

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional
WO 2024/256742 A1

(43) Fecha de publicación internacional
19 de diciembre de 2024 (19.12.2024) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación internacional de patentes:
A61K 38/36 (2006.01) *A61P 7/04* (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)

SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2024/070374

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC,
SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Fecha de presentación internacional:
14 de junio de 2024 (14.06.2024)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P202330502 15 de junio de 2023 (15.06.2023) ES

Publicada:
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
— antes de la expiración del plazo para modificar las
reivindicaciones y para ser republicada si se reciben
modificaciones (Regla 48.2(h))

(71) Solicitante: **FUNDACIÓN PARA LA FORMACIÓN E
INVESTIGACIÓN SANITARIAS DE LA REGIÓN DE
MURCIA** [ES/ES]; PABELLÓN DOCENTE VIRGEN DE
LA ARRIXACA, C/ CAMPO, 12 3º, 30120 El Palmar
(Murcia) (ES).

(72) Inventores: **MARTÍNEZ MARTÍNEZ, Irene**; PABE-
LLÓN DOCENTE VIRGEN DE LA ARRIXACA, C/
CAMPO, 12 3º, 30120 El Palmar (Murcia) (ES). **LUEN-
GO GIL, Ginés**; PABELLÓN DOCENTE VIRGEN DE
LA ARRIXACA, C/ CAMPO, 12 3º, 30120 El Palmar
(ES). **ESPÍN GARCÍA, Salvador**; PABELLÓN DOCEN-
TE VIRGEN DE LA ARRIXACA, C/ CAMPO, 12 3º,
30120 El Palmar (ES). **ZUAZU JAUSORO, Isabel**; PA-
BELLÓN DOCENTE VIRGEN DE LA ARRIXACA, C/
CAMPO, 12 3º, 30120 El Palmar (ES). **CANO GRA-
CIA, Horacio**; PABELLÓN DOCENTE VIRGEN DE LA
ARRIXACA, C/ CAMPO, 12 3º, 30120 El Palmar (ES).

(74) Mandatario: **DÍAZ PACHECO, María Desamparados**;
AVDA. DE GRANADA S/N. CENTRO DE NEGOCIOS
VEGA PLAZA. OFICINA 14, 30500 MOLINA DE SEGU-
RA (MURCIA) (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG,
AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ,
DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO,
JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST,

(54) Title: ANTIDOTE

(54) Título: ANTÍDOTO

(57) Abstract: The present invention discloses a recombinant antithrombin for use in the treatment of haemorrhagic risk in a patient.

(57) Resumen: La presente invención divulga una antitrombina recombinante para su uso en el tratamiento del riesgo hemorrágico en un sujeto.

WO 2024/256742 A1

ANTÍDOTO

Campo de la técnica

La presente invención se encuadra dentro del sector farmacéutico y se refiere a un antídoto contra heparinas y su uso médico en el tratamiento del riesgo hemorrágico.

Antecedentes

La heparina es un glicosamino glicano altamente sulfatado. Tiene la mayor densidad de cargas negativas conocida en una molécula biológica. Es un fármaco anticoagulante que actúa previniendo la formación y extensión del coágulo dentro de la sangre, pero no es capaz de romper o lisar el coágulo ya formado. Se utiliza para el tratamiento de la trombosis venosa profunda y el embolismo pulmonar, el síndrome coronario agudo, la fibrilación auricular, el bypass cardiopulmonar, la circulación extracorpórea, la hemodiálisis y los catéteres venosos centrales o periféricos. La principal complicación del tratamiento con heparina es la hemorragia y la trombocitopenia, que supone la disminución de la cantidad de plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo por debajo de los niveles normales. El mecanismo de acción de la heparina se basa en la unión y activación de la antitrombina, principal inhibidor fisiológico de la cascada de la coagulación. Esta unión ocurre a través de interacciones electrostáticas que provocan un cambio conformacional en la antitrombina que, en consecuencia, inhibe de forma más eficiente a sus dianas Factor Xa de la coagulación (FXa) y Factor IIa de la coagulación o trombina (FIIa) principalmente. De esta forma la heparina actúa como un cofactor de la antitrombina.

Existen distintos tipos de heparinas usadas en la clínica. La heparina no fraccionada es la única fisiológica. Se aísla de los mastocitos presentes en la mucosa intestinal porcina o bovina. Las heparinas de bajo peso molecular se obtienen por fragmentación química o enzimática a partir de las no fraccionadas. Estas heparinas también tienen distinta acción. Las heparinas no fraccionadas tienen principalmente una acción anti-FIIa, mientras que las heparinas de bajo peso molecular (HPBM) y el pentasacárido tienen principalmente acción anti-FXa.

En la clínica, las heparinas que se encuentran en uso son las siguientes:

- Heparina sódica de 1000 U/ml y de 5000 U/ml (Unidad de actividad enzimática por ml)

- Heparinas de bajo peso molecular, Tabla 1:

Tabla 1: Heparinas de bajo peso molecular empeladas en la clínica

HBPM	Dosis profiláctica	Dosis terapéutica	Relación anti-Xa/IIa
DALTEPARINA Fragmin®	2500-5000 UI/día	200UI/Kg/24h	2.7/1
ENOXAPARINA Clexane ®	20-40 mg/día	1mg/Kg/12 h 1.5mg/kg/24 h	3.8/1
NADROPARINA Fraxiparina ®	0.3-0.6 ml/día	0.1 ml/10 Kg/12 h FORTE =/24 h	3.6/1
BEMIPARINA Hibor ®	2.500-3.500 UI/día	115 UI/kg/día	8/1
TINZAPARINA Inohep ®	3.500-4.500 UI/día	175 UI/Kg/24h	
Fondaparinux	2.5 mg/día. Si Clr es de 20-50 mL/min 1.5 mg/día	< 50 Kg: 5 mg/día sc 50-100 Kg: 7.5 mg/día sc > 100 Kg: 10 mg/día sc	

UI: unidades internacionales

Sc: subcutáneo

Las distintas heparinas también tienen distintas indicaciones:

- **Heparina sódica:** Cuando hay muy alto riesgo trombótico y hemorrágico. Ejemplo: prótesis valvulares. Tratamiento de trombosis venosa profunda (TVP) de extremidades inferiores con o sin embolismo pulmonar, sólo en fase aguda.
- **Heparinas de bajo peso molecular:** Profilaxis tromboembolismo venoso (TEV) en cirugía general, cuando hay insuficiencia renal u obesidad. Tratamiento TVP de extremidades inferiores con o sin embolismo pulmonar.
- **Fondaparinux:** Profilaxis TEV en cirugía de fractura de cadera y cuando hay insuficiencia renal.

Además, es necesario hacer un ajuste posológico en pacientes con insuficiencia renal, en personas de edad avanzada, en obesos y en embarazadas. Esto es importante ya que las heparinas son consideradas medicamentos de alto riesgo por el Instituto para el

Uso Seguro del Medicamento (ISMP). Los «medicamentos de alto riesgo» son aquellos que cuando no se utilizan correctamente presentan una gran probabilidad de causar daños graves o incluso mortales a los pacientes. Sólo existe un antídoto para las heparinas no fraccionadas, el sulfato de protamina, pero produce hipotensión y braquicardia. Para las heparinas de bajo peso molecular no existe ningún método aprobado para su neutralización. En ficha técnica viene reflejado el uso de sulfato de protamina cuando el sangrado es grave. El sulfato de protamina solo va a neutralizar la fracción anti-IIa de la HBPM y sólo es efectivo si hace menos de 8 horas de su administración. Por tanto, su efectividad es mínima. Hay que tener en cuenta que el exceso de dosis puede tener efectos anticoagulantes, por lo que es mejor no utilizarlo. Las dosis recomendadas en ficha técnica son: Sulfato de protamina: 1 mg por cada 100 UI Anti-Xa de HBPM y si persiste el sangrado: 0.5 mg por cada 100 UI Anti-Xa de HBPM.

En el caso del pentasacárido Fondaparinux tampoco existe ningún antídoto específico. Si existe sangrado grave, se puede utilizar complejo protrombínico.

