseada, se basan en diversas unidades de transcripción que codifican la dihidrofolato reductasa (dhfr). Después de la introducción de este tipo de gen en las células que carecen de actividad dhfr endógena, preferentemente las células CHO (DUKX-B11, DG-44) les permitirá crecer en medios que carecen de nucleósidos. Un ejemplo de dicho medio es Ham's F12 sin hipoxantina, timidina y glicina. Estos genes dhfr se pueden introducir junto con las unidades transcripcionales de ADNc del factor de coagulación en células CHO del tipo anterior, ya sea unidas en el mismo vector o en diferentes vectores, creando de este modo líneas celulares positivas para dhfr que producen proteína recombinante.

Si las líneas celulares anteriores se cultivan en presencia del metotrexato citotóxico inhibidor de dhfr, surgirán nuevas líneas celulares resistentes al metotrexato. Estas líneas celulares pueden producir proteína recombinante a una velocidad aumentada debido al número amplificado de dhfr unido y las unidades transcripcionales de la proteína deseada. Al propagar estas líneas celulares en concentraciones crecientes de metotrexato (1-10000 nM), se pueden obtener nuevas líneas celulares que producen la proteína deseada a una velocidad muy alta.

Las líneas celulares anteriores que producen la proteína deseada se pueden cultivar a gran escala, ya sea en cultivo en suspensión o en diversos soportes sólidos. Ejemplos de estos soportes son microportadores en base a matrices de dextrano o colágeno, o soportes sólidos en forma de fibras huecas o diversos materiales cerámicos. Cuando se cultiva en cultivo de suspensión celular o en microportadores, el cultivo de las líneas celulares anteriores se puede realizar ya sea como un cultivo de baño o como un cultivo de perfusión con producción continua de medio acondicionado durante largos períodos de tiempo. De este modo, según la presente invención, las líneas celulares anteriores son muy apropiadas para el desarrollo de un procedimiento industrial para la producción de las proteínas recombinantes deseadas.

La proteína recombinante, que se acumula en el medio de las células secretoras de los tipos anteriores, puede concentrarse y purificarse mediante una variedad de procedimientos bioquímicos y cromatográficos, que incluyen procedimientos que usan diferencias en tamaño, carga, hidrofobicidad, solubilidad, afinidad específica, etc. entre la proteína deseada y otras sustancias en el medio de cultivo celular.

Un ejemplo de tal purificación es la adsorción de la proteína recombinante a un anticuerpo monoclonal, que se inmoviliza sobre un soporte sólido. Después de la desorción, la proteína se puede purificar aún más mediante una variedad de técnicas cromatográficas en base a las propiedades anteriores.

Se prefiere purificar los factores de coagulación de la presente invención, irrelevantes ya sean producidos por medios recombinantes u obtenidos a partir de plasma humano, hasta una pureza ≥ 60%, más preferiblemente una pureza ≥ 80%, y se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente puro que es más de 95% puro con respecto a las macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y libre de agentes infecciosos y pirogénicos.

Los factores de coagulación descritos en la presente invención se pueden formular en preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. La proteína purificada se puede disolver en soluciones reguladoras acuosas fisiológicamente compatibles convencionales a las que se pueden agregar, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas.

Tales portadores y excipientes farmacéuticos, así como las formulaciones farmacéuticas apropiadas, son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3rd edition, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)). En particular, la composición farmacéutica que comprende la variante de polipéptido de la invención se puede formular en forma soluble liofilizada o estable. La variante de polipéptido se puede liofilizar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes de su uso mediante la adición de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

Las formulaciones de la composición se administran al individuo por cualquier medio de administración farmacéuticamente apropiado. Se conocen diversos sistemas de suministro y se pueden usar para administrar la composición por cualquier ruta conveniente. Preferentemente, las composiciones de la invención se administran sistémicamente. Para uso sistémico, los factores de coagulación de la invención se formulan para la administración parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmico o vaginal) o enteral (por ejemplo, oral o rectal) según procedimientos convencionales. Las vías de administración más preferenciales son la administración intravenosa y subcutánea. Las formulaciones se pueden administrar continuamente por infusión o por inyección en bolo. Algunas formulaciones abarcan sistemas de liberación lenta.

