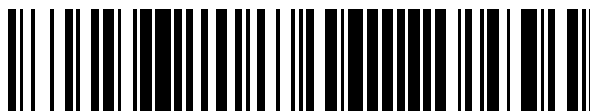


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 841 437**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2016** **PCT/EP2016/058034**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016** **WO16166110**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2016** **E 16719272 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2020** **EP 3283108**

54 Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades hemorrágicas**

30 Prioridad:

13.04.2015 EP 15305544

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2021

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ DE PARIS (25.0%);
UNIVERSITÉ PARIS XIII PARIS-NORD (25.0%) y
UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY (25.0%)**

72 Inventor/es:

**BOUTON, MARIE-CHRISTINE;
LENTING, PETRUS;
DENIS, CÉCILE y
CHRISTOPHE, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 841 437 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

Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades hemorrágicas

Campo de la invención:

La presente invención se refiere a un método y composiciones para el tratamiento de las enfermedades hemorrágicas.

Antecedentes:

Los tratamientos actuales para controlar los episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia y más en general en pacientes con enfermedades hemorrágicas constitutivas presentan muchos inconvenientes. La prevención y el tratamiento de los trastornos hemorrágicos en la hemofilia necesitan el desarrollo de enfoques terapéuticos alternativos que no dependan de la sustitución de FVIII o FIX, debido al desarrollo de aloanticuerpos, llamados inhibidores, que suprimen la actividad de estos factores de coagulación. El tratamiento de estos pacientes con un inhibidor se limita a agentes que evitan el FVIII o IX, tal como el FVIIa recombinante o el complejo de protrombina activado derivado del plasma. Sin embargo, estos productos son costosos y un número sustancial de pacientes no responde a estos agentes.

En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar enfoques terapéuticos alternativos y nuevos fármacos que sean adecuados para prevenir o tratar enfermedades hemorrágicas y episodios hemorrágicos en enfermedades hemorrágicas como la hemofilia, prevenir o tratar enfermedades hemorrágicas raras, enfermedades hemorrágicas constitutivas y enfermedades hemorrágicas con deficiencia en factor V, VIII, IX y/o XI. De esta manera, se ha sugerido que la caracterización de nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedades hemorrágicas puede ser muy deseable.

Los inventores proponen un enfoque innovador que consiste en la selección de un regulador negativo natural de trombina, denominado proteasa nexina-1 o serpinE2, en el tratamiento de la hemofilia. Aunque la proteasa nexina-1 (PN-1) es el inhibidor más poderoso de la trombina (Evans et al., 1991) y un inhibidor eficaz de FXIa (Knauer et al., 2000), dicho concepto nunca se ha propuesto hasta ahora en el contexto de la hemofilia. Los inventores demostraron que la PN-1 es abundante en plaquetas, pero apenas detectable en plasma. Los inventores demostraron que la PN-1 plaquetaria es un regulador negativo tanto de la actividad como de la generación de trombina y que la deficiencia de PN-1 facilita la coagulación in vivo (Boulaftali et al., 2010). Por lo tanto, la selección de PN-1 podría impedir la deficiencia de FVIII o IX.

La selección de la neutralización de PN-1, un anticoagulante natural es una estrategia radicalmente nueva para el tratamiento de enfermedades hemorrágicas. Se ha descrito el uso de proteasa nexina-1 alterada con menor actividad frente a la trombina en el tratamiento de hemorragias (véase el documento de Patente Internacional WO91/19787). Sin embargo, no hay ninguna descripción en la técnica del papel de la proteasa nexina-1 en enfermedades hemorrágicas con deficiencia de factor V, VIII, IX y/o XI, y el uso de inhibidores de proteasa nexina-1 en la prevención o tratamiento de enfermedades hemorrágicas con deficiencia de factor V, VIII, IX y/o XI.

Compendio de la invención:

Como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a un inhibidor de la expresión o actividad de la proteasa nexina-1 (PN-1) para su uso en la prevención o el tratamiento de hemofilia A suave o moderada en un sujeto que lo necesite, en donde el inhibidor de la actividad de la proteasa nexina-1 es un anticuerpo neutralizante de la anti-proteasa nexina-1, y en donde el inhibidor de la expresión de la proteína nexina-1 es un oligonucleótido antisentido o un siRNA para bloquear directamente la traducción del mRNA de la proteasa nexina-1.

Descripción detallada

Los inventores investigaron el papel de la proteasa nexina-1 en las enfermedades hemorrágicas utilizando muestras de plasma rico en plaquetas (PRP) humanas y de ratón, muestras de pacientes con hemofilia A leve, moderada y grave, modelo de hemofilia de ratón, anticuerpo anti-PN-1 y cuantificación de la generación de trombina.

Los inventores tuvieron como objetivo investigar la capacidad de los anticuerpos anti-PN-1 neutralizantes para corregir la generación de trombina en plasma rico en plaquetas (PRP) de hemofílicos y de ratones con hemofilia A (FVIII-KO) e investigar si la neutralización de PN-1 debería restaurar hemostasis en afecciones hemofílicas. La adición de un anticuerpo anti-VIII neutralizante al PRP de un donante de control inhibe la generación de trombina e imita la hemofilia, pero en estas condiciones experimentales, un anticuerpo anti-PN-1 neutralizante restaura la generación de trombina a niveles casi normales. Estos convincentes resultados demuestran la PN-1 neutralizante restaura un nivel suficiente de generación de trombina en hemofílicos para asegurar la hemostasia.

Los inventores observaron que los anticuerpos anti-PN-1 mejoran la generación de trombina en ratones hemofílicos. Los inventores demostraron también que los anticuerpos anti-PN-1 mejoran la generación de trombina en pacientes con hemofilia. Además, los anticuerpos anti-PN-1 mejoran la generación de trombina en pacientes con hemofilia leve

y moderada pero no en pacientes con hemofilia grave. Estos hallazgos establecen un requisito para la inhibición de la PN-1 como anticoagulante específico en las plaquetas y demostraron que la PN-1 bloqueante tiene un papel en el tratamiento de la enfermedad hemorrágica.