Otro de los antídotos de heparina que han sido descritos en la bibliografía se basa en la antitrombina, puesto que tiene un dominio de unión a heparina. Esta antitrombina recombinante carecía de uno de sus 4 glicanos, concretamente del glicano N135, lo que favorecía una mayor afinidad por la heparina. Adicionalmente, la incorporación de una prolina en posición 394 disminuía la capacidad anticoagulante de la antitrombina en 3 órdenes de magnitud. En experimentos con ratones, los autores demuestran que esta antitrombina administrada a una concentración 2.5 veces superior a la concentración de la antitrombina plasmática, neutralizaba el 86% la actividad anti-FXa en 5 minutos en ratones tratados con pentasacárido (*Bianchini EP, Fazavana J, Picard V, Borgel D. Development of a recombinant antithrombin variant as a potent antidote to fondaparinux and other heparin derivatives. Blood. 2011;117(6):2054-60*). No divulgan experimentos in vivo con las otras heparinas, solo ex vivo. Esta antitrombina mutada y su uso para el tratamiento o prevención de desórdenes de la coagulación está patentada (EP2175877B1). En la patente, describen la actividad inhibitoria del FXa de distintos mutantes de antitrombina (AT-R393H, AT-Pro394, AT- Δ R393-S394, AT- Δ R393, AT- Δ S394, AT-N135Q-R393H, AT-N135Q-Pro394, AT-N135Q- Δ R393-S394, AT-N135Q- Δ R393, ATN135Q- Δ S394). En ratones, ensayan el efecto de todos estos mutantes como antídotos del pentasacárido.

El antídoto basado en una antitrombina recombinante de la presente invención es mucho mejor que el descrito en EP2175877B1 ya que las mutaciones que presenta respecto a la secuencia de la antitrombina hacen que se exprese mejor y tenga mayor

afinidad por la heparina.

La presente invención divulga a un antídoto basado en una antitrombina recombinante sin capacidad para inhibir a las proteasas diana de la coagulación, pero con mayor afinidad por la heparina que la proteína silvestre. En modelos in vivo en ratón y ex vivo en plasma de pacientes anticoagulados, hemos comprobado que el antídoto de la presente invención es capaz de revertir el efecto anticoagulante de heparinas de bajo peso molecular.

Descripción

En la presente memoria, los términos “antídoto” y “antitrombina recombinante” son sinónimos y se emplean de forma intercambiable. En el estado de la técnica, un antídoto también podría ser una molécula con capacidad de unirse a la heparina y no dejarla actuar sin necesidad de ser una antitrombina recombinante.

El término "antitrombina recombinante" se refiere a una antitrombina, preferentemente una antitrombina humana, que comprende al menos una sustitución, inserción y/o deleción de uno o más aminoácidos dentro de su secuencia de aminoácidos.

En la presente memoria, el término “heparinas de bajo peso molecular” se refiere a heparina con un peso comprendido en el intervalo de alrededor de 4000 a 6500 Daltons.

En la presente memoria, el término "nucleótido" puede referirse a ambos, ribonucleótido o desoxirribonucleótido, a menos que se explique lo contrario.

Existen dos glicoformas de antitrombina en plasma. La glicoforma alfa, con 4 N-glicanos, es la mayoritaria (90-95%), mientras que la glicoforma beta, que carece de N-glicosilación en posición 135, es la minoritaria (5-10%). La generación de glicoforma beta se explica por la presencia de un residuo serina en posición 137, (en la secuencia de la antitrombina madura, una vez eliminado el péptido señal) y responsable de la N-glicosilación de la asparagina (N) 135. La presencia de serina en vez de treonina en posición 137 reduce la eficiencia del primer proceso de incorporación del núcleo glucídico al esqueleto proteico. La ausencia del componente glucídico en el residuo N135 tiene importantes consecuencias funcionales, ya que aumenta de dos a cinco veces la afinidad por heparina y otros glicosaminoglicanos como el heparán sulfato, proceso clave en la activación de la actividad anticoagulante de la antitrombina. Esta glicosilación en la posición 135 produce un impedimento estérico de la conformación

alfa para unirse a la heparina.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que introduciendo las mutaciones 1039TG>AC para dar lugar al cambio de aminoácido M por N y 1044GTG>ACA para dar lugar al cambio de aminoácido V por T. Estas mutaciones producen la adición de un N-glicano nuevo, este glicano está muy alejado de la posición 135 cuya relevancia se ha explicado en el párrafo anterior, por lo tanto el efecto técnico de estas mutaciones es que se aumenta la secreción de la proteína cuando se sintetiza in vitro, ya que los sitios de glicosilación son necesarios para la secreción de antitrombina cuando ésta se expresa en células eucariotas y adicionalmente permite una afinidad por la heparina de más de 2,5 veces superior a la de la Beta-antitrombina ya que las cadenas de glicosilación están implicadas en la unión antitrombina-glicosaminoglicanos similares a la heparina celular.

El estado de la técnica sólo divulga una mutación en la secuencia de nucleótidos correspondiente con el aminoácido 137 para eliminar el N-glicano de la posición 135 que diferencia la Alfa-antitrombina de la Beta-antitrombina, sin embargo, la introducción de las 2 mutaciones indicadas anteriormente, permite la introducción de un nuevo grupo N-glicano en la secuencia que permite que el antídoto de la invención se secrete mejor y tenga mayor afinidad por la heparina.

La presente invención se refiere a un antídoto que comprende

- una antitrombina recombinante codificada en la secuencia de polinucleótidos SEQ ID NO: 2, que presenta las siguientes mutaciones con respecto a SEQ ID NO:1

A) 1039 TG>AC

B) 1044 GTG>ACA

C) 504 TCC> NNN, donde N es cualquier combinación de tres nucleótidos que no se traduzca en una serina, treonina o cisteína

D) Deleción de los nucleótidos en posición 1273, 1274 y 1275 de SEQ ID NO:1

o

- una antitrombina recombinante codificada por una variante de SEQ ID NO: 2 que tenga al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente un 85 % de identidad, aún más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, y aún más preferiblemente un 91 % o

92 % o 93 % o 94 % o 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o incluso hasta un 99 % de identidad con respecto a la secuencia de polinucleótidos SEQ ID NO: 2, manteniendo fijas las mutaciones A)-D) de SEQ ID NO: 2 con respecto a SEQ ID NO:1

para su uso en la prevención y/o tratamiento del riesgo hemorrágico en un sujeto.

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la proteína SERPINC1 en *Homo sapiens*. Esta secuencia es la región comprendida entre el nucleótido 69 hasta el 1463, CDS (Coding Sequence) de Genbank, NM_000488.4 (1552 bp mRNA linear PRI 10-APR-2023)

El término “mutaciones” comprenden al menos una sustitución, inserción y/o supresión de uno o varios nucleótidos que se traducen en un cambio del aminoácido al traducirse la secuencia.

La antitrombina recombinante codificada por una variante de SEQ ID NO: 2 puede comprender una o más mutaciones tal y como se indica en el párrafo anterior.

El efecto técnico de las variaciones 1039 TG>AC y 1044 GTG>ACA se ha explicado en los párrafos anteriores

El efecto técnico de la variación 504 TCC> NNN es que se evita la N-glicosilación del residuo de la asparragina en posición 135, lo que implica que la antitrombina sea de conformación beta en vez de glicoforma alfa.

En una realización particular, la variación 504 TCC> NNN es 504 T>G, esta variación da lugar al cambio de aminoácido S por A.

El efecto técnico de la delección de 3 nucleótidos en posición 1273, 1274 y 1275 de SEQ ID NO:1 que da lugar a una delección de un aminoácido de arginina (ΔR) en dicha posición, la ventaja de esta delección es que el antídoto de la invención se une con mayor afinidad a la heparina, logrando así una capacidad sustancialmente reducida de inhibir factor Xa (FXa) y factor II (FII)

En otra realización particular, el antídoto de la invención comprende una antitrombina recombinante codificada en la SEQ ID NO: 3 que presenta las siguientes mutaciones con respecto a SEQ ID NO:1

A) 1039 TG>AC

B) 1044 GTG>ACA

C) 504 T> G, y

D) Delección de los nucleótidos en posición 1273, 1274 y 1275 de SEQ ID NO:1

o

una antitrombina recombinante codificada por una variante de SEQ ID NO: 3 que tenga al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente un 85 % de identidad, aún más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, y aún más preferiblemente un 91 % o 92 % o 93 % o 94 % o 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o incluso hasta un 99 % de identidad con respecto a la secuencia de polinucleótidos SEQ ID NO: 3, manteniendo fijas las mutaciones A)-D) de SEQ ID NO: 3 con respecto a SEQ ID NO:1

para su uso en la prevención y/o tratamiento del riesgo hemorrágico en un sujeto

La antitrombina recombinante codificada por una variante de SEQ ID NO: 3 puede comprender una o más mutaciones tal y como se ha indicado anteriormente

La secuencia de aminoácidos que codifica la SEQ ID NO:1 se encuentra en SEQ ID NO:4. Esta es la secuencia nativa de la antitrombina humana divulgada en GenPept NP_000479; 464 aa; linear PRI 10-APR-2023

