

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 829**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61P 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2015 PCT/EP2015/069176**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16030278**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2015 E 15753942 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3185891**

54 Título: **Proteínas de fusión recombinantes para la prevención o el tratamiento de adherencias en tejidos u órganos**

30 Prioridad:
26.08.2014 DE 102014112212

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2020

73 Titular/es:
**AKESION GMBH (100.0%)
Sonnenblumenweg 10
69198 Schriesheim, DE**

72 Inventor/es:
**RÜBSAMEN, KLAUS y
WITTE, STEPHAN**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 799 829 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

Proteínas de fusión recombinantes para la prevención o el tratamiento de adherencias en tejidos u órganos

5 Bajo condiciones de curación normales, el organismo de los mamíferos reacciona a una lesión con procesos de cicatrización que se desarrollan de forma específica. Éstos conducen a la formación de fibrina, una sustancia pegajosa responsable del cierre de las heridas. El fibrinógeno, el precursor de la fibrina, circula en la sangre y sale en el área de la lesión en forma de líquido de herida (exudado). El fibrinógeno se transforma en fibrina insoluble por la acción de trombina formada localmente, de modo que la herida se cierra en un plazo de unos minutos. La fibrina en exceso se descompone rápidamente mediante la acción de plasmina a través del sistema fibrinolítico endógeno que se activa simultáneamente.

Campo técnico:

15 Las adhesiones de tejido o adherencias son el resultado de un proceso de cicatrización mal dirigido, que se ha de atribuir a un desequilibrio del sistema fibrinolítico endógeno (Hellebrekers et al., 2005; Hellebrekers & Kooistra, 2011). En caso de lesiones en el abdomen provocadas por accidente o por cirugía, la descomposición de fibrina resulta perjudicada por la activación de inhibidores de plasmina, en particular por PAI-1, PAI-2 y α_2 -antiplasmina. La fibrina en exceso no descompuesta conduce en consecuencia a adherencias de tejidos y órganos adyacentes, que en unos días se transforman en adherencias permanentes mediante el crecimiento de fibroblastos y vasos sanguíneos (Arung et al., 2011). Estas adherencias se pueden producir tanto entre órganos independientes como entre órganos y el peritoneo. La limitación de la movilidad de los órganos provocada por ello se manifiesta en muchos casos en forma de dolores crónicos o, en caso de pacientes de sexo femenino, en esterilidad, y en casos graves, debido a la degradación de la peristalsis intestinal, puede conducir a una oclusión intestinal potencialmente mortal.

25 Estado de la técnica:
De acuerdo con un análisis retrospectivo de la Scottish National Health Service Medical Record Linkage Database, en mucho más de la mitad de todas las intervenciones quirúrgicas en el abdomen aparecen adherencias (Ellis et al. 1999). Aproximadamente en una tercera parte de los pacientes con adherencias, los síntomas clínicos fueron tan graves que tuvieron que ser operados de nuevo ya en el primer año después de la operación. La gran cantidad de operaciones múltiples muestra que el riesgo de más adherencias aumenta significativamente con la cantidad de operaciones (Parker et al, 2001, 2005).

35 De acuerdo con un metaanálisis de 196 estudios con un total de 150.797 pacientes, después de un 9% de las operaciones abdominales se produjo una oclusión intestinal como complicación grave (Broek et al., 2013a), confirmándose en el intraoperatorio en cirugías de emergencia que la adherencia fue la causa de un 2% de las oclusiones. En un 6% de las operaciones posteriores para la eliminación de adherencias se ocasionaron daños consecuentes graves en órganos internos. En este contexto, las lesiones del intestino durante la eliminación quirúrgica de adherencias constituyen el factor de riesgo aislado más importante (Brummer et al. 2011). Los costes adicionales del gasto en tiempo y material a causa de las adherencias son considerables. En 138 hospitalizaciones debidas a obstrucciones intestinales posoperatorias (Kössi et al. 2003) se requirieron en total 1.118 días de tratamiento estacionario.

45 Sobre la base de los datos de la "2005 Healthcare Cost and Utilization Project's Nationwide Inpatient Sample", Sikirica et al. (2011) calcularon unos costes totales de 2.300 millones de dólares estadounidenses para la eliminación de secuelas quirúrgicas producidas por adherencias. De ellos, 1.400 millones de dólares estadounidenses correspondieron a la adhesiolisis primaria y 926 millones de dólares estadounidenses a adhesiolisis secundarias. Las secuelas de operaciones abdominales producidas por adherencias ocasionaron un total de 57.005 días de hospitalización adicionales. De acuerdo con un análisis de los datos sobre enfermedades basados en la "National Hospital Discharge Database" de EE. UU., 1994, para la eliminación posterior de adherencias se requirieron en total 846.415 días de hospitalización adicionales, que ocasionaron unos gastos adicionales de 1.300 millones de dólares estadounidenses al año (Ray et al., 1998).

55 Estos datos farmacoeconómicos demuestran la necesidad y el beneficio potencial, tanto para el paciente individual como para el sistema sanitario, de una profilaxis de adherencias eficaz y segura. La única terapia posible de adherencias peritoneales consiste en la separación quirúrgica de las superficies unidas por crecimiento y los órganos. Debido al riesgo elevado de formación de nuevas adherencias a causa de la nueva intervención, los métodos profilácticos adecuados para reducir el riesgo de formación de adherencias tienen una especial importancia.

60 Como métodos profilácticos para evitar adhesiones y adherencias se puede optimizar la técnica quirúrgica o se pueden utilizar métodos mecánicos para la separación física de las superficies dañadas. Por último, existen estrategias farmacológicas para influir en los procesos fisiopatológicos subyacentes (resumidas en Arung et al., (2011); Schnüriger et al., (2011)).

65

- 5 Mediante el empleo de técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas (laparoscopia), el riesgo de adhesiones y adherencias parece ser algo menor en comparación con la técnica quirúrgica convencional con el abdomen abierto (laparotomía) (Broek et al., 2013b; Schnüriger et al., 2011). La diferencia se debe presumiblemente al menor tamaño de la superficie de la herida en comparación con la laparotomía, la menor manipulación de los tejidos y órganos, y el menor riesgo de infección en general de esta técnica quirúrgica (SCAR Group, 2013). A pesar de las numerosas mejoras de la técnica quirúrgica, las adherencias como consecuencia de intervenciones quirúrgicas en el abdomen representan un riesgo inalterablemente alto de complicaciones, como por ejemplo dolores crónicos, esterilidad o incluso oclusión intestinal (Wallwiener et al., 2014).
- 10 Otro método utilizado actualmente para reducir el riesgo de adherencias posoperatorias consiste en la separación mecánica de las áreas de tejido dañadas mediante el uso de barreras de diferentes materiales biocompatibles o mediante la instilación de una cantidad mayor de líquido en el abdomen. La medida utilizada con mayor frecuencia consiste en la introducción de membranas finas de materiales biodegradables, que se introducen y se fijan entre las superficies dañadas. Mediante la separación mecánica de las superficies de los órganos, éstos se pueden curar de forma aislada, lo que ha de conducir a la prevención de adherencias. Sobre la superficie dañada se colocan como membrana, por ejemplo, composiciones como ácido hialurónico y carboximetil celulosa (Seprafilm). Además, se utilizó ácido hialurónico para evitar adherencias en caso de miomectomía, lo que condujo a una reducción de las adherencias (Fossum et al. 2011). Otras composiciones conocidas son polietilenglicoles formadores de gel, óxido de polietileno en combinación con carboximetil celulosa sódica o celulosa regenerada oxigenada. Otros ejemplos de barreras de adherencia de este tipo se describen en la publicación US 8629314A y, en forma de una nueva barrera de adherencia de múltiples capas, en el documento US 20080254091A.
- 15 Algunas estrategias experimentales abordan la utilización de sustancias químicas con el objetivo de intervenir en el proceso fisiopatológico de la formación de adherencias en una etapa temprana. Esta fase inicial de la adherencia, que solo dura unas horas, se caracteriza por una inflamación local persistente y una activación de la coagulación, seguida de una permeabilidad elevada de los vasos que conduce a la acumulación de un exudado rico en fibrina que cubre la superficie (Hellebrekers y Kooistra 2011). Estados como la hipoxia tisular (Saed y Diamond 2004) y la respuesta inmunitaria celular inducida por macrófagos, células T y citoquinas son factores que refuerzan la formación de adherencias (Binnebösel et al. 2011). El segundo día, la superficie de la herida ya está cubierta por macrófagos, fibroblastos y células mesoteliales, que se unen en poco tiempo formando una capa cerrada entremezclada con mastocitos, fibroblastos y células endoteliales recién formadas. Esta formación irreversible de una matriz sólida es la base del posterior crecimiento, caracterizado por fibrillas de colágeno en forma de banda y el crecimiento de vasos sanguíneos y fibras de tejido conjuntivo.
- 20 Por lo tanto, el suceso central en la formación de adherencias consiste en la formación de una capa de fibrina local a partir del precursor fibrinógeno. Bajo condiciones normales existe un equilibrio entre la formación de fibrina y la descomposición de fibrina mediante plasmina, cuya actividad enzimática es regulada a su vez por los inhibidores PAI-1, PAI-2 y α_2 -antiplasmina. Los datos experimentales muestran que los fibroblastos que aparecen en el área de adherencias presentan una concentración reducida de activador de plasminógeno con una formación elevada de inhibidor del activador de plasminógeno, lo que favorece la creación de una matriz de fibrina (Diamond et al. 2004). Esta observación se confirmó en un estudio prospectivo en pacientes con endometriosis (Hellebrekers et al. 2005).
- 25 Por lo tanto, la inhibición de la reacción inflamatoria, el aumento de la actividad fibrinolítica y la influencia en la coagulación parecían puntos de ataque terapéutico adecuados para impedir la formación de adherencias. Por ello, en numerosos experimentos se ha intentado compensar la falta de actividad fibrinolítica endógena mediante la administración de sustancias con actividad fibrinolítica. Los documentos EP 0318801B1, US 5578305A, EP 0297860B1 y EP 0227400B1 describen por ejemplo la utilización de rt-PA en hidrogel de hidroxietil celulosa y otras matrices como medio eficaz para evitar adherencias. También se han propuesto para esta aplicación modificaciones con r-tPA con afinidad de fibrina elevada (EP 0517756B1). La inhibición de la formación de fibrina mediante el uso de inhibidores de trombina descrita en el documento EP 0874634B1 representa otra estrategia para evitar la adherencia en una etapa temprana. El documento EP 0473689B1 describe el uso de activadores de plasminógeno como uroquinasa, estreptoquinasa y t-PA y se remite a la escasa vida media en la sangre. Como solución se propone el acoplamiento de activadores de plasminógeno con un fragmento de fibrina.
- 30 Mediante una administración intraperitoneal reiterada de rt-PA se pudo reducir la formación de adherencias en un modelo de ratón, en donde sin embargo el efecto no dependía de la dosis (Binda et al. 2009). En un modelo de adherencia en ratas se administró el activador de plasminógeno t-PA, uroquinasa o estreptoquinasa a lo largo de 4 días, bien con ayuda de una matriz de hidrogel biodegradable, bien mediante 4 inyecciones i.p. diarias. El t-PA liberado de una matriz redujo las adherencias de un $72 \pm 15\%$ (control) a un $4 \pm 3\%$, mientras que las inyecciones intraperitoneales solo redujeron las adherencias a un $49 \pm 8\%$ (Hill-West et al. 1995). En resumen, los resultados obtenidos con sustancias fibrinolíticas son insatisfactorios.
- 35 A pesar de estos resultados experimentales negativos, el rt-PA se ensayó en un estudio prospectivo en 26 pacientes con miomectomía bajo condiciones clínicas (Hellebrekers et al. 2009). Entre los dos grupos no se observó ninguna diferencia significativa en la frecuencia de las adherencias. La frecuencia y la gravedad de las adherencias estaban