Métodos y usos terapéuticos

- 5 En consecuencia, la presente descripción se refiere a un inhibidor de la expresión o actividad de la proteasa nexina-1 (PN-1) para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades hemorrágicas en un sujeto que lo necesite.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “sujeto” se refiere a un mamífero. En particular, un sujeto según la descripción se refiere a cualquier sujeto (preferiblemente humano) que padece o es susceptible de padecer enfermedades hemorrágicas. En particular, un sujeto según la descripción se refiere a cualquier sujeto (preferiblemente humano) que padece o es susceptible de padecer enfermedades hemorrágicas con deficiencia en el factor V, VIII, IX y/o XI.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “enfermedades hemorrágicas” tiene su significado general en la técnica y se refiere a enfermedades hemorrágicas tales como las revisadas en World Health Organisation Classification D65-D69. El término “enfermedades hemorrágicas” se refiere también a enfermedades hemorrágicas constitutivas, trastornos hemorrágicos raros, enfermedades hemorrágicas con deficiencia en el factor V, VIII, IX y/o XI. El término “enfermedades hemorrágicas” se refiere también a enfermedades hemorrágicas tales como hemofilia, deficiencia hereditaria del factor VIII (Hemofilia NOS, Hemofilia A, Hemofilia clásica); deficiencia hereditaria del factor IX (enfermedad de Christmas, deficiencia en el factor IX con defecto funcional, deficiencia del componente de tromboplastina plasmática [PTC], Hemofilia B); defectos de coagulación tales como enfermedad de Von Willebrand, angiohemofilia, deficiencia del factor VIII con defecto vascular, hemofilia vascular; deficiencia hereditaria del factor XI (Hemofilia C, deficiencia de antecedentes de tromboplastina plasmática [PTA]); deficiencia hereditaria de otros factores de coagulación (afibrinogenemia congénita, deficiencia de globulina AC, proacelerina, deficiencia del factor I [fibrinógeno], II [protrombina], V [lábil] VII [estable], X [Stuart-Power], XII [Hageman] y XIII [estabilizador de fibrina], disfibrinogenemia (congénita), hipoproconvertinemia, enfermedad de Owren); trastorno hemorrágico debido a anticoagulantes circulantes (hemorragias durante el uso prolongado de anticoagulantes, hiperheparinemia, aumento de antitrombina, anti-VIIIa, anti-IXa, anti-Xa, y anti-Xia, Coding-Hint); deficiencia adquirida del factor de coagulación (deficiencia del factor de coagulación debido a enfermedad hepática y deficiencia de vitamina K); trombofilia primaria (resistencia a la proteína C activada [mutación del factor V de Leiden], deficiencia en antitrombina, proteína C y proteína S, mutación del gen de la protrombina); otras trombofilias (síndrome de anticardiolipina, síndrome de antifosfolípidos, presencia de anticoagulante del lupus); púrpura, púrpura alérgica, defectos plaquetarios cualitativos, trombocitopenia, fragilidad capilar (hereditaria) y pseudohemofilia vascular. El término “enfermedades hemorrágicas” se refiere también a episodios hemorrágicos en enfermedades hemorrágicas como la hemofilia y otros trastornos hemorrágicos raros.

En particular, la enfermedad hemorrágica es una enfermedad hemorrágica con deficiencia de factor V, VIII, IX y/o XI.

- 35 En particular, la enfermedad hemorrágica es hemofilia.

En particular, el inhibidor de la presente descripción se utiliza en la prevención o el tratamiento de episodios hemorrágicos en enfermedades hemorrágicas.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “proteasa nexina-1” o “PN-1” tiene su significado general en la técnica y se refiere a la proteasa nexina-1 también conocida como SERPINE2. PN-1 tiene su significado general en la técnica y se refiere a un miembro de los inhibidores de las proteasas de serina, denominados serpinas que son reguladores clave en muchos sucesos biológicos. PN-1 es una serpina que apenas se detecta en el plasma, pero que se encuentra en muchos órganos y es producida por la mayoría de los tipos de células incluyendo monocitos, plaquetas y células vasculares. PN-1 es una glicoproteína de 45- a 50 kDa que es codificada por el gen de SERPINE2 en el cromosoma humano 2q33-q35. PN-1 es una cadena única con 378 residuos de aminoácidos que contiene 3 residuos de cisteína que no forman enlaces disulfuro dentro del núcleo proteico de la molécula (Bouton et al., 2012 y Mc Grogan et al., 1988, Boulaftali et al., 2010).

El término “expresión” cuando se utiliza en el contexto de la expresión de un gen o ácido nucleico se refiere a la conversión de la información, contenida en un gen, en un producto génico. Un producto génico puede ser el producto transcripcional directo de un gen (por ejemplo, mRNA, tRNA, rRNA, RNA antisentido, ribozima, RNA estructural o cualquier otro tipo de RNA) o una proteína producida por la traducción de un mRNA. Los productos génicos incluyen también RNAs mensajeros que se modifican, mediante procesos tales como taponamiento, poliadenilación, metilación, y edición, y proteínas (por ejemplo, receptor de fosfatidilserina) modificadas mediante, por ejemplo, metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación, ADP-ribosilación, miristilación y glicosilación.

- 55 Un “inhibidor de expresión” se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión de un gen.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “inhibidor de la actividad de la proteasa nexina-1 (PN-1)” se refiere a cualquier compuesto capaz de inhibir la actividad de la PN-1 y bloquear selectivamente o inactivar la PN-1. Como se utiliza en la presente memoria, el término “bloquear selectivamente o inactivar” se refiere a un compuesto que se une a y bloquea o inactiva preferentemente la PN-1 con una mayor afinidad y potencia, respectivamente, que su interacción con los otros sub-tipos o isoformas de la familia de serpinas. Se contemplan los compuestos que prefieren la PN-1, pero que también pueden bloquear o inactivar otros subtipos de serpinas, como inhibidores parciales o totales. El “inhibidor de la actividad de la proteasa nexina-1 (PN-1)” se refiere a compuestos que bloquean la interacción de la PN-1 con proteínas involucradas en la coagulación tales como trombina y factor XIa (FXIa). El término “inhibidor de la actividad de la proteasa nexina-1 (PN-1)” se refiere también a compuestos que mejoran la generación de trombina en la ausencia de factor V, VIII, IX y/o XI. Típicamente, un inhibidor de proteasa nexina-1 es un anticuerpo, un péptido, un polipéptido, un aptámero o una molécula orgánica pequeña.