Los factores de coagulación de la presente invención se administran a pacientes en una dosis terapéuticamente eficaz, lo que significa una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados, evitando o disminuyendo la gravedad o la propagación de la afección o indicación que se está tratando sin alcanzar una dosis que produce efectos secundarios adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores como por ejemplo, la indicación, formulación, modo de administración y se debe determinar en ensayos preclínicos y clínicos para cada indicación respectiva.

Los factores de coagulación de la presente invención se pueden usar para tratar sangrados, que inducen:

- Todos los tipos de traumas, (contundentes o penetrantes, que provocan hemorragia grave, ya sea por un solo órgano, una fracción ósea o por politraumatismos.

- Sangrado durante los procedimientos quirúrgicos, incluida la hemorragia peri o postoperatoria.

- Sangrado debido a cirugía cardíaca, incluidos pacientes sometidos a circulación extracorporal y hemodilución en cirugía cardíaca pediátrica

- Hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnoidea, sangrado sub o epidural

- Sangrado debido a la pérdida de sangre y hemodilución, por sustitución de volumen no plasmático que conduce a niveles reducidos de factores de coagulación en pacientes afectados

- Sangrado debido a la coagulación intravascular diseminada (DIC) y una coagulopatía de consumo.

- Disfunciones de trombocitos, agotamiento y coagulopatías.

- Sangrado debido a cirrosis hepática, disfunción hepática e insuficiencia hepática fulminante.

- Biopsia hepática en pacientes con enfermedad hepática.

- Sangrado después de trasplantes de hígado y otros órganos.

- Sangrado de varices gástricas y sangrado de úlcera péptica

- Sangrados ginecológicos como sangrado uterino disfuncional (DUB), desprendimiento prematuro de la placenta.

- Hemorragia periventricular en niños con bajo peso al nacer

- Hemorragia posparto

- Angustia fatal de los recién nacidos

- Sangrado asociado con quemaduras

- Sangrado asociado con amiloidosis

- Trasplante de células madre hemotopoyéticas asociado con trastorno plaquetario

- Sangrados asociados con tumores malignos.

- Infecciones por virus hemorrágicos.

- Sangrado asociado con pancreatitis

Figuras

Figura 1: Pérdida de sangre (se usó un modelo animal de una coagulopatía dilucional en cerdos hipotérmicos normotensos por extracción de sangre fraccionada y sustitución con hidroxietil almidón (HES) para investigar la eficacia del tratamiento propuesto. Se indujo un trauma por una incisión en el bazo, se determinó la pérdida de sangre. La terapia de sustitución se realizó con Beriplex P/N® y ya sea Helixate® o Haemate P®. Beriplex P/N® es un concentrado de complejo de protrombina (PCC) que comprende los factores de coagulación II, VII, IX y X dependientes de la vitamina K (Schulman, 2007). Además, Beriplex P/N® contiene proteína C y proteína S. Helixate® consiste en FVIII recombinante como el componente activo. Haemate P®, es un producto que consiste esencialmente de FVIII así como de VWF.)

Ejemplo 1: modelo de cerdo de coagulopatía dilucional y trauma del bazo

Los cerdos estuvieron en ayunas durante la noche pero tuvieron libre acceso al agua. Los animales se premedicaron por vía intramuscular con una mezcla de 2 mg/kg de azaperona (Stresnil/Janssen), 15 mg/kg de ketamina (Ketavet/Pfitzer) y 0,02 mg/kg de atropinsulfato (atropinsulfato, B. Braun). La anestesia fue inducida por 10 mg/kg de tiopental sódico a través de una vena del oído. Los cerdos fueron intubados y con respiración a través de un ventilador Heyer Access. La anestesia por inhalación se mantuvo con isoflurano (Forene, Abbott), la concentración fue de 1-2%, dependiendo del estado de la anestesia.