Los 32 primeros aminoácidos de SEQ ID NO: 4 corresponden a un péptido señal que se expresa fisiológicamente, pero se procesa en el interior de la célula de manera que la proteína que se secreta no contiene ese péptido porque se proteoliza, en SEQ ID NO: 5 se divulga la misma secuencia pero sin el péptido señal

De esta forma, la secuencia de aminoácidos traducida a partir de SEQ ID NO: 3, es SEQ ID NO: 6, y las variaciones de aminoácidos son S169A/M347N/V349T/ΔR425 con respecto a SEQ ID NO: 4

La SEQ ID NO: 7 es idéntica a SEQ ID NO: 6, pero sin los 32 primeros aminoácidos que corresponden al péptido señal. Por lo tanto, las mutaciones S169A/M347N/V349T/ΔR425 de SEQ ID NO: 6 son equivalentes a S137A/M315N/V317T/ΔR393 de SEQ ID NO 7

En otra realización particular, el antídoto de la invención comprende una antitrombina recombinante codificada en la SEQ ID NO: 7 que presenta las siguientes mutaciones

con respecto a SEQ ID NO:5

- A) S137A
- B) M315N
- C) V317T, y
- D) ΔR393 de SEQ ID NO:5

o

una antitrombina recombinante codificada por una variante de SEQ ID NO: 7 que tenga al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente un 85 % de identidad, aún más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, y aún más preferiblemente un 91 % o 92 % o 93 % o 94 % o 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o incluso hasta un 99 % de identidad con respecto a la secuencia de polinucleótidos SEQ ID NO: 7, manteniendo fijas las variaciones A)-D) de SEQ ID NO: 7 con respecto a SEQ ID NO: 5

para su uso en la prevención y/o tratamiento del riesgo hemorrágico en un sujeto.

El antídoto que se purifica una vez expresado no tiene el péptido señal, ya que se pierde al trasladarse fuera de la célula, esta sería la forma funcional del péptido

El término “mutaciones” comprenden al menos una sustitución, inserción y/o supresión de uno o varios aminoácidos dentro de la secuencia.

La antitrombina recombinante codificada por una variante de SEQ ID NO: 7 puede comprender una o más mutaciones tal y como se indica en el párrafo anterior

En otra realización particular, el antídoto de la invención comprende una antitrombina recombinante codificada en la SEQ ID NO: 6 que presenta las siguientes mutaciones con respecto a SEQ ID NO:4

- A) S169A
- B) M347N
- C) V349T, y
- D) ΔR425 de SEQ ID NO:4

o

una antitrombina recombinante codificada por una variante de SEQ ID NO: 6 que tenga al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente un 85 % de identidad, aún más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, y aún más preferiblemente un 91 % o 92 % o 93 % o 94 % o 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o incluso hasta un 99 % de identidad con respecto a la secuencia de polinucleótidos SEQ ID NO: 6, manteniendo fijas las variaciones A)-D) de SEQ ID NO: 6 con respecto a SEQ ID NO: 4

para su uso en la prevención y/o tratamiento del riesgo hemorrágico en un sujeto

La antitrombina recombinante codificada por una variante de SEQ ID NO: 6 puede comprender una o más mutaciones tal y como se ha indicado anteriormente.

La antitrombina recombinante de la invención tiene una actividad anticoagulante sustancialmente reducida con respecto a la actividad anticoagulante de la antitrombina nativa, o que no tiene sustancialmente ninguna actividad anticoagulante, dicha antitrombina recombinante que tiene además:

una actividad inhibidora de la trombina sustancialmente reducida, o sustancialmente perdida, o

una actividad inhibidora del factor Xa (FXa) reducida o sustancialmente perdida, o

una actividad inhibidora del factor IIa (FIIa) reducida o sustancialmente perdida, o

una actividad inhibidora de la trombina y una actividad inhibidora del factor Xa y factor IIa sustancialmente reducidas, o sustancialmente perdidas.

La actividad inhibidora de la trombina o del factor Xa está "sustancialmente reducida" significa que la actividad de la antitrombina para inhibir la trombina o el factor Xa está reducida en comparación con dicha actividad en la antitrombina de tipo silvestre. Preferentemente, según la invención, la actividad inhibidora de la trombina o del factor Xa se considera reducida cuando dicha actividad representa de aproximadamente el 90%, o el 80% o el 70% o el 60% o el 50% o el 40% o el 30% a aproximadamente el 5% de la actividad inhibidora de la trombina o del factor Xa de la antitrombina de tipo silvestre. Las actividades inhibidoras anti-Xa y anti-IIa se pueden medir con cualquier sistema conocido en el estado de la técnica.

La actividad inhibidora de la trombina o del factor Xa "sustancialmente perdida" significa

que la actividad de la antitrombina para inhibir la trombina o el factor Xa está ausente en comparación con dicha actividad en la antitrombina de tipo silvestre.

Los términos "tratamiento" y "tratar" utilizados en el presente documento se refieren al tratamiento médico de un sujeto con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, afección patológica o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una enfermedad, afección patológica o trastorno, y también incluye el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociado. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para aliviar los síntomas en lugar de curar la enfermedad, afección patológica o trastorno; el tratamiento preventivo, es decir, el tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados; y el tratamiento de apoyo, es decir, el tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida a la mejora de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados. Se entiende que el tratamiento, aunque esté destinado a curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, afección patológica o trastorno, no tiene por qué producir realmente la curación, mejora, estabilización o prevención. Los efectos del tratamiento pueden medirse o evaluarse como se describe en el presente documento y como se conoce en la técnica, según convenga para la enfermedad, afección patológica o trastorno de que se trate. Dichas mediciones y evaluaciones pueden realizarse en términos cualitativos y/o cuantitativos. Así, por ejemplo, las características o rasgos de una enfermedad, afección patológica o trastorno y/o los síntomas de una enfermedad, afección patológica o trastorno pueden reducirse a cualquier efecto o en cualquier cantidad. En el contexto de un sujeto que padece una enfermedad inflamatoria, los términos "tratamiento" y "tratar" se refieren a la gestión médica de un sujeto con la intención de curar, mejorar o estabilizar dicho riesgo hemorrágico.

En el presente documento, el término "prevenir" se refiere a la administración de la antitrombina recombinante de la invención antes de la aparición de los síntomas clínicos de una enfermedad o afección con el fin de prevenir una manifestación física de las aberraciones asociadas a la enfermedad o afección. En el contexto del riesgo hemorrágico, el término "prevenir" se refiere a la administración de la antitrombina recombinante de la invención antes de la aparición de los síntomas clínicos del riesgo hemorrágico para prevenir el sangrado en el sujeto.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" incluye, entre otros,

animales. El sujeto puede ser un vertebrado, más concretamente un mamífero (por ejemplo, un ser humano, un caballo, un cerdo, un conejo, un perro, una oveja, una cabra, un primate no humano, una vaca, un gato, una cobaya o un roedor), un pez, un ave o un reptil o anfibio. El término no denota una edad o sexo en particular. Por lo tanto, los sujetos adultos y recién nacidos, así como los fetos, ya sean varones o hembras, están cubiertos por la definición de sujeto. Un paciente es un sujeto afectado por una enfermedad o trastorno. El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios. En otro aspecto de la invención, el antídoto para su uso en el tratamiento del riesgo hemorrágico puede administrarse a un sujeto que comprenda un ser humano o un animal, incluidos, entre otros, un ratón, un perro, un gato, un caballo, un bovino o un ovino y similares.

En otra realización particular, la "variante" de cualquiera de las secuencias SEQ_ID NO: 2 o SEQ_ID NO: 3 que codifican para la antitrombina recombinante de la invención podría tener la secuencia de los codones optimizada para la expresión en cualquier célula huésped (un organismo o tipo celular particular, por ejemplo, una línea celular humana,) en, al menos un 10% de los codones, preferiblemente al menos un 20% de los codones, más preferiblemente al menos un 30% de los codones, aún más preferiblemente al menos un 40% de los codones, aún más preferiblemente al menos un 50% de los codones, aún más preferiblemente al menos un 60% de los codones, aún más preferiblemente al menos un 70% de los codones, aún más preferiblemente al menos un 80% de los codones, y aún más preferiblemente al menos un 90% de los codones. La optimización de codones no comprende un cambio en la secuencia de aminoácidos.