Las pruebas y ensayos para determinar si un compuesto es un inhibidor de proteasa nexina-1 son bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos en Bouton et al., 2012 y Boulaftali et al., 2010.

En particular, el inhibidor de la actividad de la PN-1 de la descripción es un aptámero. Los aptámeros son una clase de moléculas que representan una alternativa a los anticuerpos en término de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos se pueden aislar mediante la evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de DNA. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revidado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo restringida conformacionalmente mostrada por una proteína plataforma, tal como Thioredoxin A de *E. Coli* que se seleccionan de bibliotecas combinatorias por dos métodos híbridos (Colas et al., 1996). Luego, después de poner los aptámeros dirigidos contra PN-1 de la descripción como se describió anteriormente, el experto en la técnica puede seleccionar fácilmente aquellos que inhiben la PN-1.

En particular, el inhibidor de la actividad de la PN-1 de la descripción es un anticuerpo (el término que incluye “parte de anticuerpo”).

En particular, el anticuerpo descrito en la presente memoria es un anticuerpo monoclonal. En particular, el anticuerpo descrito en la presente memoria es un anticuerpo policlonal. En particular, el anticuerpo descrito en la presente memoria es un anticuerpo humanizado. En particular, el anticuerpo descrito en la presente memoria es un anticuerpo quimérico. En particular, la parte del anticuerpo descrita en la presente memoria comprende una cadena ligera del anticuerpo. En particular, la parte del anticuerpo descrita en la presente memoria comprende una cadena pesada del anticuerpo. En particular, la parte del anticuerpo descrita en la presente memoria comprende una parte Fab del anticuerpo. En particular, la parte del anticuerpo de la presente memoria comprende una parte F(ab')₂ del anticuerpo. En particular, la parte del anticuerpo descrita en la presente memoria comprende una parte Fc del anticuerpo. En particular, la parte del anticuerpo descrita en la presente memoria comprende una parte Fv del anticuerpo. En particular, la parte del anticuerpo descrita en la presente memoria comprende un dominio variable del anticuerpo. En particular, la parte del anticuerpo descrita en la presente memoria comprende uno o más dominios CDR del anticuerpo.

Como se utiliza en la presente memoria, “anticuerpo” incluye tanto anticuerpos de origen natural como de origen no natural. Específicamente, “anticuerpo” incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, y fragmentos monovalentes y divalentes de los mismos. Además, “anticuerpo” incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente sintéticos, anticuerpos monocatenarios, y fragmentos de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. Un anticuerpo no humano se puede humanizar mediante métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre.

Los anticuerpos se preparan según la metodología convencional. Los anticuerpos monoclonales se pueden generar utilizando el método de Kohler y Milstein (*Nature*, 256:495, 1975). Para preparar anticuerpos monoclonales útiles en la descripción, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza a intervalos apropiados (por ejemplo, dos veces por semana, semanalmente, dos veces al mes o mensualmente) con formas antigénicas de la PN-1. Se puede administrar al animal un “refuerzo” final de antígeno dentro de una semana después del sacrificio. A menudo es deseable utilizar un adyuvante inmunológico durante la inmunización. Los adyuvantes inmunológicos adecuados incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, alumbre, adyuvante Ribi, TiterMax de Hunter, adyuvantes de saponina tales como QS21 o Quil A, o oligonucleótidos inmunoestimuladores que contienen CpG. Otros adyuvantes adecuados son bien conocidos en el campo. Los animales pueden inmunizarse por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intranasal u otras vías. Un animal dado puede inmunizarse con múltiples formas de antígeno por múltiples vías.

Brevemente, el antígeno se puede proporcionar como péptidos sintéticos que corresponden a regiones antigénicas de interés en la PN-1. Después del régimen de inmunización, los linfocitos se aíslan del bazo, ganglio linfático u otro órgano del animal y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada utilizando un agente tal como

polietilenglicol para formar un hidridoma. Después de la fusión, las células se colocan en un medio permisivo para el crecimiento de hibridomas, pero no los socios de fusión, utilizando métodos estándar, como se describe (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3rd edition, Academic Press, New York, 1996). Después del cultivo de los hibridomas, los sobrenadantes celulares se analizan para determinar la presencia de anticuerpos de la especificidad deseada, es decir, que se unen selectivamente al antígeno. Las técnicas analíticas adecuadas incluyen ELISA, citometría de flujo, inmunoprecipitación, y transferencia de Western. Otras técnicas de selección son bien conocidas en el campo. Las técnicas preferidas son aquellas que confirman la unión de los anticuerpos a un antígeno plegado de forma nativa y conformacionalmente intacto, tales como ELISA no desnaturizante, citometría de flujo e inmunoprecipitación.

De manera significativa, como es bien conocido en la técnica, solo una pequeña parte de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase, en general, Clark, W. R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones Fc' y Fc, por ejemplo, son efectores de la cascada de complemento, pero no están implicadas en la unión del antígeno. Un anticuerpo a partir del cual se ha escindido enzimáticamente la región pFc', o que se ha producido sin la región pFc', denominado fragmento F(ab')₂, conserva ambos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. De manera similar, un anticuerpo a partir del cual se ha escindido enzimáticamente la región Fc, o que se ha producido sin la región Fc, denominado fragmento Fab, conserva uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Prosiguiendo, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera del anticuerpo unida covalentemente y una parte de la cadena pesada del anticuerpo denominada Fd. Los fragmentos Fd son el principal determinante de la especificidad del anticuerpo (un solo fragmento de Fd puede asociarse con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd conservan la capacidad de unión al epítipo de forma aislada.