en correlación con las concentraciones de PAI-1 medidas antes de la operación y, por consiguiente, apuntan a la importancia del sistema fibrinolítico para la formación de adherencias. Sin embargo, para tener éxito en la prevención se requieren concentraciones de t-PA relativamente altas, que no se alcanzaron en este estudio debido a la corta vida media biológica del rt-PA. Por lo tanto, estas sustancias tampoco son adecuadas para una utilización preventiva o terapéutica con el fin de evitar adherencias en compartimentos tisulares después de lesiones de la cavidad abdominal.

Por lo tanto, todos los métodos farmacológicos utilizados hasta ahora para reducir el riesgo de adherencias han demostrado en general ser poco eficaces en estudios clínicos. En particular fue decepcionante la eficacia de sustancias con acción fibrinolítica. Esto se ha de atribuir presumiblemente a que las altas concentraciones de inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1, PAI-2) inhiben la actividad fibrinolítica de sustancias fibrinolíticas aportadas de forma exógena. Para lograr una alta eficacia de las sustancias fibrinolíticas se requieren dosis muy altas, pero éstas conducen a efectos secundarios sistémicos, en particular hemorragias, debido a la reabsorción de estas sustancias a través de la membrana peritoneal. De este modo no se asegura la prevención libre de efectos secundarios o la disgregación temprana de los puentes de fibrina formados como causa de adherencias.

Por lo tanto, la eliminación del fibrinógeno, el precursor de la fibrina, para inhibir la formación de ésta ya en la etapa inicial, parece más prometedora. La idoneidad de enzimas fibrinogenolíticas para la profilaxis de adherencias posoperatorias se ha investigado en experimentos animales por ejemplo con la enzima ancrodo aislada del veneno de la víbora malaya, *Calloselasma rhodostoma*, (Ashby et al, 1969; Buckman et al., 1975; Chowdhury, & Hubbell, 1996). El ancrodo disocia específicamente el enlace de arginina-glicina de la cadena A α del fibrinógeno. A diferencia de la trombina, el ancrodo no disocia la cadena B β . Los monómeros de des-A-fibrina resultantes de ello se polimerizan después de la disociación de los fibrinopéptidos formando fibrina soluble de cadena corta, que no está reticulada y es eliminada rápidamente por plasmina y el sistema reticuloendotelial. Por lo tanto, mediante la administración intravenosa o intraperitoneal de ancrodo se puede reducir de forma controlada la concentración de fibrinógeno en la sangre. En las investigaciones mencionadas, esto condujo a una inhibición prácticamente completa, dependiente de la dosis, de la formación de adherencias. Debido al bajo peso molecular de < 40 kDa, el ancrodo puede pasar rápidamente de la cavidad abdominal al sistema circulatorio sanguíneo, donde conduce a la inhibición de la coagulación. En caso de una concentración correspondientemente alta en la sangre, esto puede conducir a hemorragias locales.

Además, también se conocen composiciones farmacéuticas de una proteína de fusión de ancrodo, que se utilizan para la disolución de coágulos de sangre. Así, el documento EP 0 395 375 A1 describe una proteína de fusión entre ancrodo y un polipéptido 5'-terminal, que puede incluir de 2 a 1.000 aminoácidos. Sin embargo, en dicho documento no se describe una utilización de esta proteína de fusión para el tratamiento de adherencias posoperatorias.

Del mismo modo actúa la batroxobina obtenida del veneno de la serpiente sudamericana *Bothrops atrox*, que también disocia selectivamente el fibrinógeno y de este modo reduce la concentración de fibrinógeno. Por ejemplo, en el documento WO 99/29838 A1 se describe una proteína de fusión entre batroxobina y una segunda cadena de polipéptido.

El ancrodo se ha utilizado durante muchos años para la profilaxis de la trombosis en pacientes con trombocitopenia inducida por heparina y para el tratamiento de los trastornos circulatorios arteriales periféricos, entre otras cosas, pero entre tanto ha sido sustituido por nuevos medicamentos. Sin embargo, a pesar de su buena eficacia en el modelo animal, esta enzima y otras comparables no son adecuadas para la profilaxis de adherencias peritoneales, ya que, debido a su estructura molecular, no permanecen durante un tiempo suficiente en la cavidad abdominal y llegan rápidamente al torrente sanguíneo e inhiben la coagulación. Este efecto secundario es prohibitivo para la indicación "profilaxis de adherencias posoperatorias", de modo que una utilización nativa de estas sustancias en pacientes no entra en consideración.

Además, existen otras proteínas de fusión fibrinogenolíticas, pero que no han sido desarrolladas con el planteamiento de un tratamiento de adherencias peritoneales. Estas construcciones se describen por ejemplo en el documento US 6,214,594 B1 o en Yang et al., Protein Expression and Purification, 66 (2009): 138-147.

Para lograr una liberación lenta de los principios activos y una mayor duración del efecto en la cavidad peritoneal, por ejemplo se han incorporado sustancias fibrinolíticas y desfibrinogenantes en un material de soporte (US 2004/224006 A1). El documento US 8,629,314 B2 describe la incorporación de diferentes sustancias activas en una matriz polimérica para evitar adherencias. En los documentos US 6,461,640 B1 y WO 1995/15747 A1 también se describen ensayos similares. En este contexto se utiliza una matriz polimérica biodegradable, de aplicación tópica, como soporte para plasminógeno, uroquinasa y estreptoquinasa, así como ancrodo. El éxito de estas medidas fue escaso, presumiblemente sobre todo por la liberación incontrolada de los principios activos incorporados.

Descripción de la Invención:

En este contexto, el objetivo de la presente invención consiste en reducir o evitar los efectos secundarios locales o sistémicos, en particular en forma de hemorragias o de una inhibición de la coagulación sanguínea, que aparecen en

el caso de las sustancias fibrinolíticas o fibrinogenolíticas conocidas, y en proporcionar un medio farmacológicamente eficaz con el que se puedan evitar o reducir las adherencias posoperatorias.

5 Este objetivo se resuelve mediante una proteína de fusión recombinante con las características indicadas en la reivindicación 1. Las reivindicaciones subordinadas muestran formas de realización preferibles.

10 Los inventores han comprobado sorprendentemente que mediante el acoplamiento con un dominio de estabilización inerte de alto peso molecular se pueden reducir o evitar las propiedades no deseadas de enzimas fibrinogenolíticas conocidas para la profilaxis de adherencias posoperatorias, en particular en la cavidad peritoneal. Las proteínas de fusión recombinantes según la invención posibilitan un tratamiento preventivo de adherencias en tejidos u órganos, en particular adherencias peritoneales después de intervenciones quirúrgicas o lesiones. En la proteína de fusión, una enzima o fragmento de enzima fibrinogenolítica se acopla como dominio biológicamente activo a un dominio de estabilización inerte de alto peso molecular, con lo que se forma una proteína de fusión que constituye una fibrinogenasa de alto peso molecular con propiedades enzimáticas y farmacocinéticas novedosas. Mediante el acoplamiento de la enzima fibrinogenolítica con el dominio de estabilización inerte de alto peso molecular se aumenta significativamente el peso molecular y se logra una unión no específica a la superficie mesotelial que cubre la cavidad peritoneal. Sorprendentemente, de este modo se reduce el transporte a través de la membrana peritoneal y, por lo tanto, el paso al torrente sanguíneo. Además, se prolonga el tiempo de permanencia y en consecuencia el tiempo de acción de la fibrinogenasa como principio activo recombinante en la cavidad abdominal, con lo que se logra más rápidamente el éxito de la curación con la administración a pacientes afectados (por ejemplo, ser humano o animal). Gracias al mayor tiempo de permanencia y tiempo de acción es posible reducir drásticamente las dosis biológicamente activas necesarias para la descomposición del fibrinógeno, con lo que las desventajas descritas inicialmente de las sustancias con actividad fibrinolítica o fibrinogenolítica en relación con la aparición de hemorragias o la inhibición de la coagulación sanguínea se pueden eliminar por completo o al menos reducir considerablemente.

25 Preferiblemente, el dominio de estabilización inerte de alto peso molecular consiste en una proteína, polipéptido o péptido que presenta un peso molecular de más de 50 kDa, preferiblemente un peso molecular de más de 80 kDa. Los pesos moleculares preferibles del dominio de estabilización previsto para el acoplamiento con el dominio enzimático oscilan entre 50 y 150 kDa, preferiblemente entre 50 y 100 kDa. El peso molecular elevado deseado del dominio de estabilización también se puede generar mediante dimerización o mutimerización del dominio de estabilización, por ejemplo mediante dimerización de un fragmento IgG-Fc, por ejemplo del fragmento IgG1-Fc humano.