Se introdujo un catéter de 1,4 x 2,1 mm en el A. carotis para la recogida de muestras de sangre y se colocó un catéter de 0,5 x 0,9 mm en el A. femoralis para las mediciones continuas de la presión arterial. Se introdujo un catéter de 1,4 x 2,1 mm en el V. jugularis externo para la extracción de sangre y la administración de eritrocitos, expansor de plasma y sustancias de prueba. El requerimiento básico de líquido se logró mediante la administración intravenosa de Ringer Lactato (4 ml/kg x h). La temperatura corporal se midió con un termómetro rectal.

Después de un período de 30 min. para permitir la estabilización de la circulación basal se evaluaron los parámetros hemodinámicos, de coagulación y hematológicos (t=0). Posteriormente, se indujo una coagulopatía de dilución hipotérmica normotensiva por extracción gradual de sangre. Para la reinfusión de los eritrocitos se centrifugó la sangre (800 x g, 10 minutos), los glóbulos rojos se resuspendieron en NaCl para alcanzar el volumen inicial. Después de la

resuspensión, los eritrocitos se centrifugaron nuevamente, se resuspendieron en la mitad del volumen inicial en Ringer-Lactato y se volvieron a infundir al animal. Después de la extracción de aproximadamente el 65-70% de la sangre arterial, se infundió por vía intravenosa 6% de hidroxietil almidón (HES, Infukoll 6%, Schwarz Pharma) a temperatura ambiente.

Después de la infusión de HES, se tomaron nuevamente muestras de sangre (t = 80 min.) y se permitió que el animal se estabilizara durante 40 minutos. Se extrajo la tercera muestra de sangre (t = 120 min.) y se realizó una incisión estandarizada en el bazo (8 cm de longitud, 1 cm de profundidad) con una cuchilla de bisturí.

Se succionó sangre del abdomen y se determinó la pérdida total de sangre y el tiempo hasta la hemostasia. Las sustancias de prueba se infundieron poco antes de la incisión en el bazo.

Los cerdos sometidos al procedimiento de dilución tuvieron una hipotermia leve, la temperatura bajó desde 38,5 ºC a 36 ºC. La presión arterial disminuyó después de la extracción de sangre, pero volvió a los valores basales después de la sustitución con HES y permaneció en un nivel constante hasta que se realizó la lesión del bazo. Antes de la lesión del bazo, el hematocrito había disminuido al 60% de su valor basal.

Terapia de sustitución

Los siguientes compuestos se usaron para la terapia de sustitución. Beriplex® P/N (CSL Behring, Marburg, Alemania) es un concentrado de complejo de protrombina (PCC) humano inactivado por virus. Contiene los factores de coagulación II, VII, IX y X de plasma humano, así como la proteína C y S. Humate® P (CSL Behring) es un complejo del factor de coagulación VIII de plasma humano y el factor von Willebrandt (VWF). Haemocomplettan® (CSL Behring, Marburg, Alemania) es un concentrado de fibrinógeno a partir de plasma humano. NovoSeven® (factor recombinante VIIa) era de NovoNordisk. Helixate® (CSL Behring) es un FVIII recombinante. FIXP Behring (CSL Behring) es un producto que contiene FIX y FX del plasma humano. El vWF se purificó a partir de plasma humano.

Los grupos de tratamiento fueron los siguientes: 1: cerdos normales (control negativo, n = 5), 2: control de dilución (sin tratamiento) (n= 16), 3: Beriplex P/N® 35 U/kg (unidades del Factor IX), 4: Beriplex P/N® 35 U/kg + Haemcomplettan® 250 mg/kg, 5: Beriplex P/N® 20-35 U/kg + Haemate® 40 U/kg (unidades del Factor VIII) (n = 14) 6: Haemate® 40 U/kg (n = 5). 7. NovoSeven® 180 μg/kg (n = 5). 8. Beriplex® P/N 30 U/kg + Helixate® (rec. FVIII) 40 U/kg (n = 3), 9. FIX P 30 U/kg (unidades del Factor IX) (n = 3), 10. Beriplex® P/N + VWF de plasma humano 90 U/kg (unidades del VWF), (n = 3)