Dentro de la parte de unión al antígeno de un anticuerpo, como es bien conocido en la técnica, hay regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), que interactúan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones marco (FRs), que mantienen la estructura terciaria del paratopo (véase, en general, Clark, 1986; Roitt, 1991). Tanto en el fragmento Fd de cadena pesada como en la cadena ligera de inmunoglobulinas IgG, hay cuatro regiones marco (FR1 a FR4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDRS). Las regiones CDRs y en particular las regiones CDRS, y más particularmente las CDRS de cadena pesada, son en gran parte responsables de la especificidad del anticuerpo.

Ahora está bien establecido en la técnica que las regiones no CDR de un anticuerpo de mamífero pueden reemplazarse con regiones similares de anticuerpos conespecíficos o heteroespecíficos mientras se conserva la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta más claramente en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados" en los que las CDR no humanas se unen covalentemente a regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional.

Esta descripción proporciona, en particular, composiciones y métodos que incluyen formas humanizadas de anticuerpos. Como se utiliza en la presente memoria, "humanizado" describe anticuerpos en los que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR se sustituyen con los aminoácidos correspondientes derivados de moléculas de inmunoglobulina humana. Los métodos de humanización incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en los documentos de Patente U. S. Pat. Nos. 4,816,567, 5,225,539, 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762 y 5,859,205. Los documentos de Patente anteriores U.S. Pat. Nos. 5,585,089 y 5,693,761 y WO 90/07861 proponen también cuatro posibles criterios que se pueden utilizar en el diseño de anticuerpos humanizados. La primera propuesta fue qué para un aceptor, usar un marco de una inmunoglobulina humana particular que sea inusualmente homóloga a la inmunoglobulina del donante que se humanizará, o usar un marco de consenso de muchos anticuerpos humanos. La segunda propuesta fue qué si un aminoácido en el marco de la inmunoglobulina humana es inusual y el aminoácido donante en esa posición es típico de las secuencias humanas, entonces puede seleccionarse el aminoácido donante en lugar del aceptor. La tercera propuesta fue que en las posiciones inmediatamente adyacentes a las 3 CDRs en la cadena de inmunoglobulina humanizada, se puede seleccionar el aminoácido donante en lugar del aminoácido aceptor. La cuarta propuesta fue utilizar el aminoácido donante que reside en las posiciones marco en las que se predice que el aminoácido tiene un átomo de cadena lateral dentro de 3A de las CDRs en un modelo tridimensional del anticuerpo y se predice que es capaz de interactuar con las CDRs. Los métodos anteriores son simplemente ilustrativos de algunos de los métodos que un experto en la técnica podría emplear para preparar anticuerpos humanizados. Un experto en la técnica estará familiarizado con otros métodos para la humanización de anticuerpos.

En particular, para las formas humanizadas de los anticuerpos, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR se han sustituido con aminoácidos de moléculas de inmunoglobulina humana pero donde algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR no han cambiado. Se permiten pequeñas adiciones, eliminaciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno dado. Las moléculas de inmunoglobulina humana adecuadas incluirían las moléculas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA y IgM. Un anticuerpo "humanizado" conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original. Sin embargo, utilizando ciertos métodos de humanización, la afinidad

y/o especificidad de la unión del anticuerpo se puede aumentar utilizando métodos de “evolución dirigida”, como describen Wu et al., / Mol. Biol. 294:151, 1999.

También se pueden preparar anticuerpos monoclonales completamente humanos por inmunización de ratones transgénicos para grandes partes de loci de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, los documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 5,591,669, 5,598,369, 5,545,806, 5,545,807, 6,150,584, y las referencias citadas en los mismos. Estos animales se han modificado genéticamente de modo que existe una delección funcional en la producción de anticuerpos endógenos (por ejemplo, murinos). Los animales se modifican adicionalmente para que contengan todo o una parte del locus del gen de la inmunoglobulina de la línea germinal humana de modo que la inmunización de estos animales dará como resultado la producción de anticuerpos completamente humanos contra el antígeno de interés. Después de la inmunización de estos ratones (por ejemplo, XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), se pueden preparar anticuerpos monoclonales según la tecnología de hibridomas estándar. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y, por lo tanto, no provocarán respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (KAMA) cuando se administren a seres humanos.

También existen métodos in vitro para producir anticuerpos humanos. Éstos incluyen la tecnología de presentación de fagos (documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 5,565,332 y 5,573,905) y estimulación in vitro de células B humanas (documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 5,229,275 y 5,567,610).

Por lo tanto, como resultará evidente para un experto en la técnica, la presente descripción también proporciona fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han sustituido por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos del fragmento F(ab')₂ en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han sustituido por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos de fragmentos Fab en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han sustituido por secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos quiméricos de fragmentos Fd en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han sustituido por secuencias homólogas humanas o no humanas. La presente descripción también incluye los denominados anticuerpos monocatenarios.

Las diversas moléculas y fragmentos de anticuerpo pueden derivar de cualquiera de las clases de inmunoglobulinas comúnmente conocidas, incluyendo, pero no limitado a IgA, IgA secretora, IgE, IgG y IgM. Las subclases de IgG también son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 humanas. En particular, el inhibidor de la actividad de la PN-1 de la descripción es una IgG4 humana.

En particular, el anticuerpo según la descripción es un anticuerpo de dominio único. El término “anticuerpo de dominio único” (sdAb) o “VHH” se refiere al dominio variable de cadena pesada única de anticuerpos del tipo que se puede encontrar en mamíferos camélidos que carecen naturalmente de cadenas ligeras. Dichos VHH se denominan también “nanobody®”. Según la descripción, sdAb puede ser particularmente sdAb de llamas. El término “VHH” se refiere a la cadena pesada única que tiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs): CDR1, CDR2 y CDR3. El término “región determinante de la complementariedad” o “CDR” se refiere a las secuencias de aminoácidos hipervariables que definen la afinidad y especificidad de unión del VHH.