30 El acoplamiento del dominio de estabilización inerte de alto peso molecular con la enzima fibrinogenolítica tiene lugar en el extremo C y/o en el extremo N. En este contexto, para mantener la actividad enzimática se ha de tener en cuenta la estructura del dominio enzimático. En caso dado se han de insertar secuencias de enlace suficientemente largas entre las proteínas. Si se requiere un extremo N o C para la actividad enzimática, la actividad enzimática en caso dado solo se mantendrá en una de las variantes posibles. Esto puede ser determinado por los expertos sin un gran esfuerzo por medio de métodos conocidos, por ejemplo por medio de ensayos de actividad. En una variante preferible también se pueden acoplar varios dominios de estabilización al extremo C o al extremo N del dominio enzimático con el fin de lograr dicho aumento del peso molecular. También es posible una combinación de diferentes dominios de estabilización (por ejemplo producidos como productos de expresión recombinantes). Mediante el acoplamiento del dominio de estabilización con la enzima fibrinogenolítica, las propiedades fibrinogenolíticas de la enzima también se mantienen en el producto de fusión, de modo que la novedosa proteína de fusión recombinante resultante es farmacológicamente eficaz evitando al mismo tiempo las desventajas mencionadas.

40 Se ha comprobado que un acoplamiento de ancrodo en el extremo N del dominio de estabilización resulta especialmente eficaz. En particular se ha podido registrar un tiempo de permanencia de la construcción en la cavidad peritoneal prolongado en comparación con la molécula de ancrodo nativa.

50 El dominio biológicamente activo de la proteína de fusión recombinante causa la descomposición enzimática de fibrinógeno y de este modo impide la formación de fibrina, el precursor de adherencias. Mediante el acoplamiento de la enzima con un dominio de estabilización basado en proteínas o péptidos se reduce la salida de los componentes enzimáticos biológicamente activos del abdomen al sistema circulatorio sanguíneo, con lo que se limita el efecto en la formación excesiva de fibrina local y se reduce o evita una inhibición no deseada de la coagulación sanguínea. De este modo se evitan hemorragias sin influir negativamente en la curación de la herida quirúrgica. Gracias al mayor tiempo de permanencia de la construcción según la invención se aumenta además el tiempo de permanencia de la sustancia activa, de modo que se evita la formación de adherencias a lo largo de la fase de curación crítica de 2 a 4 días.

60 Por estos motivos, las proteínas de fusión recombinantes según la invención son excelentes candidatos para un uso terapéutico, ya que, debido a la escasa disponibilidad sistémica, provocan muy pocos efectos secundarios o ninguno en comparación con las sustancias ensayadas hasta ahora. Además, gracias a su efecto de larga duración, las

sustancias según la invención presentan una eficacia considerablemente mejor, de modo que en general son adecuadas para todas las aplicaciones terapéuticas que requieren un efecto de duración prolongada.

5 En una forma de realización preferible, el dominio que codifica la enzima fibrinogenolítica y el dominio de estabilización están unidos entre sí a través de su extremo C o N. El acoplamiento del dominio de estabilización con la secuencia de aminoácidos de la enzima fibrinogenolítica puede tener lugar por ejemplo mediante métodos tales como los descritos en los documentos US 2009/0175893A y US 2014/0017273A.

10 No obstante, la actividad biológica de la proteína de fusión recombinante creada mediante el acoplamiento de una enzima fibrinogenolítica con un dominio de estabilización se puede optimizar mediante un enlazador adicional dispuesto entre el dominio de estabilización y el dominio enzimático. Por ello, en una forma de realización preferible, el dominio de estabilización inerte se une a la enzima fibrinogenolítica a través de un enlazador variable. El acoplamiento del enlazador tiene lugar a través del extremo C o del extremo N del dominio de estabilización o del dominio enzimáticamente activo. Para la unión del enlazador se pueden utilizar procedimientos estándar conocidos en el estado actual de la técnica.

15 El enlazador consiste preferiblemente en un péptido o polipéptido, cuya secuencia de aminoácidos puede presentar diferentes longitudes o grados de ramificación. Un enlazador preferible incluye por ejemplo secuencias repetitivas de residuos de glicina, alanina y serina. Preferiblemente, el enlazador incluye una secuencia (GGGGGS)_x o (GGGGA)_xR, en donde A = alanina; G = glicina; S = serina; R = arginina; x = cantidad de repeticiones > 1. La cantidad de repeticiones x en la secuencia de enlace oscila preferiblemente entre 1 y 4. El enlazador aumenta la distancia esférica entre la enzima fibrinogenolítica y el dominio de estabilización inerte de la proteína de fusión recombinante según la invención.

20 Además de los enlazadores peptídicos arriba mencionados, para el acoplamiento de los dos dominios también se pueden utilizar en el sentido de la presente invención enlazadores químicos conocidos en sí, pudiendo modificarse su estructura y longitud en la orientación de los dos dominios en relación con una expresión y actividad enzimática optimizada de la proteína de fusión en el marco de la metodología habitual.

30 Después de su producción, las construcciones según la invención se examinan en cuanto a su actividad biológica en uno de los ensayos conocidos, en el que se determina la actividad enzimática fibrinogenolítica de las proteínas de fusión. La invención incluye en particular aquellas proteínas de fusión que presentan suficiente actividad fibrinogenolítica. Para la optimización de la actividad biológica puede ser necesario adaptar el tipo y la posición del acoplamiento, la estructura y la longitud del enlazador, así como el tipo y la estructura del dominio de estabilización. En particular, un impedimento estérico del dominio de estabilización puede influir negativamente en la actividad enzimática, pero esto puede ser comprobado fácilmente *in vitro* por un experto con ayuda de los medios disponibles.

40 Por lo tanto, las proteínas de fusión recombinantes de alto peso molecular según la invención constituyen fibrinogenasas altamente eficaces, que se pueden clonar a través de métodos estándar y expresar en sistemas de expresión adecuados. Debido al peso molecular relativamente alto de las construcciones y su estructura compleja, que incluye puentes de disulfuro, son preferibles los sistemas de expresión eucariotas.

45 El concepto "enzima fibrinogenolítica" utilizado en la presente memoria incluye enzimas, fragmentos de enzima activos o sustancias con actividad enzimática, que presentan actividad de fibrinogenasa y producen o favorecen una descomposición de fibrinógeno. Preferiblemente, la enzima fibrinogenolítica del dominio de fibrinogenasa consiste en una serina proteasa, preferiblemente una serina proteasa similar a la trombina. Las enzimas fibrinogenolíticas preferibles son, por ejemplo, las enzimas ancrodo o batroxobina aisladas de venenos de serpiente. Estas enzimas han resultado ser muy adecuadas para el acoplamiento con el dominio de estabilización inerte de alto peso molecular, ya que obtienen su actividad, al menos en gran medida, en la proteína de fusión recombinante según la invención. Además, existen otros candidatos adecuados, por ejemplo, proteasas y versiones recombinantes de éstas similares a la trombina, aisladas de venenos de serpiente. Como dominio de fibrinogenasa de la proteína de fusión recombinante son particularmente adecuadas algunas formas recombinantes o variantes de la enzima ancrodo o batroxobina.

55 El dominio de estabilización inerte de alto peso molecular consiste preferiblemente en albúmina sérica, preferiblemente albúmina sérica animal o humana. En otra variante, el dominio de estabilización inerte de alto peso molecular incluye transferrina o variantes de transferrina inactivadas mediante modificaciones genéticas. En otra variante, el dominio de estabilización inerte de alto peso molecular incluye secuencias de aminoácidos artificiales, como por ejemplo PAS (Schlapschy et. al 2013) o XTEN (US 2013/0165389 A1). También es posible acoplar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos como dominios de estabilización con la enzima fibrinogenolítica. Para la administración profiláctica o terapéutica en humanos, como anticuerpos preferiblemente se utilizan anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpo de estos. Además, también se pueden utilizar variantes de los dominios de estabilización mencionados para el propósito según la invención. Otras formas de realización prevén además la utilización de dominios sintéticos u otros dominios proteínicos inertes, siempre que estén descritos en el estado actual de la técnica.

65

En una variante preferible, la proteína de fusión incluye una secuencia de aminoácidos, que incluye la enzima ancrodo y un dominio de estabilización (por ejemplo albúmina sérica o un fragmento de anticuerpo IgG-Fc). Preferiblemente, la proteína de fusión incluye una secuencia de aminoácidos tal como las reproducidas en la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 4 o partes de esta secuencia con actividad fibrinogenolítica. Las partes de esta secuencia con actividad fibrinogenolítica son secciones de secuencia que codifican el dominio enzimático y el dominio de estabilización y que tienen actividad enzimática en la descomposición de fibrinógeno. En los ejemplos concretos, a estas partes fibrinogenolíticas también se les añadieron, por ejemplo, una hexahistidina-Tag (His-Tag) para una purificación sencilla y un péptido de señalización. También es posible añadir aminoácidos adicionales o alternativos a las secuencias arriba mencionadas o retirar éstos de las mismas.

Las proteínas de fusión según la invención tienen una alta eficacia fibrinogenolítica y conducen a una descomposición específica de fibrinógeno. Además, como efecto secundario en la administración en el organismo también se puede observar un efecto fibrinolítico, ya que los productos de descomposición de la enzima, desA-profibrina y monómeros de desAA-fibrina, forman complejos de fibrina solubles, que a su vez conducen a una activación de plasminógeno a través de la estimulación del t-PA endógeno. Este efecto se puede medir como un aumento de la concentración de plasmina después de la administración de la enzima *in vivo*. Este efecto ofrece una ventaja adicional, ya que unas altas concentraciones del inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) en caso de lesiones conducen a una deficiencia de la descomposición natural de la fibrina y a adherencias.

Mediante el acoplamiento C-terminal de ancrodo u otra proteína con actividad fibrinogenolítica con un dominio de estabilización, por ejemplo con una albúmina sérica o un fragmento de anticuerpo IgG-Fc, el tiempo de permanencia de la construcción en la cavidad peritoneal se prolonga notablemente en comparación con la enzima con actividad fibrinogenolítica nativa. De este modo, la construcción puede desencadenar una duración de acción mucho más larga que en el caso de una molécula de ancrodo nativa. Mediante la retención de la construcción en la cavidad peritoneal también se redujo claramente el paso de la sustancia activa al torrente sanguíneo.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que incluye una proteína de fusión recombinante tal como se describe más arriba. La composición farmacéutica incluye un soporte farmacéuticamente aceptable y se puede administrar como solución directamente en el espacio de la herida, por ejemplo el abdomen. De este modo, el principio activo evita la aparición de adherencias en todo el compartimento, en particular allí donde se han podido producir potencialmente lesiones. Debido al alto peso molecular, la proteína de fusión recombinante permanece como sustancia activa en la cavidad peritoneal durante un período de tiempo más largo en comparación con sustancias naturales no modificadas y no pasa o solo pasa en pequeña medida al sistema circulatorio sanguíneo. De este modo se evitan o reducen por ejemplo efectos sistémicos y efectos secundarios de la sustancia natural (por ejemplo de ancrodo o batroxobina). La sustancia activa se puede administrar una o más veces en la cavidad peritoneal durante la operación o después de la misma. Es preferible una sola administración, de modo que no son forzosamente necesarias otras inyecciones o infusiones. Esta ventaja se debe al mayor tiempo de permanencia de la construcción recombinante en la cavidad abdominal en comparación con las sustancias naturales.