En una realización particular, el riesgo hemorrágico está producido por la administración al sujeto de heparina, dicha heparina puede ser una o más de las siguientes, heparina de bajo peso molecular, heparina no fraccionada y pentasacárido, preferentemente heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y/o heparina no fraccionada (HNF), ya que como se demuestra posteriormente en los ejemplos de realización, el antídoto de la invención comprende una actividad inhibidora de los factores IIa y Xa reducida o sustancialmente perdida.

En otra realización particular, la heparina se ha administrado, anteriormente, simultáneamente o a la antitrombina recombinante de la invención.

Es importante que el antídoto de la invención se administre antes de las 24 horas posteriores a la administración del sujeto con la HBPM o con HNF. Un médico sabría

identificar el periodo de tiempo óptimo en el que se ha de administrar el antídoto de la invención para conseguir el mejor efecto anti-hemorrágico, al existir riesgo hemorrágico. Dicho especialista monitorizaría el estado del paciente al que se la ha administrado HBPM o HNF, y si hay sangrado o síntomas de hemorragia, administraría el antídoto de la invención al sujeto.

En otra realización particular, el riesgo hemorrágico está asociado a uno o más de los siguientes procesos, para las que está indicado el tratamiento con heparina: infecciones, inflamaciones o lesiones hipóxicas, en particular la sepsis y la isquemia/reperfusión relacionada con el ictus, la isquemia/reperfusión relacionada con la cirugía y la isquemia/reperfusión relacionada con el trasplante de órganos, trombosis venosa profunda, embolismo pulmonar, síndrome coronario agudo, bypass cardiopulmonar, circulación extracorpórea, hemodiálisis, catéteres venosos centrales o periféricos, tromboembolismo venoso (TEV) en cirugía general cuando hay insuficiencia renal u obesidad, Tratamiento TVP de extremidades inferiores con o sin embolismo pulmonar, cirugía de fractura de cadera, insuficiencia renal, tromboembolismo pulmonar y fibrilación auricular

En una realización preferida el riesgo hemorrágico está asociado a tromboembolismo pulmonar o fibrilación auricular.

En la presente invención, el riesgo hemorrágico también comprende trombocitopenia.

La antitrombina recombinante de la invención se puede administrar a un sujeto que padece, o está en riesgo de padecer, riesgo hemorrágico una cantidad eficaz de dicha antitrombina recombinante que presenta una actividad inhibidora los factores IIa y Xa reducida o sustancialmente perdida. La cantidad puede ser una cantidad desde un mínimo de aproximadamente 0,1 mg de la antitrombina recombinante por Kg del sujeto, aproximadamente 0,2 mg/Kg, o aproximadamente 0,5 mg/Kg, hasta un máximo de aproximadamente 100 mg/Kg, aproximadamente 200 mg/Kg, o aproximadamente hasta 500 mg/kg. Por ejemplo, la cantidad de antitrombina recombinante que presenta una actividad inhibidora de los factores IIa y Xa reducida o sustancialmente perdida puede ser de aproximadamente 0,1 mg/Kg a aproximadamente 100 mg/Kg, de aproximadamente 0,2 mg/Kg a aproximadamente 200 mg/Kg, de aproximadamente 0.5 mg/Kg a unos 500 mg/Kg, de unos 0,1 mg/Kg a unos 10 mg/Kg, de unos 0,1 mg/Kg a unos 20 mg/Kg, de unos 0,1 mg/Kg a unos 50 mg/Kg, de unos 0.5 mg/Kg a unos 20 mg/Kg, de unos 0,5 mg/Kg a unos 50 mg/Kg, de unos 0,5 mg/Kg a unos 100 mg/Kg, de unos 0,5 a unos 200 mg/Kg, de unos 0.5 mg/Kg a unos 500 mg/Kg, de unos 15 mg/Kg

a unos 25 mg/Kg, de unos 15 mg/Kg a unos 50 mg/Kg, de unos 18 mg/Kg a unos 30 mg/Kg, de unos 18 mg/Kg a unos 50 mg/Kg.

Un experto en la materia entendería que la antitrombina recombinante de la presente invención es de uso puntual, cuando haya riesgo de hemorragia y/o se haya administrado heparina a un sujeto, no para un uso sostenido en el tiempo salvo que al sujeto se le estén administrando una o más dosis de heparina de forma continuada en el tiempo.

En una realización adicional, el antídoto de la invención se administra a un sujeto a una dosis de unas 20 UI/kg a unas 600 UI/kg, preferentemente de unas 40 UI/kg a unas 300 UI/kg.

El antídoto de la invención puede administrarse a seres humanos y otros animales por vía intravenosa, oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como polvos, pomadas o gotas), bucal, como aerosol oral o nasal, o similares, preferentemente por vía intravenosa.

Otro objeto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el antídoto de la invención y

- uno o más compuestos activos adicionales, y/o
- uno o más portadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables

Los compuestos activos adicionales son todos aquellos habitualmente empleados en la clínica para evitar el riesgo hemorrágico.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, es decir, el material puede ser administrado a un sujeto junto con el compuesto seleccionado sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de manera deletérea con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

Cada uno de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede sustituirse por cualquiera de los otros dos términos. Los términos "un" o "una" pueden referirse a uno o a una pluralidad de los elementos que modifican (por ejemplo, "un reactivo" puede significar uno o más reactivos), a menos que esté contextualmente claro que se describe uno de los elementos o más de uno. El término "aproximadamente", tal como se utiliza aquí, se refiere a un valor dentro del 10% del parámetro subyacente (es decir, más o menos el 10%; por ejemplo, un peso de

"aproximadamente 100 gramos" puede incluir un peso entre 90 gramos y 110 gramos). El uso del término "aproximadamente" al principio de un listado de valores modifica cada uno de los valores (por ejemplo, "aproximadamente 1, 2 y 3" se refiere a "aproximadamente 1, aproximadamente 2 y aproximadamente 3"). Cuando se describe un listado de valores, el listado incluye todos los valores intermedios y todos los valores fraccionarios de los mismos (por ejemplo, el listado de valores "80%, 85% o 90%" incluye el valor intermedio 86% y el valor fraccionario 86,4%). Cuando un listado de valores va seguido del término "o más", el término "o más" se aplica a cada uno de los valores enumerados (por ejemplo, el listado de "80%, 90%, 95% o más" o "80%, 90% o 95% o más" se refiere a "80% o más, 90% o más, o 95% o más"). Cuando se describe un listado de valores, el listado incluye todos los rangos entre dos de los valores listados (por ejemplo, el listado de "80%, 90% o 95%" incluye rangos de "80% a 90%", "80% a 95%" y "90% a 95%"). A continuación, se exponen algunos ejemplos de aplicación de la tecnología

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Western Blot que muestra el incremento de la secreción de la antitrombina recombinante (antídoto) de la invención en comparación con la antitrombina alfa (alfa-AT) y la antitrombina beta (beta -AT). R-SDS significa que la electroforesis se realiza con sodium dodecil sulfato (SDS) en condiciones reductoras (con beta-mercaptoetanol o ditiotreitól).

Figura 2: Tinción con plata de la antitrombina recombinante (antídoto) de la invención.

Figura 3: Gráficas que muestran la actividad del antídoto de la invención (antitrombina recombinante) sobre FIIa y FXa. PBS es el control es Tampón fosfato salino

Figura 4: Gráfica que muestra la actividad FXa en ratones tratados con PBS (control), heparina (HPBM), antídoto de la invención (antitrombina recombinante) y el antídoto de la invención (antitrombina recombinante) junto con heparina (HPBM). Vmax significa velocidad máxima.

Ejemplos de realización

Generación del antídoto de la invención

Para introducir las mutaciones deseadas en la secuencia de la antitrombina utilizamos

el plásmido pCEP4 con el cDNA que codifica para la expresión de antitrombina humana NG_012462.1 RefSeqGene, concretamente la SEQ ID NO: 1.

Sobre este plásmido se realizaron mutagénesis dirigidas utilizando los cebadores indicados en la Tabla 1. Las mutaciones se realizaron de forma secuencial en el orden indicado en la tabla de arriba abajo. Un experto en la materia sabría cómo realizar dichas mutaciones empleando el conocimiento general común en el área y protocolos habituales de laboratorio.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores empleados para introducir las mutaciones deseadas en el gen que codifica la antitrombina mediante mutagénesis dirigida.