El VHH según la descripción puede ser preparado rápidamente por un experto en la materia utilizando experimentación rutinaria. Las variantes de VHH y la forma modificada de las mismas se pueden producir mediante cualquier técnica conocida en la técnica tal como la maduración in vitro.

Los VHHs o sdAbs se generan habitualmente mediante clonación por PCR del repertorio del dominio V de cDNA de sangre, ganglios linfáticos o bazo obtenido de animales inmunizados en un vector de presentación de fagos, tal como pHEN2. Los VHHs específicos de antígeno se seleccionan comúnmente mediante la selección de bibliotecas de fagos en antígeno inmovilizado, por ejemplo, antígeno recubierto sobre la superficie de plástico en un tubo de ensayo, antígenos biotinilados inmovilizados en perlas de estreptavidina o proteínas de membrana expresadas en la superficie de las células. Sin embargo, dichos VHHs a menudo muestran afinidades más bajas por su antígeno que los VHHs derivados de animales que han recibido varias inmunizaciones. La alta afinidad de los VHHs de las bibliotecas inmunes se atribuye a la selección natural de los VHHs variantes durante la expansión clonal de las células B en los órganos linfoides de los animales inmunizados. La afinidad de los VHHs de bibliotecas no inmunes a menudo se puede mejorar imitando esta estrategia in vitro, es decir, mediante mutagénesis dirigida al sitio de las regiones CDR y rondas adicionales de selección en antígeno inmovilizado en condiciones de mayor rigurosidad (temperatura más alta, alta o baja concentración de sal, pH alto o bajo, y concentraciones bajas de antígeno). Los VHHs derivados de camélidos se expresan fácilmente y se purifican a partir del periplasma de E. coli a niveles mucho más altos que los dominios correspondientes de los anticuerpos convencionales. Los VHHs generalmente muestran una alta solubilidad y estabilidad y también se pueden producir fácilmente en células de levadura, plantas y mamíferos. Por ejemplo, las “Patentes de Hamers” describen métodos y técnicas para generar VHH contra cualquier objetivo deseado (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente US 5,800,988; US 5,874,541 y US 6,015,695). Las “patentes de Hamers” describen más particularmente la producción de VHHs en huéspedes bacterianos tales como E. Col (véase, por ejemplo, el documento de Patente US 6,765,087) y en huéspedes

eucariotas inferiores tal como mohos (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) o en levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (véase, por ejemplo, el documento de Patente US 6,838,254).

En particular, el inhibidor de la descripción es un inhibidor de la expresión de PN-1.

El inhibidor de la expresión de la PN-1 para su uso en la presente descripción puede basarse en constructos de oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido, incluyendo moléculas de RNA antisentido y moléculas de DNA antisentido, actuarían para bloquear directamente la traducción del mRNA de la PN-1 uniéndose a él y así evitar la traducción de proteínas o aumentar la degradación de mRNA, disminuyendo así el nivel de proteínas de la PN-1 y, por lo tanto, la actividad en una célula. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia de transcripción de mRNA que codifica la PN-1 pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante técnicas de fosfodiéster convencionales y administrarse, por ejemplo, mediante inyección o infusión intravenosa. Los métodos para usar técnicas antisentido para aliviar específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia se conoce son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véanse los documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 6,566,135; 6,566,131; 6,365,354; 6,410,323; 6,107,091; 6,046,321; y 5,981,732).

Los RNAs inhibidores pequeños (siRNAs) también pueden funcionar como inhibidores de expresión de la PN-1 para su uso en la presente descripción. La expresión génica de la PN-1 se puede reducir poniendo en contacto al sujeto o la célula con un RNA bicatenario pequeño (dsRNA), o un vector o constructo que provoca la producción de RNA bicatenario pequeño, de modo que la expresión de PN-1 se inhibe específicamente (es decir, RNA interferente o RNAi). Los métodos para seleccionar un dsRNA o un vector que codifica dsRNA apropiado son bien conocidos en la técnica para genes cuya secuencia es conocida (por ejemplo, véase Tuschl, T. et al., (1999); Elbashir, S. M. et al., (2001); Hannon, G.J. (2002); McManus, M.T. et al., (2002); Brummelkamp, T.R. et al., (2002); los documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 6,573,099 y 6,506,559; y los documentos de Patente Internacionales Nos. WO 01/36646, WO 99/32619, y WO 01/68836).

Las ribozimas pueden funcionar también como inhibidores de la expresión de la PN-1 para su uso en la presente descripción. Las ribozimas son moléculas de RNA enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del RNA. El mecanismo de acción de las ribozimas implica la hibridación específica de la secuencia de la molécula de ribozima con el RNA objetivo complementario, seguida de la escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima con motivo de horquilla o cabeza de martillo manipuladas genéticamente que catalizan de forma específica y eficaz la escisión endonucleolítica de las secuencias de mRNA de la PN-1 son por lo tanto útiles dentro del alcance de la presente descripción. Los sitios de escisión de ribozimas específicos dentro de cualquier RNA objetivo potencial, se identifican inicialmente mediante la selección de la molécula objetivo por los sitios de escisión de ribozimas, que típicamente incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, las secuencias cortas de RNA de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen objetivo que contiene el sitio de escisión pueden evaluarse para las características estructurales predichas, tales como la estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia de oligonucleótidos sea inadecuada. La idoneidad de las dianas candidatas también se puede evaluar probando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, utilizando, por ejemplo, ensayos de protección de ribonucleasa.