En una variante preferible, la proteína de fusión recombinante según la invención se puede utilizar en combinación con otros métodos de tratamiento o productos. Por ejemplo es concebible una combinación de la proteína de fusión con métodos de barrera físicos formados por membranas sólidas o líquidas, geles o aerosoles. Preferiblemente, éstos son biodegradables.

Mediante la utilización de dominios específicos de la especie como dominios de estabilización (por ejemplo albúmina sérica humana (HSA) o un fragmento de anticuerpo IgG-Fc humano), la proteína de fusión recombinante según la invención presenta una baja inmunogenicidad y ningún efecto farmacodinámico propio. Debido al alto peso molecular, preferiblemente de > 50 kDa, se asegura además una larga durabilidad biológica.

Para desplegar una eficacia profiláctica óptima de la composición farmacéutica según la invención, el efecto fibrinogenolítico ha de estar presente durante todo el tiempo de la cicatrización. Por ello, la proteína de fusión recombinante preferiblemente está presente en el lugar de acción en una concentración eficaz. El período de tiempo necesario para una cicatrización completa es de 1 a 8 días, para el tratamiento profiláctico es preferible un período de 2 a 4 días.

La actividad enzimática necesaria para la eficacia preventiva o terapéutica de la solución farmacéuticamente activa administrada en la cavidad abdominal oscila entre 0,01 y 10 unidades/ml a lo largo de todo el período de tiempo de la cicatrización. Preferiblemente se utilizan concentraciones de la proteína de fusión entre 0,1 y 5 unidades/ml (*units/ml*). Preferiblemente, la proteína de fusión recombinante se aplica en un medio con actividad osmótica (por ejemplo solución de icodextrina).

La presente invención se refiere además a una utilización combinada de la proteína de fusión con otros productos para la prevención de adhesiones de tejido (adherencias), en particular después de intervenciones quirúrgicas. Para

ello se pueden utilizar por ejemplo membranas consistentes en celulosa regenerada oxidada, politetrafluoroetileno, ácido hialurónico-carboximetil celulosa o polietilenglicol. También se pueden utilizar barreras de adherencia que separan los órganos y tejidos mediante hidroflocación. Preferiblemente, en este contexto se utilizan ácido hialurónico, ácido hialurónico reticulado o icodextrina.

5 Preferiblemente, la proteína de fusión recombinante según la invención está incorporada en una matriz biodegradable y biocompatible, que libera la proteína de fusión de forma continua durante la fase de cicatrización inicial, preferiblemente a lo largo de un período de tiempo de 2 a 4 días.

10 Modos de realización de la Invención:
La invención se explica en los siguientes ejemplos.

Ejemplos:

15 Ejemplo 1:

Preparación de proteína de fusión N-ancrodo-Fc

20 Para la preparación de la composición según la invención se preparó una proteína de fusión consistente en ancrodo y la región constante de un anticuerpo IgG1 humano. Entre el dominio de ancrodo biológicamente activo y el dominio de estabilización formado por el fragmento de anticuerpo IgG1-Fc está insertado un enlazador de glicina-alanina. Para mejorar la secreción en el medio de cultivo celular y para una purificación más sencilla se añadió el péptido de señalización de la albúmina sérica humana en el extremo N.

25 Para la preparación, la secuencia de la proteína de ancrodo (número de acceso: ABN13428.1) se fusionó por el extremo C con el extremo C de la región constante de una IgG1 humana (número de acceso Uniprot P01857-1, aminoácidos 104 - 330) a través de un enlazador de glicina-alanina. A continuación se añadió el péptido de señalización-HSA (aminoácidos 1 a 18) previsto para la purificación. Para la síntesis del ADNc que codifica la proteína de fusión, los codones de ADN se optimizaron para la expresión en células humanas. En el extremo 5' del ADNc se añadieron los sitios de clivaje de restricción para NotI y XbaI y en el extremo 3' para BstXI y HindIII, que permiten la clonación del ADN en los vectores correspondientes para una expresión transitoria o los vectores correspondientes para la producción de líneas celulares estables. La construcción de ADNc resultante se preparó sintéticamente.

35 Este ADNc se clonó, amplificó y reclonó en un vector de expresión para la transfección transitoria. La inserción correcta del ADNc se comprobó a través de una digestión de restricción. A continuación, con el plásmido resultante se transformaron bacterias E. coli (DH5α) y la cepa se cultivó en 0,8 litros de medio LB. A partir de ello se aisló el ADN-plásmido libre de endotoxinas y la solución se filtró de forma estéril.

40 Para la expresión transitoria de la proteína se cargaron células HEK-F en cultivo en suspensión libre de suero en un volumen de 500 ml en el matraz de agitación (aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/ml). La transfección de las células tuvo lugar a través de un copolímero de PEG-aminoéster ramificado con una carga de transfección de aproximadamente $10 \mu\text{g ADN}/1 \times 10^7$ células - ADN/coPEG33 - 1/6 (p/p). Después de añadir ácido valproico, el cultivo celular se cultivó durante otros 7 días. A continuación, se cosechó el sobrenadante del cultivo celular mediante centrifugación. La cromatografía tuvo lugar en tampón MES 50 mM, pH 5,5.

45 La purificación de la proteína de fusión tuvo lugar mediante cromatografía de intercambio iónico. Como material de columna se utilizó HiTrap SP FF Affinity Resin (GE Healthcare Europe GmbH, Friburgo, Alemania). La elución de la proteína de fusión tuvo lugar mediante un gradiente de cloruro de sodio. El análisis de las fracciones de eluato tuvo lugar mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE) y las fracciones proteínicas adecuadas se reunieron y se dializaron contra solución salina tamponada (PBS), se dividieron en partes alícuotas y se guardaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior utilización.

50 La secuencia de ADNc de la construcción se muestra en la SEQ ID N° 1:

55 Los sitios de clivaje de restricción insertados están subrayados. La secuencia que codifica la proteína de fusión se muestra en negrita.

gcgggccgcccaccatgaaatgggtcacctttatctcccttctgttcctcttttagtagcgccta
 ttctgtcatcgggtggtgacgagtgcaatatcaacgagcatcgatttctggtggcagtgtatg
 aaggaaccaactggacctttatctgcggcgggggtccttattcaccagagtggttcattacc
 gccgaacactgtgctcggcgtcgaatgaatcttgtgttcgggatgcacaggaatcagagaa
 gtttgatgacgaacaggaacggtatcccaagaagcggtagcttcatcgatgcaacaaaacc
 ggactagctgggatgaggacatcatgctgattcggctgaacaagcccgtgaataacagcgag
 catattgctcctttgtcactgccttccaatcgcctattgtgggtagtgactgccgtgtgat
 gggctgggtagcattaacagaaggatccacgtgcttagcgatgaaccagatgtgccaaca
 tcaatctccacaacttcaccatgtgtcatgggtgttccgcaagatgcctaagaagggacgc
 gtactctgtgctggcgatctgcgcggtagacgggactcttgcaattcagatagtggaggacc
 ccttatctgcaacgaagagctgcatggcattgtggccagaggcccaatccatgtgcacagc
 ccaacaaaccagctctgtatactagcgtgtacgactacagggattgggtgaacaacgttatc
 gccggcaatgcaacctgtagtccaggcggcggcggagccggtggaggcggggcaggaggagg
 aggagctagagacaaaacacacacttgtccacctgtcctgctcccgaactgcttggaggac
 ccagcgtgtttctgtttccgcctaagcccaaagacacctcatgatctcacggactccgaa
 gttacgtgtgtcgtagtagacgtgtcacacgaagatcccagaggtcaagttcaactggtatgt
 ggacggagttagggttcacaacgccaaaaccaaaccgagagaggagcagtaactccacat
 atagggtggttaagcgtgttgaccgtgctgcatcaggattggctgaatggcaagagtacaag
 tgaaggtgtccaataaggctctccagcaccattgagaaaacgatctccaaggcgaagg
 ccaacctcgtgaacctcaggtgtatactctccctccaagtgcgatgagctaccaagaacc
 aggtgtctttgacatgcctcgtcaaagggttctacctcagacatagccgtcgaatgggag
 tctaattggccaaccagagaataactacaagaccactcctccggttctggatagtgatgggag
 cttctttctgtacagcaagctgacagtgcacaagtcccgatggcagcagggtaatgtgttca
 gttgctctgtgatgcatgaagccctgcataaccactataaccagaaaagcctgtctctgagc
 ccaggaaagtaatagaagctt

La secuencia de aminoácidos resultante de ello se muestra en la SEQ ID N° 2:

5

MKWVTFISLL	FLFSSAYSVI	GGDECNINEH	RFLVAVYEGT	NWTFICGGVL	50
IHPEWVITAE	HCARRRMNLV	FGMHRKSEKF	DDEQERYPKK	RYFIRCNKTR	100
TSWDEDIMLI	RLNKPVNNSE	HIAPLSLPSN	PIVGSDCRV	MGWGSINRRI	150
HVLSDEPRCA	NINLHNFTMC	HGLFRKMPKK	GRVLCAGDLR	GRRDSCNSDS	200
GGPLICNEEL	HGIVARGPNP	CAQPNKPALY	TSVYDYRDWV	NNVIAGNATC	250
SP GGGGAGGG	GAGGGGAR DK	THTCPPCPAP	ELGGPSVFL	FPPKPKDTLM	300
ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	350
VSVLTVLHQD	WLNGKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ	PREPQVYTLF	400
PSRDELTKNQ	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG	450
SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCSVMHEAL	HNHYTQKSLS	LSPGK	495

10 La secuencia de aminoácidos comienza con el péptido de señalización de la albúmina sérica humana MKWVTFISLLFLFSSAYS (representado subrayado), que se disocia de la célula durante la secreción de la proteína. El enlazador GGGGAGGGGAGGGGAR, dispuesto entre la albúmina sérica humana y el dominio de anclrodo, está unido con el extremo C del anclrodo (representado en negrita).

Ejemplo 2:

15 Preparación de proteína de fusión N-anclrodo-HSA-C con His-Tag
 En este ejemplo se muestra otra variante de una proteína de fusión basada en anclrodo, que consiste en anclrodo, albúmina sérica humana (HSA), un péptido de señalización de la albúmina sérica humana y a continuación un His-Tag. Entre el dominio de anclrodo biológicamente activo y el dominio de estabilización formado por la albúmina sérica humana está insertado un enlazador de glicina/serina.