Mutación	Cebadores	SEQ_ID
S137A forward	5'CGAAAAGCCAACAAAGCCTCCAAGTTAGTATC3'	SEQ ID NO: 8
S137A reverse	5'GATACTAACTTGGAGGCTTTGTTGGCTTTTCG3'	SEQ ID NO: 9
M315N forward	5'GAATTGGAGGAGATGAACCTGGTGGTCCACATG3'	SEQ ID NO: 10
M315N reverse	5'CATGTGGACCACCAGGTTTCATCTCCTCCAATTC3'	SEQ ID NO: 11
V317T forward	5'GAGGAGATGAACCTGACAGTCCACATGCCCCG3'	SEQ ID NO: 12
V317T reverse	5'CGGGGCATGTGGACTGTCAGGTTTCATCTCCTC3'	SEQ ID NO: 13
ΔR393 forward	5'GTTGTGATTGCTGGCTCGCTAAACCCCAAC3'	SEQ ID NO: 14
ΔR393 reverse	5'GTTGGGGTTTAGCGAGCCAGCAATCACAAAC3'	SEQ ID NO: 15

Las reacciones de PCR se realizaron según pasos descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de temperatura y tiempo para la reacción de PCR de mutagénesis dirigida.

Pasos	Condición
1	95 °C 2 min
2	95 °C 30 segundos
3	55 °C 1 min
4	68 °C 12 min

5	Repetición de los pasos 2 a 4, 17 veces.
6	68°C 10 min.

Los reactivos para la reacción de PCR aparecen descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Reactivos y cantidades requeridas para la reacción de PCR con la polimerasa Pfu Turbo de Roche.

Buffer 10X	5 µl
Plásmido	50 ng
dNTPs	500 µM de cada dNTP (2 mM total)
DMSO	1.5 µl
Cebadores (forward y reverse)	0.5 µM
Pfu Turbo	1 µl
H ₂ O	38.5 µl

Una vez realizadas las reacciones de PCR y comprobado que las mutaciones se habían introducido correctamente mediante secuenciación de Sanger, se procedió a la transfección de células eucariotas HEK-EBNA para la expresión de la proteína recombinante. Las células se cultivaron al 60% de confluencia a 37°C, 5% de CO₂, en DMEM con medio GlutaMAX-I (Invitrogen), suplementado con 5% de FBS (Sigma-Aldrich). Se transfectaron 200 g/mL de plásmido durante 30 minutos en OptiMEM con LX (Invitrogen), tal como sugiere el fabricante. Tras 24 horas, las células se lavaron con PBS y se cambiaron a un medio CD-CHO (Invitrogen) suplementado con 4mM de L-glutamina y 0,25 mg/mL de Geneticin (Invitrogen). Las células se cultivaron a 37°C durante 10 días. Se recogió el medio y se sustituyó por otro nuevo cada 2 días. La proteína fue purificada mediante cromatografía de afinidad por heparina en columnas HiTrap Heparin (GE Healthcare), utilizando un ÄKTA Purifier (GE Healthcare) en 100mM Tris-HCl y 10mM ácido cítrico, en un gradiente de 0,15 a 2M NaCl. Por último, la proteína se eluyó y se desaló en columnas de 5 mL de HiTrap Desalting (GE Healthcare) y se almacenaron a 70°C. La proteína se obtuvo con una gran eficiencia, debido a su alta

tasa de secreción al medio y a su elevada afinidad por la heparina. Con un solo paso de purificación se obtuvo una homogeneidad superior al 90%. Esto significa que la proteína está pura en el sobrenadante en al menos un 90% y que de haber proteínas contaminantes no son superiores al 10% del total. Para un solo paso de purificación, esto es una eficiencia muy alta, lo que supone un ahorro de tiempo y recursos para la producción del antídoto de la invención. Estos resultados demuestran que las mutaciones 1039TG>AC y 1044GTG>ACA favorecen la secreción de la antitrombina recombinante de la invención.

Expresión in vitro del antídoto de la invención y evaluación de los niveles de secreción

Se empleó un protocolo similar al descrito en <https://doi.org/10.3390/ijms22020516>. Las células de riñón embrionario humano que expresan el antígeno nuclear 1 de Epstein Barr (HEK-EBNA) se cultivaron hasta el 60% de confluencia a 37°C, 5% de CO₂, en DMEM con medio GlutaMAX-I (Invitrogen, Barcelona, España) suplementado con 5% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se transfectaron 200 µg/mL de plásmidos control o que expresan el antídoto de la invención durante 30 minutos en OptiMEM con LTX (Invitrogen, Barcelona, España), tal como sugiere el fabricante. Se han empleado 2 plásmidos control, uno que expresa la AT-alfa y otro la AT-beta, siendo la AT-alfa SEQ ID NO:1, y AT-beta SEQ ID NO:1 +S137A.

Después de 24 horas, las células se lavaron con PBS y se cambiaron a medio CD-CHO (Invitrogen, Barcelona, España) suplementado con 4mM L-glutamina y 0,25 mg/mL de Geneticina (Invitrogen, Barcelona, España). Las células se cultivaron a 37°C durante 10 días. El medio se recogió y se sustituyó por medio fresco cada 2 días. La purificación del antídoto de la invención se realizó a partir del medio de los días 8 a 10 (48 horas).

El antídoto de la invención se purificó a partir de las recolectas del medio de cultivo mediante cromatografía de afinidad con heparina en columnas HiTrap Heparin (GE Healthcare), utilizando un purificador ÄKTA (GE Healthcare) en 100mMTris-HCl pH 7.4 y 10mM de ácido cítrico, en un gradiente de 0,15 a 3M de NaCl. Las fracciones con antitrombina se aplicaron a una columna HiTrap Q (GE Healthcare) en 50 mMTris-HCl pH 7.4, en un gradiente de 0,15 a 2M de NaCl. Finalmente, las proteínas se desalaron en columnas de 5 ml HiTrap Desalting (GE Healthcare).

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó al 8% en condiciones desnaturizantes. Tras la separación, las proteínas se transfirieron mediante western blot sobre una membrana de difluoruro de polivinilideno. La antitrombina se detectó

mediante inmunotinción con un anticuerpo policlonal frente a antitrombina humana hecho en conejo (Sigma-Aldrich, Madrid, España), seguido de IgG anti-conejo de burro conjugado con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare, Barcelona, España), con detección mediante un kit ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE.UU.). La tasa de secreción a las 24 horas de la transfección en relación con la proteína wild type se evaluó mediante densitometría utilizando el programa ImageJ.

Como se puede observar en la Figura 1, el antídoto de la invención tiene la misma movilidad electroforética que la forma alfa (ya que ambas tienen 4 N-glicanos) y está presente en el medio secretado más que las formas alfa y la beta normales concretamente 2,7 veces más. En la Figura 2 se muestra la tinción plata del antídoto de la invención sobre un gel de poliacrilamida en el que se ha realizado una electroforesis con SDS en condiciones reductoras que muestra la pureza de la antitrombina recombinante (antídoto) en distintas concentraciones en microgramos.

Afinidad por heparina mediante determinación de la emisión de fluorescencia intrínseca

La constante de disociación para la interacción de la antitrombina con la heparina se determinó como se ha descrito previamente (*Langdown J, Belzar KJ, Savory WJ, Baglin TP, Huntington JA. The critical role of hinge-region expulsion in the induced-fit heparin binding mechanism of antithrombin. J.Mol.Biol. 2009;386:1278-1289*). Brevemente, el cambio en la fluorescencia intrínseca de la antitrombina, a una concentración de 25-50 nM se monitorizó a 340 nM durante la titración de la heparina de bajo peso molecular (Enoxaparina, Rovi, España) en un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Agilent technologies, Barcelona), excitando a 280 nm y con una apertura de 2.5 nm, tanto para la excitación como para la emisión. Todas las titulaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con una fuerza iónica fisiológica ($I = 0.15$) en tampón 20 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% polietilen glicol 8000, pH 7.4. La intensidad de la emisión de fluorescencia se tomó como el promedio de 100 medidas registradas a intervalos de 1 segundo para cada adición de heparina. Los datos se ajustaron siguiendo la siguiente fórmula:

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{max}}{2[AT]_0} \times \left\{ ([AT]_0 + [H]_0 + K_d) - \sqrt{([AT]_0 + [H]_0 + K_d)^2 - 4[H]_0[AT]_0} \right\}$$

Tabla 4: Constante de afinidad por la heparina

	K_D (μ M)	x-Fold
Beta-antitrombina	0.191 ± 0.08	1
Antídoto	0.073 ± 0.01	2.6

Los datos de la tabla 4 demuestran que la antitrombina recombinante de la invención (antídoto) tiene más afinidad por la heparina que la Beta-antitrombina, lo que supone que es capaz de unirse a la heparina con mayor eficiencia que la antitrombina fisiológica con mayor afinidad por la heparina. Así mismo, ninguna de las antitrombinas recombinantes descritas en EP2379101B1 comprende las mutaciones de la presente invención en las posiciones 1039 y 1044 de la cadena de nucleótidos que se traducen en los cambios de los aminoácidos de M315N y V317N, por lo tanto, la antitrombina recombinante de la invención presente mayor afinidad por la heparina que las descritas en EP2379101B1, que se traduce en una mayor actividad anticoagulante.