Tanto los oligonucleótidos antisentido como los ribozimas útiles como inhibidores de la expresión de la PN-1 se pueden preparar mediante métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para síntesis química tales como, por ejemplo, síntesis química de fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de RNA antisentido se pueden generar mediante transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de DNA que codifican la molécula de RNA. Dichas secuencias de DNA se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de RNA polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Pueden introducirse diversas modificaciones de los oligonucleótidos de la descripción como un medio para aumentar la estabilidad intracelular y la vida media. Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de enlaces fosforotioato o 2'-O-metil en lugar de enlaces fosfodiéster dentro del esqueleto del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos antisentido siRNA y ribozimas de la descripción se pueden suministrar *in vivo* solos o en asociación con un vector. En un sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleótido antisentido siRNA o ácido nucleico ribozima a las células y preferiblemente las células que expresan la PN-1. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con degradación reducida en relación con el grado de degradación que resultaría en la ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la descripción incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagemidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de las secuencias de oligonucleótidos antisentido siRNA o ácidos nucleicos ribozimas. Los vectores virales son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a secuencias de ácidos nucleicos de los siguientes virus: retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus del sarcoma murino de Harvey, el virus del tumor mamario murino y el virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adeno-asociado; virus del tipo SV40; virus polio; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus de la vaccinia; virus de la polio; y virus del RNA tal como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica.

5 Vectores virales preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que genes no esenciales se han sustituido con los genes de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (por ejemplo, lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa del RNA viral genómico en DNA con la integración proviral posterior en el DNA celular del huésped. Se han aprobado retrovirus para ensayos de terapia génica en humanos. Los más útiles son aquellos retrovirus que son deficientes en replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Dichos vectores de expresión retrovíricos alterados genéticamente tienen utilidad general para la transducción de genes de alta eficacia in vivo. Protocolos estándar para producir retrovirus de replicación deficiente (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una célula empaquetadora revestida con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular empaquetadora, recolección de partículas virales de medios de cultivo de tejidos e infección de las células diana con partículas virales) se proporcionaron en KRIEGLER (A Laboratory Manual, "W. H. Freeman CO., New York, 1990) y en MURRY ("Methods in Molecular Biology", vol.7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991).

15 Los virus preferidos para ciertas aplicaciones son los adeno-virus y virus adeno-asociados, que son virus de DNA bicatenario que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. El virus adeno-asociado puede modificarse por ingeniería genética para que sea de replicación deficiente y sea capaz de infectar una amplia gama de tipos de células y especies. Además, tiene ventajas tales como, estabilidad frente al calor y disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hematopoyéticas; y falta de inhibición de la superinfección, lo que permite múltiples series de transducciones. Supuestamente, el virus adenoasociado puede integrarse en el DNA celular humano de una manera específica del sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis de inserción y la variabilidad de la expresión del gen insertado característica de la infección retroviral. Además, las infecciones por virus adenoasociados de tipo nativo se han seguido en cultivo de tejidos durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un suceso relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de forma extracromosómica.

25 Otros vectores incluyen vectores de plásmidos. Los vectores de plásmidos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, SANBROOK et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los últimos años, los vectores de plásmidos se han utilizado como vacunas de DNA para administrar genes que codifican antígenos a células in vivo. Son particularmente ventajosos para esto porque no tienen los mismos problemas de seguridad que con muchos de los vectores virales. Sin embargo, estos plásmidos, que tienen un promotor compatible con la célula huésped, pueden expresar un péptido de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos utilizados comúnmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, los plásmidos se pueden diseñar a medida utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligación para eliminar y agregar fragmentos específicos del DNA. Los plásmidos pueden administrarse por diversas vías parenterales, mucosas y tópicas. Por ejemplo, el plásmido del DNA se puede inyectar por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea u otras. También puede administrarse mediante aerosoles o gotas intranasales, supositorio rectal y oralmente. También se puede administrar en la epidermis o la superficie de la mucosa utilizando una pistola de genes. Los plásmidos pueden administrarse en una disolución acuosa, secarse sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de suministro de DNA que incluye, pero no se limita a liposomas, dendrímeros, coqueatos y microencapsulación.

En un aspecto adicional, el inhibidor de la descripción es una proteína de fusión.

El término "proteína de fusión" se refiere al inhibidor según la descripción que se une directamente o mediante un espaciador a al menos un polipéptido heterólogo.

45 Según la descripción, la proteína de fusión comprende el inhibidor según la descripción que se fusiona o directamente o mediante un espaciador en su extremo C-terminal al extremo N-terminal del polipéptido heterólogo, o en su extremo N-terminal al extremo C-terminal del polipéptido heterólogo.

50 Como se utiliza en la presente memoria, el término "directamente" significa que el (primer o último) aminoácido en el extremo terminal (extremo N o C-terminal) del inhibidor se fusiona con el (primer o último) aminoácido en el extremo terminal (extremo N o C-terminal) del polipéptido heterólogo.

En otras palabras, en particular, el último aminoácido del extremo C-terminal de dicho inhibidor se une directamente mediante un enlace covalente con el primer aminoácido del extremo N-terminal de dicho polipéptido heterólogo, o el primer aminoácido del extremo N-terminal de dicho inhibidor se une directamente mediante un enlace covalente con el último aminoácido del extremo C-terminal de dicho polipéptido heterólogo.

55 Como se utiliza en la presente memoria, el término "espaciador" se refiere a una secuencia de al menos un aminoácido que une el inhibidor de la descripción con el polipéptido heterólogo. Tal espaciador puede ser útil para prevenir obstáculos estéricos.

En particular, el polipéptido heterólogo es un agente de direccionamiento plaquetario.

El término “agente de direccionamiento plaquetario” tiene su significado general en la técnica y se refiere, pero no se limita al agente de direccionamiento de plaquetario que incluye, pero no se limita al factor de Willebrand (VWF), agentes que dirigen a receptores plaquetarios específicos, glicoproteínas (GP) tales como GPIb-IX-V (o GPVI) y la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, y los agentes descritos, por ejemplo, en los documentos de Patente U. S. Pat. No. 6,284,871 y US 2006/0160994.

En particular, el polipéptido heterólogo es un péptido que penetra en las células, una secuencia de penetración en las células del Transactivador de la Transcripción (TAT), un péptido permeable a las células o una secuencia de penetración membranosa.