20 Para la preparación, la secuencia de la proteína de anclrodo (número de acceso: ABN13428.1) se fusionó por el extremo C con el extremo N de la albúmina sérica humana (HSA) (número de acceso: P02768, aminoácidos 25-

609). A continuación, se añadió el péptido de señalización-HSA (aminoácidos 1 a 18). El ADNc se procesó tal como se describe más arriba, y se expresó la proteína.

La secuencia de ADNc de la construcción se muestra en la SEQ ID N° 3:

5

gcggccgctctagagccaccatgaaatgggttaccttcattagcctcctgttcctgttttctccgccta
ttctgttatcgggtggtgacgagtgaacatcaacgagcatagggtcctggtcgagtgatgagggcaca
aactggaccttcatttgtggcgggtgctgattcaccagagtggttaataacagcggagcattgtgcc
gcagacgcatgaatctcgtgtttggaatgcatcgcaaaagcgagaaattcgatgatgaacaagaaagga
ccctaagaagcggtaacttcattcgggtgcaacaagacaagaacttcattgggacgaggacatcatgctgatc
cgtcttaacaagccggtaaataacagcggagcatatcgaccactctcattgccagcaaccctccatcg
tgggaagcgtatgcagagtgatgggtggggctccatcaatagaaggattcacgtgctctctgatgaacc
gcggtgtccaacattaatctgcatatcttactatgtgccatggtctgttcgcaaaatgcccaagaaa
ggaagagttctgtgtgcaggcgtatctgagaggaaggagagactcttgcaactccgatagtggcgggccac
tgatatgcaacgaagagcttcacggaatcgtggccagaggtcctaatacctgctgctcagcctaacaagcc
cgctctgtacaccagcgtttatgactaccgggattgggtcaacaatgtcattgccggaatgccacctgt
tcccctggcggcggcgggtcaggaggaggagggtctgggtggcggcgggtctgacgcacataaaagcgaag
tggctcaccggtttaaagatctcggcgaagagaacttcaaagctcttgattgattgcttcgctcagta
cttgcaacagtgcccttctgaggaccacgtgaaactggtgaatgaagtcacagaattcgcctaaagcgtgt
gtggcggatgagagtgctgagaactgtgacaagagctctgcacaccctgtttggggataaactgtgactg
tcgctactctgcgagaaacttatggcgaatggccgactgctgcgccaagcaggaacccgagagaaatga
atgctttctgcagcacaagacgacaaccctaatactgccacgattgggttcggcccgagtggaagcgtaatg
tgcacggctttccacgacaatgaggaaaccttctgaagaagtatctctacgaaatagctcgacggcatc
cctacttttatgcaccgagctgctgttctttgcaagcgtataaaggccgcttccacagaatgctgtca
agctgccgacaaggctgcctgtctctcccaaaactggacgagctccgcatgaggggaaggcaagcaggt
gcaaacagcgcctgaaatgcgcatcacttcagaaattcggagagcgcgcatcaaacgcatgggcagtg
ctcgattgtcccagcgtttcctaaggctgaatttgccgaagtgtcaaagctggtgacagacctaccaa
agtccacacagaatgctgccatggtgacttgcctggagtgcccgatgacagagccgatctggccaagtac
atctgtgaaaatcaggattccatctcctccaaactgaaagaatgctgcgagaacccctgctggagaaga
gccattgtattgctgaggtggaacagatgagatgccagcggacctccatcactggcagccgacttcgt
cgagagtaaggacgtgtgtaagaactacgccgaagcgaaggatgtgttctcgggatgtttctgtacgaa
tatgcgctgctcatcccgattatagcgtggttctgctgcttaggcttgccaagacttacgaaaccaccc
tcgagaagtgttgcgcccgtgacccgcatgagtgctacgccaagatattgacgagtttaagcctct
ggtcgaggagcctcagaacctgatcaaacagaactgcgagcttttcgagcagttgggtgaatacaaat
cagaatgccctgctcgtcaggtataactaagaaggtgcccgaagtgtctacacctaccttggttgaggtca
gccggaatctcggcaaggtcggcagcaaatgctgtaagcaccagaggcaagcgtatgccatgtgcaga
ggattatctgagtgctcctcaaccagctgtgctacttcacgaaaagacaccagtgccgatagggtc
actaaatggtgcaccgaatctctggtgaatcggaggccctgttctcagctctggaagtgatgaaacct

acgttccgaaggagttcaatgcagaaactgttacctttcacgctgacatctgcacgctctctgagaagga
gaggcagataaagaagcaaacagccctggtagagctggttaaacacaagcccaagcaacaaggagcag
ctgaaagcgggtgatggatgacttcgcccgtttgtggagaagtgtgtaaggccgacgataaagaactt
gcttcgcccgaagagggaagaagctgtggcagctagccaagcagcccttgggtgcaccaccatcacca
ccactaatagccactgtgctggttcgaa

Los sitios de clivaje de restricción insertados están subrayados (5': NotI, XbaI; 3': BstXI, HindIII). La secuencia que codifica la proteína de fusión se muestra en negrita.

10

La secuencia de aminoácidos resultante de ello se muestra en la SEQ ID N° 4:

MKWVTFISLL	FLFSSAYSVI	GGDECNINEH	RFLVAVYEGT	NWTFICGGVL	IHPEWVITAE	60
HCARRRMNLV	FGMHRKSEKF	DDEQERYPKK	RYFIRCNKTR	TSWDEDIMLI	RLNKPVNNSE	120
HIAPLSLPSN	PPIVGSDCRV	MGWGSINRRI	HVLSDEPRCA	NINLHNFTMC	HGLFRKMPKK	180
GRVLCAGDLR	GRRDSCNSDS	GGPLICNEEL	HGIVARGPNP	CAQPNKPALY	TSVYDYRDWV	240
NNVIAGNATC	SP GGGGSGGG	GSGGGGSDAH	KSEVAHRFKD	LGEENFKALV	LIAFAQYLQQ	300
CPFEDHVKLV	NEVTEFAKTC	VADESAENCD	KSLHTLFGDK	LCTVATLRET	YGEMADCCAK	360
QEPERNECFL	QHKDDNPMLP	RLVRPEVDVM	CTAFHDNEET	FLKKYLYEIA	RRHPYFYAPE	420
LLFFAKRYKA	AFTECCQAAD	KAACLPLPKL	ELRDEGKASS	AKQRLKCASL	QKFGERAFKA	480
WAVARLSQRF	PKAEFAEVSK	LVTDLTKVHT	ECCHGDLLEC	ADDRADLAKY	ICENQDSISS	540
KLKECCEKPL	LEKSHCIAEV	ENDEMPADLP	SLAADFVESK	DVCKNYAEAK	DVFLGMFLYE	600
YARRHPDYSV	VLLLRLAKTY	ETTLEKCCAA	ADPHECYAKV	FDEFKPLVEE	PQNLIKQNC	660
LFEQLGEYKF	QNALLVRYTK	KVPQVSTPTL	VEVSRNLGKV	GSKCKHPEA	KRMPCAEDYL	720
SVVLNQLCVL	HEKTPVSDRV	TKCTESLVN	RRPCFSALEV	DETYVPKEFN	AETFTFHADI	780
CTLSEKERQI	KKQTALVELV	KHKPKATKEQ	LKAVMDDFAA	FVEKCKKADD	KETCFAEEGK	840
KLVAASQAAL	GL HHHHHH					858

La secuencia de aminoácidos comienza con el péptido de señalización de la albúmina sérica humana MKWVTFISLLFLFSSAYS, que se disocia de la célula durante la secreción de la proteína. El enlazador GGGGSGGGGSGGGGS, dispuesto entre la albúmina sérica humana y el dominio de anclodo, está unido con el extremo N de la albúmina sérica (representado en negrita).

Ejemplo 3:

- 10 Determinación de la actividad enzimática fibrinogenolítica de las proteínas de fusión preparadas
La determinación de la actividad de las proteínas de fusión tuvo lugar con fibrinógeno como sustrato (1 mg/ml) disuelto en Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4. En cada caso 500 µl de la solución de fibrinógeno se introdujeron con pipeta en una cubeta. Dos minutos después se añadieron 100 µl de muestra o de un control positivo (batroxobina). Después se determinó fotométricamente la medición del aumento de la turbidez a 340 nm a lo largo de un período de una hora y se determinó la pendiente máxima de la curva. La pendiente máxima de la curva es proporcional a la actividad enzimática, que se convierte en unidades/ml por medio de una curva de calibración.

Ejemplo 4:

- 20 Tratamiento de adherencias peritoneales en mamíferos
Para la administración preventiva o terapéutica a un mamífero (por ejemplo, un humano o un animal de experimentación), después de la intervención quirúrgica que provoca las adherencias, la proteína de fusión recombinante según la invención aislada y purificada después de la expresión, o un placebo correspondiente, se administra directamente en la cavidad abdominal del animal de experimentación. Para un efecto óptimo se procura alcanzar una actividad enzimática entre 0,01 y 10 U/ml. La solución farmacéutica incluye la proteína de fusión con una actividad entre 0,1 y 5 U/ml.

- 30 Después de la administración de la proteína de fusión, durante varios días se podrá constatar una actividad enzimática fibrinolítica sostenida de varios días de duración de la proteína de fusión, manteniéndose al mismo tiempo la cicatrización. En comparación con los animales de experimentación tratados con placebo, la proporción y la gravedad de las adherencias producidas en el marco del proceso de cicatrización se habrán reducido drásticamente.

Ejemplo 5:

- 35 Propiedades farmacológicas y farmacocinéticas de proteínas de fusión N-anclodo-HSA-C
Para la preparación de la proteína de fusión, la secuencia de la proteína de anclodo (número de acceso: ABN13428.1) se fusionó por el extremo C con el extremo N de la albúmina sérica humana (HSA) (número de acceso: P02768, aminoácidos 25-609). La actividad enzimática de la proteína de fusión es de 24 U/ml.