Tabla 4: efecto sinérgico de una terapia combinada con PCC y VWF

Resultados de un trauma por incisión en el bazo en cerdos: tiempo de hemostasia y pérdida de sangre		
Tratamiento	**Tiempo hasta la hemostasia (min.)**	**Pérdida de sangre (ml)**
1. Control negativo (n=5)	20,6 ± 7,8	83,2 ± 63,5
2. Control de dilución (n=16)	86,7 ± 24,1	657,5 ± 298,5
3. Beriplex® P/N (n=5)	37,6 ±13,6 2-3 p<0,001	405,8 ± 223,1
4. Beriplex® P/N + Haemocomplettan®P (n=5)	39,6 ± 11,9 2-4 p<0,001	334,5 ± 137,7 2-4 p<0,05
5. Beriplex® P/N + Haemate® P (n=14)	29,6 ± 7,1 2-5 p<0,0001	190,4 ± 85,0 2-5 p<0,00011
6. Haemate® P (n=5)	68,8 ± 27,8	471,0 ± 234,6
7. NovoSeven (n=5)	91,8 ± 26,2	729 ± 265

Resultados de un trauma por incisión en el bazo en cerdos: tiempo de hemostasia y pérdida de sangre		
Tratamiento	**Tiempo hasta la hemostasia (min.)**	**Pérdida de sangre (ml)**
8. Beriplex P/N + rec. FVIII (Helixate) (n=3)	33,7 ± 4,6 2-8 p<0,01	178 ± 58,8 2-8 p<0,02
9. FIX + FX (n=3)	115,0 ± 7,1	953 ± 232
10. Beriplex P/N + VWF de plasma humano	27,7 ± 3,1 2-10 p<0,001	257,3 ± 42,6 2-10 p<0,05

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII aislados y una composición que comprende FVIII aislado y, opcionalmente, VWF aislado para uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia de sangrado adquirido, en la que las composiciones comprenden factores de coagulación que no han sido activados.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que los factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII aislados son un concentrado de complejo de protrombina (PCC) derivado de sangre humana o un PCC reconstituido a partir de factores de coagulación expresados de forma recombinante en los que las proporciones de antígeno y la actividad de dichos factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII expresados de forma recombinante corresponden a PCC derivados de sangre humana.

3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia de:

- Trauma

o

- Sangrado durante los procedimientos quirúrgicos.

o

- Sangrado debido a cirugía cardíaca

o

- Hemorragia intracerebral

o

- Hemorragia subaracnoidea

o

- Sangrado sub o epidural

o

- Sangrados debido a la pérdida de sangre y hemodilución, por sustitución de volumen no plasmático que conduce a niveles reducidos de factores de coagulación en pacientes afectados

o

- Sangrado debido a la coagulación intravascular diseminada (DIC) y una coagulopatía de consumo.

o

- Trombocitopenia

o

- Disfunciones de trombocitos

o

- Sangrado debido a cirrosis hepática, disfunción hepática e insuficiencia hepática fulminante.

o

- Sangrado debido a biopsia hepática en pacientes con enfermedad hepática.

o

- Sangrado después de trasplantes de hígado y otros órganos.

o

- Sangrado de varices gástricas y sangrado de úlcera péptica

o

- Sangrados ginecológicos

o

- Hemorragia periventricular en niños con bajo peso al nacer

o

- Hemorragia posparto

o

- Angustia fatal de los recién nacidos

o

- Sangrado asociado con quemaduras

o

- Sangrado asociado con amiloidosis

o

- Trasplante de células madre hemotopoyéticas asociado con trastorno plaquetario

o

- Sangrados asociados con tumores malignos.

o

- Infecciones por virus hemorrágicos.

o

- Sangrado asociado con pancreatitis

4. Uso de una composición que comprende factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII aislados y una composición que comprende FVIII aislado y VWF opcionalmente aislado para la fabricación de preparaciones farmacéuticas para uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia de sangrado adquirido, en la que las composiciones comprenden factores de coagulación que no han sido activados.