El término “péptidos que penetran en las células” es bien conocido en la técnica y se refiere a secuencias permeables a las células o secuencias de penetración membranosa tales como penetratina, secuencia de penetración mitocondrial TAT y los compuestos descritos en Bechara and Sagan, 2013; Jones and Sayers, 2012; Khafagy et al and Morishita, 2012; Malhi and Murthy, 2012.

Las proteínas de fusión de la descripción se pueden producir por cualquier técnica conocida per se en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, sola o en combinación.

Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica puede producir fácilmente dichas proteínas de fusión, mediante técnicas estándar para la producción de secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar utilizando un método bien conocido de fase sólida, preferiblemente utilizando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Alternativamente, las proteínas de fusión de la descripción se pueden sintetizar mediante técnicas de DNA recombinante como es ahora bien conocido en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos se pueden obtener como productos de expresión del DNA después de la incorporación de las secuencias de DNA que codifican el (poli)péptido deseado en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en huéspedes eucariotas y procariotas adecuados que expresarán la proteína de fusión deseada, a partir de la cual se pueden aislar posteriormente utilizando técnicas bien conocidas.

Las proteínas de fusión de la descripción se pueden utilizar en una forma aislada (por ejemplo, purificada) o contenidas en un vector, tal como una membrana o vesícula lipídica (por ejemplo, un liposoma).

En particular, se contempla que las proteínas de fusión según la descripción se pueden modificar para mejorar su eficacia terapéutica. Dicha modificación de los compuestos terapéuticos se puede utilizar para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo circulatorio, o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes se puede reducir significativamente mediante la combinación con una variedad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución.

Los inventores demostraron que los inhibidores de la PN-1 mejoran la generación de trombina en ausencia del factor VIII. El inhibidor según la descripción presenta un efecto anti-hemorrágico que no depende de FVIII o FIX. En consecuencia, el inhibidor según la descripción permite el uso de dosis bajas de factor de coagulación o la disminución de su frecuencia de administración y evita después el desarrollo de la resistencia al factor de coagulación y la progresión de las enfermedades hemorrágicas leves o moderadas a enfermedades hemorrágicas graves.

En consecuencia, la presente descripción se refiere también al inhibidor según la descripción para su uso en la prevención de la progresión de las enfermedades hemorrágicas leves o moderadas a enfermedades hemorrágicas graves.

En particular, la enfermedad hemorrágica es hemofilia A o hemofilia B.

El término “hemofilia A leve” tiene su significado general en la técnica y se refiere a enfermedades hemorrágicas definidas por un FVIII plasmático de 5-40%.

El término “hemofilia A moderada” tiene su significado general en la técnica y se refiere a enfermedades hemorrágicas definidas por un FVIII plasmático de 1-5%.

El término “hemofilia A grave” tiene su significado general en la técnica y se refiere a enfermedades hemorrágicas definidas por un FVIII plasmático menor del 1%.

El término “hemofilia B leve” tiene su significado general en la técnica y se refiere a enfermedades hemorrágicas definidas por un FIX plasmático de 5-40%.

El término “hemofilia B moderada” tiene su significado general en la técnica y se refiere a enfermedades hemorrágicas definidas por un FIX plasmático de 1-5%.

El término "hemofilia B grave" tiene su significado general en la técnica y se refiere a enfermedades hemorrágicas definidas por un FIX plasmático menor del 1%.

En consecuencia, la presente descripción se refiere también a un inhibidor según la descripción para su uso en la prevención del desarrollo de la resistencia al factor de coagulación.

- 5 En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere al inhibidor según la descripción en combinación con uno o más factores de coagulación para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad hemorrágica en un sujeto que lo necesite.

10 El término "factor de coagulación" tiene su significado general en la técnica y se refiere al factor VIII (FVIII), factor IX (FIX), factor VIIa (FVIIa), complejo de protrombina activado derivado del plasma y fibrinógeno. El término "factor de coagulación" se refiere también al factor de coagulación recombinante o purificado.

Normalmente, el inhibidor según la descripción y el tratamiento de la enfermedad hemorrágica como se describió anteriormente se administran al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz.

15 Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" del inhibidor de la presente descripción como se describió anteriormente se entiende una cantidad suficiente del inhibidor. Se entenderá, sin embargo, que el médico tratante decidirá el uso diario total de los inhibidores y las composiciones de la presente descripción dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis específico terapéuticamente eficaz para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que se va a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del inhibidor específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto; el tiempo de administración, vía de administración, y velocidad de excreción del inhibidor específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o en coincidencia con el inhibidor específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis del inhibidor a niveles más bajos que los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos se puede variar en un amplio rango desde 0,01 hasta 1000 mg por adulto por día. Normalmente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del inhibidor de la presente descripción para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto que se va a tratar. Un medicamento contiene normalmente desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 500 mg del inhibidor de la presente descripción, preferiblemente desde 1 mg hasta aproximadamente 100 mg del inhibidor de la presente descripción. Normalmente se suministra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

En particular, el inhibidor según la descripción se puede utilizar en una concentración entre 0,01 μ M y 20 μ M, particularmente, el inhibidor de la descripción se puede utilizar en una concentración de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 μ M.

35 La cantidad terapéuticamente eficaz del factor de coagulación de la descripción es bien conocida en la técnica. Normalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz del factor de coagulación se refiere al factor de coagulación (tal como FVIII) entre aproximadamente 10 IU a 300 IU/kg de peso corporal, especialmente desde aproximadamente 10 IU hasta 100 IU/kg de peso corporal. Particularmente, la cantidad terapéuticamente eficaz del factor de coagulación se refiere a una cantidad del factor de coagulación de 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 35,0, 40,0 IU/kg de peso corporal.

40 En particular, el factor de coagulación según la descripción se puede utilizar en dosis bajas para evitar el desarrollo de la resistencia al factor de coagulación. Típicamente, el término "dosis bajas" se refiere a un factor de coagulación (tal como FVIII) entre aproximadamente 5 IU a 40 IU/kg de peso corporal. Particularmente, el término "dosis bajas" se refiere a una cantidad del factor de coagulación de aproximadamente 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 35,0, 40,0 IU/kg de peso corporal.