- 40 Dado que el anclodo nativo es inadecuado para un uso terapéutico para el tratamiento de adherencias peritoneales, la proteína de fusión así obtenida se ensayó en cuanto a su actividad y permanencia (tiempo de retención) en la cavidad abdominal. En la figura 1 se muestra la actividad enzimática en el líquido de la cavidad abdominal después de una única administración intraperitoneal de anclodo nativo y una proteína de fusión de anclodo (AK03) según la invención. Se puede ver claramente que el anclodo nativo es inadecuado para un uso terapéutico, ya que el anclodo administrado por vía intraperitoneal abandona muy rápidamente la cavidad abdominal y, por lo tanto, solo se alcanzan concentraciones bajas, que además caen a valores cercanos al límite de detección en un plazo de 6 horas. En cambio, después de la administración de una dosis comparable de la proteína de fusión de anclodo (AK03) se

alcanzan actividades considerablemente más altas en la cavidad abdominal, que además después de 6 horas todavía se encuentran dentro del intervalo terapéuticamente eficaz.

En la figura 2 se muestra el efecto del ancrodo y de la proteína de fusión de ancrodo (AK03) según la invención en la concentración de fibrinógeno en el plasma sanguíneo. El paso rápido del ancrodo al sistema vascular conduce aquí a un descenso del nivel de fibrinógeno en la sangre de más de un 50%. Debido a la estructura molecular modificada, la AK03 solo pasa muy lentamente al torrente sanguíneo y, por lo tanto, solo conduce a un pequeño descenso del nivel de fibrinógeno de un 14%. Estas pequeñas variaciones de la concentración de fibrinógeno están dentro del intervalo fisiológico y no tienen ninguna repercusión en la coagulación sanguínea.

Por consiguiente, la proteína de fusión de ancrodo AK03 provista del dominio de estabilización muestra un comportamiento farmacocinético mucho más favorable que la molécula de ancrodo nativa.

Estos resultados muestran que la proteína de fusión de ancrodo presenta propiedades enzimáticas similares a las del ancrodo, pero se diferencia claramente de éste en cuanto a la farmacocinética. En particular, esto conduce a un tiempo de permanencia más largo de la proteína de fusión en la cavidad peritoneal y a un menor paso de la sustancia al torrente sanguíneo. Gracias a estas propiedades, la proteína de fusión según la invención es especialmente adecuada para la administración intraperitoneal para el tratamiento/prevención de adherencias peritoneales.

Materiales y métodos

Farmacocinética en perros

Tres perros beagle se proveyeron de catéteres venosos e intraperitoneales permanentes. Una semana después de la implantación de los catéteres, los animales recibieron una única inyección intraperitoneal de la sustancia de ensayo. Se tomaron muestras de 0,5 ml del líquido peritoneal 0, 0,5; 1, 2, 4, 6 y 8 horas después de la administración de la sustancia, y muestras de sangre venosa para obtener plasma de citrato en los tiempos de 0, 0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 16 y 24 horas. La concentración de fibrinógeno en las muestras de plasma se midió fotométricamente con el método de Clauss. Después de centrifugar las muestras, la actividad enzimática en el líquido peritoneal se midió por turbidimetría con ayuda de un método cinético tras añadir fibrinógeno humano.

Farmacocinética en ratas

Unas ratas Sprague Dawley recibieron inyecciones intraperitoneales de la sustancia de ensayo bajo una breve anestesia por inhalación. Al mismo tiempo se tomó una muestra de sangre venosa. A continuación, los animales se llevaron de vuelta a la jaula, donde se despertaron poco después. Seis horas después de la administración de la sustancia, los animales fueron anestesiados de nuevo y se tomaron el líquido peritoneal y otra muestra de sangre para obtener plasma de citrato. Las dos muestras se centrifugaron inmediatamente después de la toma, se ultracongelaron a -80 °C y, en un momento posterior, se analizaron con los métodos arriba descritos.

Listado de referencias bibliográficas

Arung, W.; Meurisse, M.; Detry, O. (2011): Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions. In: *World J Gastroenterol* 17 (41), S. 4545-4553.

Ashby, E. C.; James, D. C.; Ellis, H. (1970): The effect of intraperitoneal Malayan pit-viper venom on adhesion formation and peritoneal healing. In: *Br J Surg* 57 (11), S. 863.

Binda, M. M.; Hellebrekers, B. W.; Declerck, P. J.; Koninckx, P. R. (2009): Effect of Reteplase and PAI-1 antibodies on postoperative adhesion formation in a laparoscopic mouse model. In: *Surgical Endoscopy* 23 (5), S. 1018-1025.

Binnebösel, M.; Klink, C.; Serno, J.; Jansen, P.; Trotha, K. von; Neumann, U.; Junge, K. (2011): Chronological evaluation of inflammatory mediators during peritoneal adhesion formation using a rat model. In: *Langenbeck's Archives of Surgery* 396 (3), S. 371-378.

Broek, R. P. G. ten; Issa, Y.; van Santbrink, E. J. P.; Bouvy, N. D.; Kruitwagen, R. F. P. M.; Jeekel, J. et al. (2013a): Burden of adhesions in abdominal and pelvic surgery: systematic review and meta-analysis. In: *BMJ* 347, S. f5588.

Broek, R. P. G. ten; Kok-Krant, N.; Bakum, E. A.; Bleichrodt, R. P.; van Goor, H. (2013b): Different surgical techniques to reduce post-operative adhesion formation: a systematic review and meta-analysis. In: *Hum Reprod Update* 19 (1), S. 12-25.

Brokelman, W. J. A.; Lensvelt, M.; Borel Rinkes, I. H. M.; Klinkenbijn, J. H. G.; Reijnen, M. M. P. J. (2011): Peritoneal changes due to laparoscopic surgery. In: *Surg Endosc* 25 (1), S. 1-9.

Brummer, T. H. I.; Jalkanen, J.; Fraser, J.; Heikkinen, A.-M.; Kauko, M.; Mäkinen, J. et al. (2011): FINHYST, a

- prospective study of 5279 hysterectomies: complications and their risk factors. In: *Hum Reprod* 26, (7) S. 1741-1751.
- 5 Buckman, RF Jr; Bordos, D.; Bell, W. R.; Cameron, J. L. (1975): Prevention of experimental postoperative adhesions by ancrod defibrinogenation. In: *J Surg Res* 18 (4), S. 377-384.
- Chowdhury, S. M.; Hubbell, J. A. (1996): Adhesion prevention with ancrod released via a tissue-adherent hydrogel. In: *J Surg Res* 61 (1), S. 58-64.
- 10 Cohen, Z.; Senagore, A. J.; Dayton, M. T.; Koruda, M. J.; de Beck; Wolff, B. G. et al. (2005): Prevention of postoperative abdominal adhesions by a novel, glycerol/sodium hyaluronate/carboxymethylcellulose-based bioresorbable membrane: a prospective, randomized, evaluator-blinded multicenter study. In: *Diseases of the colon and rectum* 48 (6), S. 1130-1139.
- 15 Diamond, M. P.; Kruger, M.; Saed, G. M. (2004): Effect of Tisseel on expression of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. In: *Fertility and sterility* 81 (6), S. 1657-1664.
- Ellis, H.; Moran, B. J.; Thompson, J. N.; Parker, M. C.; Wilson, M. S.; Menzies, D. et al. (1999): Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study. In: *Lancet* 353 (9163), S. 1476-1480.
- 20 Fossum, G. T.; Silverberg, K. M.; Miller, C. E.; Diamond, M. P.; Holmdahl, L. (2011): Gynecologic use of Sepraspay Adhesion Barrier for reduction of adhesion development after laparoscopic myomectomy: a pilot study. In: *Fertil Steril* 96 (2), S. 487-491.
- 25 Hellebrekers, B. W. J.; Emeis, J. J.; Kooistra, T.; Trimbos, J. B.; Moore, N. R.; Zwinderman, K. H.; Trimbos-Kemper, T. C. (2005): A role for the fibrinolytic system in postsurgical adhesion formation. In: *Fertil Steril* 83 (1), S. 122-129.
- Hellebrekers, B. W.; Trimbos-Kemper, T. C.; Boesten, L.; Jansen, F. W.; Kolkman, W.; Trimbos, J. B. et al. (2009): Preoperative predictors of postsurgical adhesion formation and the Prevention of Adhesions with Plasminogen Activator (PAPA-study): results of a clinical pilot study. In: *Fertil Steril* 91 (4), S. 1204-1214.
- 30 Hellebrekers, B. W. J.; Kooistra, T. (2011): Pathogenesis of postoperative adhesion formation. In: *Br J Surg* 98 (11), S. 1503-1516.
- 35 Hill-West, J. L.; Dunn, R. C.; Hubbell, J. A. (1995): Local release of fibrinolytic agents for adhesion prevention. In: *J Surgical Research* 59 (6), S. 759-763.
- Klingler, P. J.; Floch, N. R.; Seelig, M. H.; Branton, S. A.; Wolfe, J. T.; Metzger, P. P. (1999): Seprafilm-induced peritoneal inflammation: a previously unknown complication. Report of a case. In: *Diseases of the colon and rectum* 42 (12), S. 1639-1643.
- 40 Kössi, J.; Salminen, P.; Rantala, A.; Laato, M. (2003): Population-based study of the surgical workload and economic impact of bowel obstruction caused by postoperative adhesions. In: *Br J Surg* 90 (11), S. 1441-1444.
- 45 Parker, M. C.; Wilson, M. S.; Menzies, D.; Sunderland, G.; Clark, D. N.; Knight, A. D.; Crowe, A. M. (2005): The SCAR-3 study: 5-year adhesion-related readmission risk following lower abdominal surgical procedures. In: *Colorectal Dis* 7 (6), S. 551-558.
- 50 Parker, M. C.; Ellis, H.; Moran, B. J.; Thompson, J. N.; Wilson, M. S.; Menzies, D. et al. (2001): Postoperative adhesions: ten-year follow-up of 12,584 patients undergoing lower abdominal surgery. In: *Dis Colon Rectum* 44 (6), S. 822-830.
- 55 Ray, N. F.; Denton, W. G.; Thamer, M.; Henderson, S. C.; Perry, S. (1998): Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the United States in 1994. *J Am Coll Surg* 186 (1), S. 1-9.
- Saed, G. M.; Diamond, M. P. (2004): Molecular characterization of postoperative adhesions: the adhesion phenotype. In: *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists* 11 (3), S. 307-314.
- 60 SCAR Group (2013): Pathogenesis, consequences, and control of peritoneal adhesions in gynecologic surgery: a committee opinion. *Fertil Steril* 99 (6), S. 1550-1555.
- Schnüriger, B.; Barmparas, G.; Branco, B. C.; Lustenberger, T.; Inaba, K.; Demetriades, D. (2011): Prevention of postoperative peritoneal adhesions: a review of the literature. In: *The American Journal of Surgery* 201 (1), S. 111-121.
- 65