5. Uso de una composición que comprende factores de coagulación FII, FIX, FX y FVII aislados y una composición que comprende FVIII aislado y opcionalmente VWF aislado para la fabricación de una preparación farmacéutica combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia de sangrado adquirido, en la que las composiciones comprenden factores de coagulación que no han sido activados.
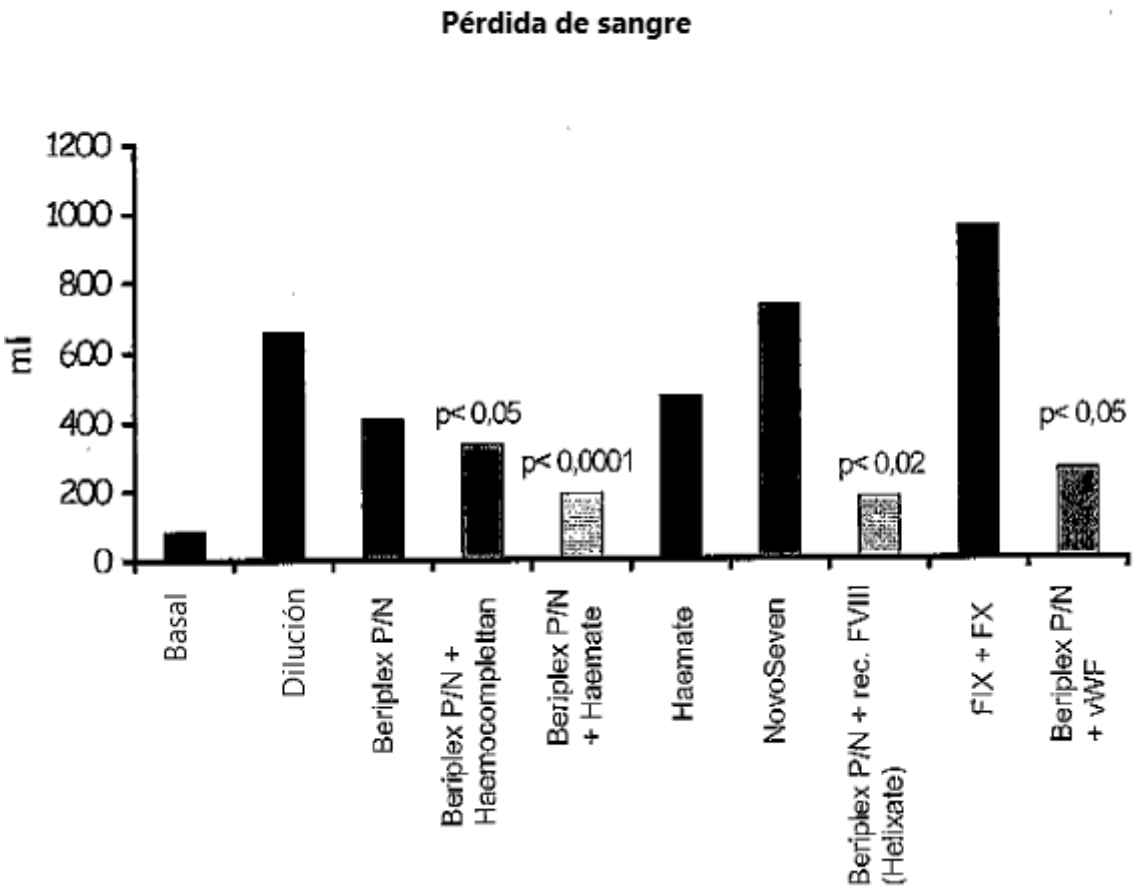
Figura 1) Pérdida de sangre