Ensayo ex vivo: medidas de la actividad anti-FXa de plasmas de pacientes anticoagulados en presencia del antídoto

Las actividades anti-FXa y anti-FIIa se ensayaron incubando antitrombina con heparina de bajo peso molecular (0,096 nM) o heparina no fraccionada (0,03 nM) con FXa (2 μ M) o FIIa (2 μ M), respectivamente. La hidrólisis de los sustratos cromogénicos (S-2765 para FXa o S-2238 para FIIa) (Chromogenix, Izasa, España) se registró a 405 nm durante 10 min en un lector de placas. (Fig 3a y 3b)

Utilizando el equipo ACL-TOP, Werfen (Madrid, España), medimos la actividad anti-FXa añadiendo distintas concentraciones del antídoto de la invención en 500 μ l de plasma de pacientes anticoagulados con heparinas de bajo peso molecular. El equipo empleado está automatizado, por lo que un experto en el área sabría reproducir este experimento. con la información proporcionada.

En los siguientes Ejemplos 1-4, los sujetos fueron tratados con los distintos fármacos y posteriormente se recolectó una muestra de sangre de los pacientes, de la cuál se separó el plasma. Una vez que se observó que la muestra estaba anticoagulada se administró el antídoto de la invención y se observó que podía revertir la anticoagulación de la muestra. El objetivo del experimento era determinar que el antídoto de la invención

es capaz de revertir la unión de la heparina a la antitrombina. Los pacientes de los experimentos no mostraban sangrados.

Las muestras de sangre se obtuvieron tras la administración de los fármacos durante un periodo de tiempo de hasta 24 horas. La concentración inicial del antídoto de la invención es de 600 µg/mL, partiendo de dicha solución se administraron 0, 1, 5, 10, 25, o 50 µL de dicha solución a 500 µL de muestra de suero.

Ejemplo 1. Paciente anticoagulado con Enoxaparina (60 mg cada 12 horas) por un tromboembolismo pulmonar, Tabla 5:

Tabla 5: Resultados del paciente del Ejemplo 1

Dosis en µL de antídoto (600 µg/mL de PBS)	Dosis en µM de antídoto (10,34 µM)	Actividad anti-FXa (UI/ml)	Actividad FXa (mAbs/min)
0	0	0,78 ± 0,01	655,77 ± 4,14
5	0,1	0,69 ± 0,01	699,56 ± 4,48
10	0,21	0,31 ± 0,01	922,85 ± 6,41
25	0,52	0,14 ± 0,01	1047,38 ± 0,78
50	1,034	0,09 ± 0,01	1083,70 ± 3,01

Ejemplo 2. Paciente anticoagulado con un tipo de heparina de bajo peso molecular (Bemiparina) (7500 UI/día) por una fibrilación auricular, Tabla 6.

Tabla 6: Resultados del paciente del Ejemplo 2

Dosis en μL de antídoto (600 $\mu\text{g/mL}$ de PBS)	Dosis en μM de antídoto (10,34 μM)	Actividad anti-FXa (UI/ml)	Actividad FXa (mAbs/min)
0	0	$1,69 \pm 0,02$	$336,52 \pm 5,18$
5	0,1	$1,38 \pm 0,04$	$410,96 \pm 11,09$
10	0,21	$1,06 \pm 0,05$	$515,33 \pm 17,59$
25	0,52	$0,44 \pm 0,01$	$806,65 \pm 2,37$
50	1,03	$0,19 \pm 0,01$	$974,25 \pm 4,45$

Ejemplo 3. Paciente anticoagulado con Bemiparina (5000 UI/día) por una fibrilación auricular Tabla 7.

Tabla 7: Resultados del paciente del Ejemplo 3

Dosis en μL de antídoto (600 $\mu\text{g/mL}$)	Dosis en μM de antídoto (10,34 μM)	Actividad anti-FXa (UI/ml)	Actividad FXa (mAbs/min)
0	0	0,40	752,66
1	0,02	0,36	779,14
5	0,1	0,19	893,56
10	0,21	0,10	954,64
25	0,52	0,05	994,70

50	1,03	0,01	1029,44
----	------	------	---------

Ejemplo 4. Paciente anticoagulado con Bemiparina (5000 UI/día) por una fibrilación auricular Tabla 8.

Tabla 8: Resultados del paciente del Ejemplo 4

Dosis en μL de antídoto (600 $\mu\text{g/mL}$)	Dosis en μM de antídoto (10,34 μM)	Actividad anti-FXa (UI/ml)	Actividad FXa (mAbs/min)
0	0	0,57	682,54
1	0,02	0,51	717,85
5	0,1	0,34	822,42
10	0,21	0,20	919,10
25	0,52	0,08	1007,62
50	1,03	0,06	1025,43

Estos resultados en pacientes muestran que la antitrombina recombinante de la invención es capaz de revertir el efecto anticoagulante de Bemiparina y Enoxaparina.

Ensayos in vivo: Inyección en ratones

Para comprobar el efecto de nuestro antídoto in vivo, llevamos a cabo experimentos con ratones C57BL/6J. Los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de experimentación animal de la Universidad de Murcia y se llevaron a cabo de acuerdo con las guías europeas de experimentación animal. Para ello agrupamos a los ratones en 4 grupos. Cada grupo contenía 5 machos y 5 hembras. Cada ratón fue primero anestesiado con isoflurano administrado por inhalación y recibía una inyección

subcutánea de 100 µl y 10 minutos después una inyección en el seno retroorbital de 100 µl. En el grupo 1, las dos inyecciones contenían PBS. En el grupo 2 inyectamos heparina de bajo peso molecular subcutánea (Clexane) y PBS en el seno retroorbital. En el grupo 3 inyectamos PBS subcutáneo y antídoto en el seno retroorbital. En el grupo 4, inyectamos heparina de bajo peso molecular subcutánea (Clexane) y antídoto en el seno retroorbital. A los 5 minutos de la última inyección, se procedía a la extracción de sangre de la vena cava con jeringuillas que contenían citrato sódico y posteriormente se procedía a eutanasia. La heparina de bajo peso molecular (Clexane) se inyectaba a una dosis de 3 mg/Kg y el antídoto a una concentración de 20 mg/Kg. Una vez extraída la sangre, se aislaba el plasma por centrifugación a 2300g 15 minutos y se medía la actividad anti-FXa.

Los resultados demuestran que el antídoto o antitrombina recombinante de la invención es capaz de revertir el efecto anticoagulante de la heparina, Figura 4.

Listado de secuencias.

SEQ ID NO: 1: Secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la proteína SERPINC1 en *Homo sapiens*. Esta secuencia es la región comprendida entre el nucleótido 69 hasta el 1463, CDS (Coding Sequence) de Genbank, NM_000488.4 (1552 bp mRNA linear PRI 10-APR-2023)

SEQ ID NO: 2: Secuencia de nucleótidos que codifica para el antídoto o proteína recombinante de la invención, incluyendo, con respecto a SEQ ID NO: 1 las mutaciones 504TCC>NNN, 1039TG>AC y 1044GTG>ACA y la delección de 1272CGT

SEQ ID NO: 3: Secuencia de nucleótidos que codifica para el antídoto o proteína recombinante de la invención, incluyendo, con respecto a SEQ ID NO: 1 las mutaciones 504T>G, 1039TG>AC y 1044GTG>ACA y la delección de 1272CGT

SEQ ID NO: 4 Secuencia de aminoácidos de SERPINC1, ver también GenPept NP_000479; 464 aa; linear PRI 10-APR-2023

SEQ ID NO: 5 Secuencia de aminoácidos de SERPINC1 sin el péptido señal

SEQ ID NO: 6 Secuencia de aminoácidos de la antitrombina recombinante de la invención con todas las mutaciones con el péptido señal: S169A/M347N/V349T/ΔR425

SEQ ID NO: 7 Secuencia de aminoácidos de la antitrombina recombinante de la invención con todas las mutaciones sin el péptido señal S137A/M315N/V317T/ΔR393

SEQ ID NO: 8-15 cebadores empleados

Reivindicaciones

1. Un antídoto que comprende

- una antitrombina recombinante codificada en la secuencia de polinucleótidos SEQ ID NO: 2, que presenta las siguientes mutaciones con respecto a SEQ ID NO:1