- Schlapschy M, Binder U, Börger C, et al. (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel.* 26(8):489-501.
- 5 Sikirica, V.; Bapat, B.; Candrilli, S. D.; Davis, K. L.; Wilson, M.; Johns, A. (2011): The inpatient burden of abdominal and gynecological adhesiolysis in the US. *BMC Surg* 11, S. 13.
- Wallwiener, M.; Koninckx, P. R.; Hackethal, A.; Brölmann, H.; Lundorff, P.; Mara, M. et al. (2014): A European survey on awareness of post-surgical adhesions among gynaecological surgeons. In: *Gynecol Surg* 11 (2), S. 105-112.
- 10 LISTADO DE SECUENCIAS
<110> Akesion GmbH
- <120> Proteína de fusión recombinante para la prevención o el tratamiento de adherencias en tejidos u órganos.
- 15 <130> AK01
- <150> DE102014112212.7
<151> 26-08-2014
- 20 <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 25 <211> 1509
<212> ADN
<213> Artificial
- <220>
- 30 <223> Fusión entre ancrodo y el anticuerpo Fc IgG1 humano
- <400> 1

ES 2 799 829 T3

gcgggccgcca ccatgaaatg ggtcaccttt atctcccttc tgttcctctt tagtagcgcc 60
tattctgtca tcggtggtga cgagtgcaat atcaacgagc atcgatttct ggtggcagtg 120
tatgaaggaa ccaactggac ctttatctgc ggggggtcc ttattcacc cagagtgggtc 180
attaccgccg aacctgtgc tcggcgtcga atgaatcttg tgttcgggat gcacaggaaa 240
tcagagaagt ttgatgacga acaggaacgg tatcccaaga agcggactt cattcgatgc 300
aacaaaacc ggactagctg ggatgaggac atcatgctga ttcggctgaa caagcccgtg 360
aataacagcg agcatattgc tcctttgtca ctgccttcca atccgcctat tgtgggtagt 420
gactgccgtg tgatgggctg gggtagcatt aacagaagga tccacgtgct tagcgatgaa 480
cccagatgtg ccaacatcaa tctccacaac ttcacatgt gtcatgggtt gttccgcaag 540
atgcctaaga agggacgcgt actctgtgct ggcgatctgc gcggtagacg ggactcttgc 600
aattcagata gtggaggacc ccttatctgc aacgaagagc tgcatggcat tgtggccaga 660
ggccccaatc catgtgcaca gcccaacaaa ccagctctgt atactagcgt gtacgactac 720
agggattggg tgaacaacgt tatcgccggc aatgcaacct gtagtccagg cggcggcgga 780
gccggtggag gcggggcagg aggaggagga gctagagaca aaacacacac ttgtccacc 840
tgtcctgctc ccgaactgct tgggtggacc agcgtgtttc tgtttccgcc taagcccaaa 900
gacaccctca tgatctcacg gactcccga gttacgtgtg tcgtagtaga cgtgtcacac 960
gaagatcccg aggtcaagtt caactggtat gtggacggag ttgaggttca caacgccaaa 1020
accaaaccga gagaggagca gtacaactcc acatataggg tggtaaagcgt gttgaccgtg 1080
ctgcatcagg attggctgaa tggcaaagag tacaagtgca aggtgtcca taaggctctt 1140
ccagcaccca ttgagaaaac gatctccaag gcgaaaggcc aacctcgtga acctcaggtg 1200
tatactctcc ctccaagtcg cgatgagctc accaagaacc aggtgtcttt gacatgcctc 1260
gtcaaaggg tctaccatc agacatagcc gtcgaatgg agtctaattg ccaaccagag 1320
aataactaca agaccactcc tccggttctg gatagtgatg ggagcttctt tctgtacagc 1380
aagctgacag tcgacaagtc ccgatggcag cagggtaatg tgttcagttg ctctgtgatg 1440
catgaagccc tgcataacca ctatacccag aaaagcctgt ctctgagccc aggaaagtaa 1500
tagaagctt 1509

<210> 2
<211> 495
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Fusión entre ancrodo y el anticuerpo Fc IgG1 humano

ES 2 799 829 T3

<400> 2

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala
1				5					10					15	
Tyr	Ser	Val	Ile	Gly	Gly	Asp	Glu	Cys	Asn	Ile	Asn	Glu	His	Arg	Phe
			20					25					30		
Leu	Val	Ala	Val	Tyr	Glu	Gly	Thr	Asn	Trp	Thr	Phe	Ile	Cys	Gly	Gly
		35					40					45			
Val	Leu	Ile	His	Pro	Glu	Trp	Val	Ile	Thr	Ala	Glu	His	Cys	Ala	Arg
	50					55					60				
Arg	Arg	Met	Asn	Leu	Val	Phe	Gly	Met	His	Arg	Lys	Ser	Glu	Lys	Phe
65					70					75					80
Asp	Asp	Glu	Gln	Glu	Arg	Tyr	Pro	Lys	Lys	Arg	Tyr	Phe	Ile	Arg	Cys
				85					90					95	
Asn	Lys	Thr	Arg	Thr	Ser	Trp	Asp	Glu	Asp	Ile	Met	Leu	Ile	Arg	Leu
			100					105					110		
Asn	Lys	Pro	Val	Asn	Asn	Ser	Glu	His	Ile	Ala	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro
		115					120					125			
Ser	Asn	Pro	Pro	Ile	Val	Gly	Ser	Asp	Cys	Arg	Val	Met	Gly	Trp	Gly
	130					135					140				
Ser	Ile	Asn	Arg	Arg	Ile	His	Val	Leu	Ser	Asp	Glu	Pro	Arg	Cys	Ala
145					150					155					160

ES 2 799 829 T3

Asn Ile Asn Leu His Asn Phe Thr Met Cys His Gly Leu Phe Arg Lys
 165 170 175

Met Pro Lys Lys Gly Arg Val Leu Cys Ala Gly Asp Leu Arg Gly Arg
 180 185 190

Arg Asp Ser Cys Asn Ser Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Cys Asn Glu
 195 200 205

Glu Leu His Gly Ile Val Ala Arg Gly Pro Asn Pro Cys Ala Gln Pro
 210 215 220

Asn Lys Pro Ala Leu Tyr Thr Ser Val Tyr Asp Tyr Arg Asp Trp Val
 225 230 235 240

Asn Asn Val Ile Ala Gly Asn Ala Thr Cys Ser Pro Gly Gly Gly Gly
 245 250 255

Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Arg Asp Lys Thr His
 260 265 270

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 275 280 285

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 290 295 300

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 305 310 315 320

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 325 330 335

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 340 345 350

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 355 360 365

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 370 375 380

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 385 390 395 400

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

ES 2 799 829 T3

gcggccgctc tagagccacc atgaaatggg ttaccttcat tagcctcctg ttctgtttt	60
cctccgccta ttctgttata ggtggtgacg agtghtaacat caacgagcat aggttcctgg	120
tcgcagtgta tgagggcaca aactggacct tcatttgtgg cggggtgctg attcaccag	180
agtgggtaat aacagcggag cattgtgcc gcagacgcat gaatctcgtg tttggaatgc	240
atcgcaaaaag cgagaaattc gatgatgaac aagaaaggta ccctaagaag cgggtacttca	300
ttcggtgcaa caagacaaga acttcatggg acgaggacat catgctgac cgtcttaaca	360
agccggtaaa taacagcggag catatcgac cactctcatt gccagcaac cctcccatcg	420
tgggaagcga ttgcagagt atggggggg gctccatcaa tagaaggatt cacgtgctct	480
ctgatgaacc gcggtgtgcc aacattaatc tgcataattt tactatgtgc catggtctgt	540
ttcgcaaaat gcccaagaaa ggaagagttc tgtgtgcagg cgatctgaga ggaaggagag	600
actcttgcaa ctccgatagt ggcgggccac tgatatgcaa cgaagagctt cacggaatcg	660
tggccagagg tcctaatacca tgtgctcagc ctaacaagcc cgctctgtac accagcgttt	720
atgactaccg ggattgggtc aacaatgtca ttgccggaaa tgccacctgt tcccctggcg	780
gcggcgggtc aggaggagga gggctctggtg gcggcgggtc tgacgcacat aaaagcgaag	840
tggctcaccg gtttaaagat ctcggcgaag agaacttcaa agctcttgta ttgattgcct	900
tcgctcagta cttgcaacag tgccttttcg aggaccacgt gaaactggtg aatgaagtca	960

ES 2 799 829 T3

cagaattcgc taagacgtgt gtggcggatg agagtgctga gaactgtgac aagagtctgc 1020
 acaccctggt tggggataaa ctgtgcactg tcgctactct gcgagaaact tatggcgaaa 1080
 tggccgactg ctgcgccaag caggaacccg agagaaatga atgctttctg cagcaciaaag 1140
 acgacaaccc taatctgccca cgattgggtc ggcccgaggt ggacgtaatg tgcacggcct 1200
 tccacgacaa tgaggaaacc ttctgaaga agtatctcta cgaaatagct cgacggcatc 1260
 cctactttta tgcacccgag ctgctgttct ttgcgaagcg ctataaggcc gctttcacag 1320
 aatgctgtca agctgccgac aaggctgcct gtctcctccc aaaactggac gagctccgcg 1380
 atgaggggaa ggcaagcagt gccaaacagc gcctgaaatg cgcactactt cagaaattcg 1440
 gagagcgcgc attcaaagca tgggcagtgg ctcgattgtc ccagcgattt cctaaggctg 1500
 aatttgccga agtgtcaaag ctggtgacag acctaccaa agtccacaca gaatgctgcc 1560
 atggtgactt gctggagtgc gccgatgaca gagccgatct ggccaagtac atctgtgaaa 1620
 atcaggattc catctcctcc aaactgaaag aatgctgcga gaaacccctg ctggagaaga 1680
 gccattgtat tgctgaggtg gaaaacgatg agatgccagc ggacctcca tcaactggcag 1740
 ccgacttcgt cgagagtaag gacgtgtgta agaactacgc cgaagcgaag gatgtgtttc 1800
 tcgggatggt tctgtacgaa tatgcgcgtc gtcaccccga ttatagcgtg gttctgctgc 1860
 ttaggcttgc caagacttac gaaaccacc tcgagaagtg ttgtgccgcc gctgaccgac 1920
 atgagtgcta cgccaaagta tttgacgagt ttaagcctct ggtcgaggag cctcagaacc 1980
 tgatcaaaca gaactgcgag cttttcgagc agttgggtga atacaaattt cagaatgcc 2040
 tgctcgtcag gtataactaag aaggtgcccc aagtgtctac acctaccttg gttgaggtca 2100
 gccggaatct cggcaaggtc ggcagcaaat gctgtaagca cccagaggca aagcgtatgc 2160
 catgtgcaga ggattatctg agtgtcgtcc tcaaccagct gtgcgtactt cacgaaaaga 2220
 caccagtgtc cgatagggtc actaaatggt gcaccgaatc tctggtgaat cggaggccct 2280
 gtttctcagc tctggaagtt gatgaaacct acgttccgaa ggagttcaat gcagaaacgt 2340
 ttacctttca cgctgacatc tgcacgctct ctgagaagga gaggcagata aagaagcaaa 2400
 cagccctggt agagctggtt aacacaagc ccaaagcaac aaaggagcag ctgaaagcgg 2460
 tgatggatga cttcgccgcg tttgtggaga agtgcgtgaa ggccgacgat aaagaaactt 2520
 gcttcgccga agagggaaag aagcttgtgg cagctagcca agcagccctt gggttgcacc 2580
 accatcacca ccactaatag ccactgtgct ggttcgaa 2618

<210> 4
 <211> 858
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

ES 2 799 829 T3

<220>

<223> Fusión entre ancrodo y albúmina sérica humana

<400> 4

5

```

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1      5      10      15

Tyr Ser Val Ile Gly Gly Asp Glu Cys Asn Ile Asn Glu His Arg Phe
      20      25      30

Leu Val Ala Val Tyr Glu Gly Thr Asn Trp Thr Phe Ile Cys Gly Gly
      35      40      45

Val Leu Ile His Pro Glu Trp Val Ile Thr Ala Glu His Cys Ala Arg
 50      55      60

Arg Arg Met Asn Leu Val Phe Gly Met His Arg Lys Ser Glu Lys Phe
65      70      75      80

Asp Asp Glu Gln Glu Arg Tyr Pro Lys Lys Arg Tyr Phe Ile Arg Cys
      85      90      95

Asn Lys Thr Arg Thr Ser Trp Asp Glu Asp Ile Met Leu Ile Arg Leu
      100      105      110

Asn Lys Pro Val Asn Asn Ser Glu His Ile Ala Pro Leu Ser Leu Pro
      115      120      125

Ser Asn Pro Pro Ile Val Gly Ser Asp Cys Arg Val Met Gly Trp Gly
      130      135      140

Ser Ile Asn Arg Arg Ile His Val Leu Ser Asp Glu Pro Arg Cys Ala
      145      150      155      160

Asn Ile Asn Leu His Asn Phe Thr Met Cys His Gly Leu Phe Arg Lys
      165      170      175

Met Pro Lys Lys Gly Arg Val Leu Cys Ala Gly Asp Leu Arg Gly Arg
      180      185      190

Arg Asp Ser Cys Asn Ser Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Cys Asn Glu
      195      200      205

Glu Leu His Gly Ile Val Ala Arg Gly Pro Asn Pro Cys Ala Gln Pro
      210      215      220

Asn Lys Pro Ala Leu Tyr Thr Ser Val Tyr Asp Tyr Arg Asp Trp Val
      225      230      235      240

```

ES 2 799 829 T3

Asn Asn Val Ile Ala Gly Asn Ala Thr Cys Ser Pro Gly Gly Gly Gly
 245 250 255
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser
 260 265 270
 Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala
 275 280 285
 Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu
 290 295 300
 Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys
 305 310 315 320
 Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu
 325 330 335
 Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly
 340 345 350
 Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys
 355 360 365
 Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg
 370 375 380
 Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr
 385 390 395 400
 Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe
 405 410 415
 Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe
 420 425 430
 Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys
 435 440 445
 Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg
 450 455 460
 Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala
 465 470 475 480
 Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala

ES 2 799 829 T3

				485						490					495
Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys
			500					505					510		
Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala
		515					520					525			
Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu
	530					535					540				
Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val
545					550					555					560
Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe
				565					570					575	
Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val
			580					585					590		
Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr
		595					600					605			
Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu
	610					615						620			
Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val
625					630					635					640
Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys
				645					650					655	
Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn
			660					665					670		
Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro
		675					680					685			
Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys
	690					695						700			
Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu
705					710					715					720
Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val
				725					730					735	

ES 2 799 829 T3

Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg
740 745 750

Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu
755 760 765

Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser
770 775 780

Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val
785 790 795 800

Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp
805 810 815

Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu
820 825 830

Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala
835 840 845

Ala Leu Gly Leu His His His His His His
850 855

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína de fusión recombinante que incluye una enzima fibrinogenolítica con una secuencia de aminoácidos, que está unida en el extremo C y/o en el extremo N con la secuencia de aminoácidos de al menos un dominio de estabilización inerte de alto peso molecular con un peso molecular de > 50 kDa, para su uso en la prevención o el tratamiento de adherencias peritoneales después de intervenciones quirúrgicas en la cavidad peritoneal.
- 10 2. Proteína de fusión recombinante para el uso según la reivindicación 1, **caracterizada por que** el dominio de estabilización inerte está unido con la enzima fibrinogenolítica a través de un enlazador.
3. Proteína de fusión recombinante para el uso según la reivindicación 2, **caracterizada por que** el enlazador consiste en un enlazador de glicina-serina con la secuencia (GGGGGS)_x o un enlazador de glicina-alanina con la secuencia (GGGGA)_xR, en donde A = alanina; G = glicina; S = serina; R = arginina; x = cantidad de repeticiones > 1.
- 15 4. Proteína de fusión recombinante para el uso según la reivindicación 1, **caracterizada por que** en el extremo C de la enzima fibrinogenolítica están acoplados varios dominios de estabilización inertes.
- 20 5. Proteína de fusión recombinante para el uso según la reivindicación 1, **caracterizada por que** en el extremo N de la enzima fibrinogenolítica están acoplados varios dominios de estabilización inertes.
6. Proteína de fusión recombinante para el uso según la reivindicación 1, **caracterizada por que** el dominio de estabilización presenta un peso molecular entre 50 y 150 kDa.
- 25 7. Proteína de fusión recombinante para el uso según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** la enzima fibrinogenolítica consiste en una serina proteasa similar a la trombina.
8. Proteína de fusión recombinante para el uso según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** la enzima fibrinogenolítica consiste en ancrodo o batroxobina, o en una variante recombinante de ancrodo o batroxobina.
- 30 9. Proteína de fusión recombinante para el uso según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** el dominio de estabilización inerte de alto peso molecular consiste en un dominio de proteína o péptido, albúmina sérica, transferrina, un anticuerpo monoclonal o humanizado o un fragmento de anticuerpo, o en un dominio artificial, por ejemplo PAS o XTEN.
- 35 10. Proteína de fusión recombinante para el uso según la reivindicación 1, **caracterizada por que** la secuencia de aminoácidos de albúmina sérica humana, o una parte de esta secuencia con un peso molecular > 50 kDa, está acoplada como dominio de estabilización inerte en el extremo C o en el extremo N de ancrodo o batroxobina como enzima fibrinogenolítica.
- 40 11. Proteína de fusión recombinante para el uso según la reivindicación 10, **caracterizada por que** la proteína de fusión incluye una secuencia de aminoácidos tal como las reproducidas en la SEQ ID N° 2 (fusión en el extremo N) o la SEQ ID N° 4 (fusión en el extremo C), o partes de esta secuencia con actividad fibrinogenolítica.
- 45 12. Proteína de fusión recombinante para el uso según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** la proteína de fusión está incorporada en una matriz biodegradable para una liberación intraperitoneal continua.
- 50 13. Composición farmacéutica que incluye una proteína de fusión recombinante según una de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en la prevención o el tratamiento de adherencias peritoneales después de intervenciones quirúrgicas en la cavidad peritoneal.
14. Composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 13, **caracterizada por que** la composición incluye un medio con actividad osmótica, estando presente la proteína de fusión recombinante en el medio con actividad osmótica, preferiblemente solución de icodextrina.

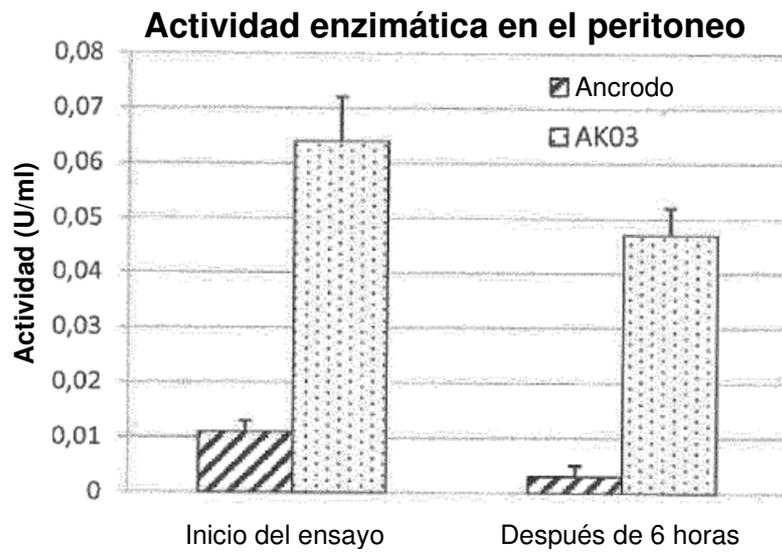


FIGURA 1

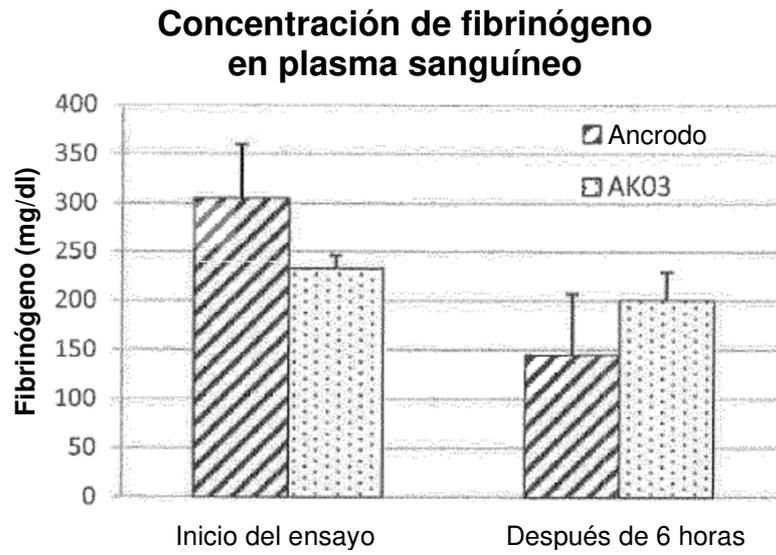


FIGURA 2