A) 1039 TG>AC

B) 1044 GTG>ACA

C) 504 TCC> NNN, donde N es cualquier combinación de tres nucleótidos que no se traduzca en una serina, treonina o cisteína

D) Delección de los nucleótidos en posición 1273, 1274 y 1275 de SEQ ID NO:1

o

- una antitrombina recombinante codificada por una variante de SEQ ID NO: 2 que tenga al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente un 85 % de identidad, aún más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, y aún más preferiblemente un 91 % o 92 % o 93 % o 94 % o 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o incluso hasta un 99 % de identidad con respecto a la secuencia de polinucleótidos SEQ ID NO: 2, manteniendo fijas las mutaciones A)-D) de SEQ ID NO: 2 con respecto a SEQ ID NO:1

para su uso en la prevención y/o tratamiento del riesgo hemorrágico en un sujeto

2. El antídoto de acuerdo con la reivindicación anterior, que comprende una antitrombina recombinante codificada en la SEQ ID NO: 3 que presenta las siguientes mutaciones con respecto a SEQ ID NO:1

A) 1039 TG>AC

B) 1044 GTG>ACA

C) 504 T> G, y

D) delección de los nucleótidos en posición 1273, 1274 y 1275 de SEQ ID NO:1

o

una antitrombina recombinante codificada por una variante de SEQ ID NO: 3 que tenga al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente un 85 % de identidad, aún más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, y aún más preferiblemente un 91 % o 92 % o 93 % o 94 % o 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o incluso hasta un 99 % de identidad con respecto a la secuencia de polinucleótidos SEQ ID NO: 3, manteniendo fijas las mutaciones A)-D) de SEQ ID NO: 3 con respecto a SEQ ID NO:1

para su uso en la prevención y/o tratamiento del riesgo hemorrágico en un sujeto

3. El antídoto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprende una antitrombina recombinante codificada en la SEQ ID NO: 6 que presenta las siguientes mutaciones con respecto a SEQ ID NO:4

A) S169A

B) M347N

C) V349T, y

D) ΔR425 de SEQ ID NO:4

o

una antitrombina recombinante codificada por una variante de SEQ ID NO: 6 que tenga al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente un 85 % de identidad, aún más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, y aún más preferiblemente un 91 % o 92 % o 93 % o 94 % o 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o incluso hasta un 99 % de identidad con respecto a la secuencia de polinucleótidos SEQ ID NO: 6, manteniendo fijas las variaciones A)-D) de SEQ ID NO: 6 con respecto a SEQ ID NO: 4

para su uso en la prevención y/o tratamiento del riesgo hemorrágico en un sujeto

4. Un antídoto que comprende una antitrombina recombinante codificada en la SEQ ID NO: 7 que presenta las siguientes mutaciones con respecto a SEQ ID NO:5

A) S137A

B) M315N

C) V317T, y

D) ΔR393 de SEQ ID NO:5

o

una antitrombina recombinante codificada por una variante de SEQ ID NO: 7 que tenga al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente un 85 % de identidad, aún más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, y aún más preferiblemente un 91 % o 92 % o 93 % o 94 % o 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o incluso hasta un 99 % de identidad con respecto a la secuencia de polinucleótidos SEQ ID NO: 7, manteniendo fijas las variaciones A)-D) de SEQ ID NO: 7 con respecto a SEQ ID NO: 5

para su uso en la prevención y/o tratamiento del riesgo hemorrágico en un sujeto.

5. El antídoto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sujeto se selecciona entre un ser humano, un caballo, un cerdo, un conejo, un perro, una oveja, una cabra, un primate no humano, una vaca, un gato, una cobaya o un roedor.

6. El antídoto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el riesgo hemorrágico está producido por la administración al sujeto de heparina, dicha heparina puede ser una o más de las siguientes, heparina de bajo peso molecular, heparina no fraccionada y pentasacárido.

7. El antídoto de acuerdo con la reivindicación anterior donde la heparina es heparina de bajo peso molecular y/o heparina no fraccionada.

8. El antídoto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el riesgo hemorrágico está asociado a uno o más de los siguientes procesos: infecciones, inflamaciones o lesiones hipóxicas, en particular la sepsis y la isquemia/reperfusión relacionada con el ictus, la isquemia/reperfusión relacionada con la cirugía y la isquemia/reperfusión relacionada con el trasplante de órganos, trombosis venosa profunda, embolismo pulmonar, síndrome coronario agudo, bypass cardiopulmonar, circulación extracorpórea, hemodiálisis, catéteres venosos centrales o periféricos, tromboembolismo pulmonar y fibrilación auricular.

9. El antídoto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se administra a un sujeto una cantidad de entre 0,1 mg/Kg a 500 mg/Kg

10. El antídoto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se administra por vía intravenosa, oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica, bucal, o nasal.

11. Una composición farmacéutica que comprende el antídoto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y

- uno o más compuestos activos adicionales, y/o
- uno o más portadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables

FIGURAS

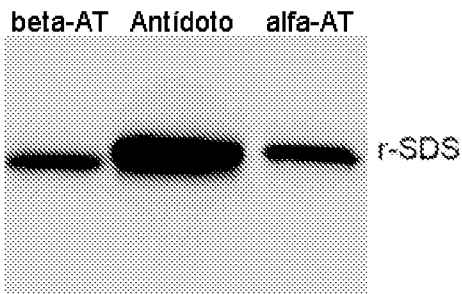


FIG. 1

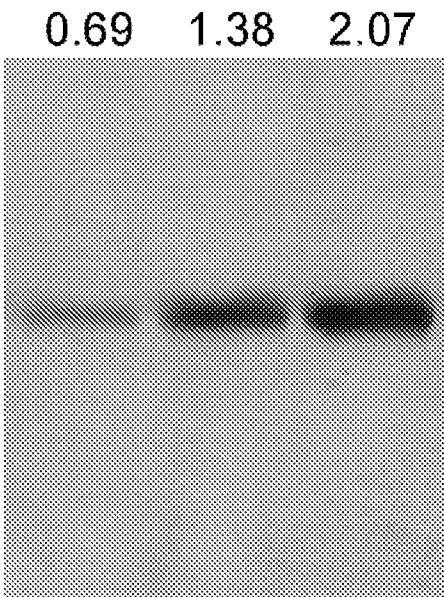


FIG. 2

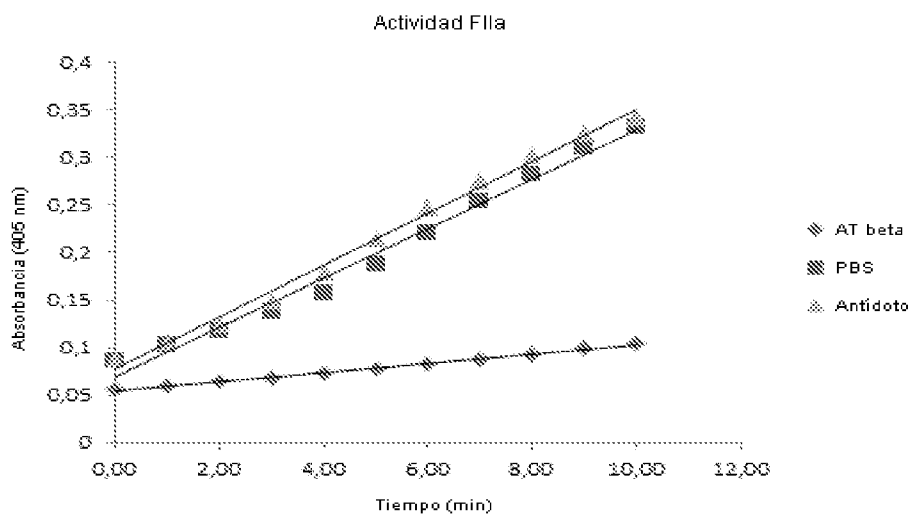


FIG. 3a

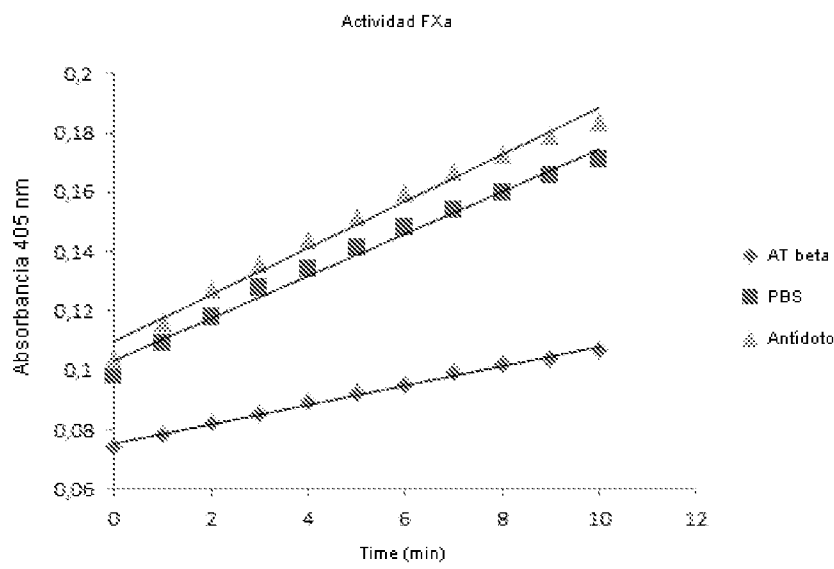


FIG. 3b

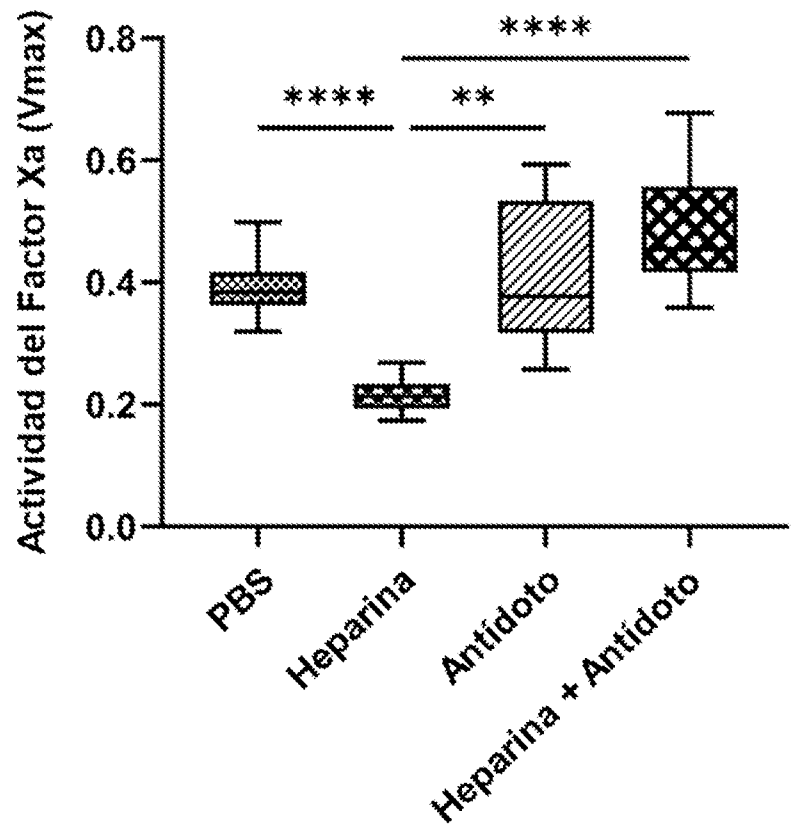


FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2024/070374

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, C07K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, SEARCH SEQUENCES, INTERNET SEARCH.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ÁGUILA SONIA et al. N-Glycosylation as a tool to study antithrombin secretion, conformation, and function. International journal of molecular sciences, 2021, Vol. 22, N° 2.. 2021 Pages 513. Page 523, paragraph 2; table 1; figure 2C.	1-11
A	MARTÍNEZ-MARTÍNEZ IREN, et al. The infective polymerization of conformationally unstable antithrombin mutants may play a role in the clinical severity of antithrombin deficiency. Molecular Medicine, 2012, Vol. 18. 2012 Pages 762-770. column 3, pág. 767.	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22/10/2024

Date of mailing of the international search report
(23/10/2024)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
J. Manso Tomico

Telephone No. 913495583

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2024/070374

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010081878 A1 (UNIV PARIS SUD XI ET AL) 22/07/2010, SEQ. ID. NO 31, claims.	1-11
A	WO 2009013251 A1 (UNIV PARIS SUD XI ET AL) 29/01/2009, SEQ. ID. NOs 2, 3	1-11
A	WO 0069256 A1 (GENZYME TRANSGENICS CORP ET AL) 23/11/2000, examples.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2024/070374

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☐ forming part of the international application as filed:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☒ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/36 (2006.01)
C07K14/81 (2006.01)
A61P7/04 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2024/070374

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2010081878 A1	22.07.2010	JP2012515189 A JP5764499B B2 US2012088715 A1 US8822654 B2 CA2749772 A1 CA2749772 C EP2379101 A1 EP2379101 B1	05.07.2012 19.08.2015 12.04.2012 02.09.2014 22.07.2010 20.02.2018 26.10.2011 12.09.2018
WO2009013251 A1	29.01.2009	DK2175877T T3 ATE539764T T1 US2010298224 A1 US8741844 B2 JP2010533684 A CA2694047 A1 CA2694047 C EP2175877 A1 EP2175877 B1	16.04.2012 15.01.2012 25.11.2010 03.06.2014 28.10.2010 29.01.2009 30.01.2018 21.04.2010 04.01.2012
WO0069256 A1	23.11.2000	DE60037513T T2 ES2299425T T3 CA2368608 A1 AU5008300 A AU782069B B2 ATE381260T T1 EP1194033 A1 EP1194033 A4	05.02.2009 01.06.2008 23.11.2000 05.12.2000 30.06.2005 15.01.2008 10.04.2002 14.07.2004

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2024/070374

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61K, C07K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, SEARCH SEQUENCES, INTERNET SEARCH.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	ÁGUILA SONIA et al. N-Glycosylation as a tool to study antithrombin secretion, conformation, and function. International journal of molecular sciences, 2021, Vol. 22, Nº 2.. 2021 Páginas 513. Página 523, párrafo 2; tabla 1; figura 2C.	1-11
A	MARTÍNEZ-MARTÍNEZ IREN, et al. The infective polymerization of conformationally unstable antithrombin mutants may play a role in the clinical severity of antithrombin deficiency. Molecular Medicine, 2012, Vol. 18. 2012 Páginas 762-770. Columna 3, pág. 767.	1-11

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
22/10/2024

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
23 de octubre de 2024 (23/10/2024)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. Manso Tomico

Nº de teléfono 913495583

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2024/070374

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 2010081878 A1 (UNIV PARIS SUD XI ET AL) 22/07/2010, SEQ. ID. NO 31, reivindicaciones.	1-11
A	WO 2009013251 A1 (UNIV PARIS SUD XI ET AL) 29/01/2009, SEQ. ID. NOs 2, 3	1-11
A	WO 0069256 A1 (GENZYME TRANSGENICS CORP ET AL) 23/11/2000, ejemplos.	1-11

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a **las listas de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias:
- a. ☐ que forma parte de la solicitud internacional tal y como se presentó:
- b. ☒ presentada con posterioridad a la fecha de presentación internacional a los fines de la búsqueda internacional (Regla 13ter.1a)).
- ☐ junto con una declaración según la cual la lista de secuencias no excede la divulgación contenida en la solicitud internacional tal como se presentó.
2. ☐ Con respecto a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional, este informe se ha establecido en la medida en que fue posible llevar a cabo una búsqueda significativa en ausencia de una lista de secuencias conforme con la Norma ST.26 de la OMPI.
3. Comentarios adicionales:

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K38/36 (2006.01)
C07K14/81 (2006.01)
A61P7/04 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2024/070374

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2010081878 A1	22.07.2010	JP2012515189 A JP5764499B B2 US2012088715 A1 US8822654 B2 CA2749772 A1 CA2749772 C EP2379101 A1 EP2379101 B1	05.07.2012 19.08.2015 12.04.2012 02.09.2014 22.07.2010 20.02.2018 26.10.2011 12.09.2018
WO2009013251 A1	29.01.2009	DK2175877T T3 ATE539764T T1 US2010298224 A1 US8741844 B2 JP2010533684 A CA2694047 A1 CA2694047 C EP2175877 A1 EP2175877 B1	16.04.2012 15.01.2012 25.11.2010 03.06.2014 28.10.2010 29.01.2009 30.01.2018 21.04.2010 04.01.2012
WO0069256 A1	23.11.2000	DE60037513T T2 ES2299425T T3 CA2368608 A1 AU5008300 A AU782069B B2 ATE381260T T1 EP1194033 A1 EP1194033 A4	05.02.2009 01.06.2008 23.11.2000 05.12.2000 30.06.2005 15.01.2008 10.04.2002 14.07.2004