45 Según la presente descripción, el inhibidor de la descripción se administra secuencialmente o de forma concomitante con uno o más factores de coagulación.

La presente descripción se refiere también a un método para prevenir o tratar enfermedades hemorrágicas en un sujeto que lo necesite, que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto el inhibidor de la expresión o actividad de la PN-1.

50 Composición farmacéutica y kits de la descripción

El inhibidor de la descripción se puede utilizar o preparar en una composición farmacéutica.

En particular, la descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de la descripción y un vehículo farmacéutico aceptable para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad hemorrágica en un sujeto que lo necesite.

Normalmente, el inhibidor de la descripción se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar las composiciones farmacéuticas.

- 5 “Farmacéuticamente” o “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica o inconveniente cuando se administran a un mamífero, especialmente un humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación sólido, semi-sólido o líquido no tóxico de cualquier tipo.

- 10 En las composiciones farmacéuticas de la presente descripción para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en forma de administración unitaria, como una mezcla de soportes farmacéuticos convencionales, para animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de vía oral, tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o disoluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, formas de administración intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

- 15 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser en particular disoluciones salinas, isotónicas, estériles (fosfato de monosodio o disodio, sodio, potasio, cloruro de calcio o magnesio, y similares o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente composiciones liofilizadas que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o suero fisiológico, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

- 20 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una jeringabilidad fácil. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

- 25 Las disoluciones que comprenden inhibidores de la descripción como bases libres o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezcladas adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden prepararse también en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

- 30 El inhibidor de la descripción se puede formular en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico y fosfórico, o ácidos orgánicos tales como, acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden derivarse también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares.

- 35 El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

- 40 Las soluciones inyectables estériles se preparan por incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan por incorporación de varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada filtrada de los mismos.

- 45 Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares.

Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero debe volverse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la técnica conocerán los medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente descripción. Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

Además de los inhibidores de la descripción formulados para la administración parenteral, tales como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para la administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma utilizada actualmente.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden incluir cualquier agente adicional que se utiliza en la prevención o tratamiento de enfermedades hemorrágicas.

En particular, dichos agentes activos adicionales pueden estar contenidos en la misma composición o administrarse por separado.

En particular, la composición farmacéutica de la descripción se refiere a una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en la prevención y el tratamiento de enfermedades hemorrágicas.

La descripción también proporciona kits que comprenden el inhibidor de la expresión o actividad de la PN-1 de la descripción. Los kits que contienen el inhibidor de la expresión o actividad de la PN-1 de la descripción encuentran su uso en métodos terapéuticos.

Método de selección

En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un método para seleccionar un compuesto candidato para su uso como un fármaco para la prevención o el tratamiento de enfermedades hemorrágicas en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende las etapas de: i) proporcionar compuestos candidatos y ii) seleccionar los compuestos candidatos que bloqueen la acción de la proteasa nexina-1 (PN-1).

La presente descripción también se refiere al compuesto candidato según la descripción para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades hemorrágicas en un sujeto que lo necesite.

En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un método para seleccionar un compuesto candidato para su uso como un fármaco para la prevención o el tratamiento de enfermedades hemorrágicas en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende las etapas de:

- proporcionar una muestra de células, plasma rico en plaquetas (PRP), tejido u organismo que exprese la PN-1,
- proporcionar un compuesto candidato tal como una molécula orgánica pequeña, anticuerpos, péptido o polipéptido,
- medir la actividad de la PN-1,
- y seleccionar compuestos positivamente candidatos que bloqueen la acción de la PN-1 o inhiban la expresión de la PN-1.

Los métodos para medir la actividad de la PN-1 son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, medir la actividad de la PN-1 implica determinar la activación de la vía de coagulación en la PN-1 clonada y transfectada de una manera estable en una línea de células CHO o medir la generación de trombina en presencia o ausencia del compuesto candidato (Bouton et al., 2012; Boulaftali et al., 2010).

Las pruebas o ensayos para seleccionar y determinar si un compuesto candidato es un inhibidor de PN-1 son bien conocidos en la técnica. Los ensayos in vitro e in vivo se puede utilizar para evaluar la potencia y selectividad de los compuestos candidatos para reducir la actividad de la PN-1.

Las actividades de los compuestos candidatos, su capacidad para unirse a la PN-1 y su capacidad para inhibir la actividad de la PN-1 se pueden probar utilizando plasma rico en plaquetas aislado (PRP) que expresa la PN-1, línea de células CHO clonada y transfectada de manera estable por la PN-1 humana.

Las células que expresan otra serpina distinta de la PN-1 se pueden utilizar para evaluar la selectividad de los compuestos candidatos.

La descripción se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente descripción.

Figuras:

Figura 1: generación de trombina en ratones hemofílicos.

El trombograma de ratones FVIII-KO (curva -.-) muestra un tiempo prolongado hasta el pico y un pico de trombina reducido. La adición del anticuerpo anti-PN-1 neutralizante mejora la generación de trombina en PRP de ratones hemofílicos (curva negra). Esto se ilustra por la aceleración de la generación de trombina (menor tiempo hasta el pico) y el aumento del pico de trombina. Estos cambios dan lugar a un aumento de la velocidad de generación de trombina.

Figura 2: generación de trombina en un paciente con hemofilia A.

El trombograma de un paciente con hemofilia (curva ---) muestra un tiempo de retraso prolongado y un tiempo hasta el pico y un pico de trombina reducido y un potencial de trombina endógena reducido. Como se observó con la adición de FVIII recombinante (curva -.-), el anticuerpo anti-PN-1 neutralizante mejora la generación de trombina en PRP de pacientes con hemofilia A (curva negra). Esto se ilustra por la aceleración de la generación de trombina (menor tiempo hasta el pico) y el aumento del pico de trombina. Estos cambios dan lugar a un aumento de la velocidad de generación de trombina.

Figura 3: generación de trombina en pacientes con hemofilia A leve, moderada y grave.

Velocidad = Pico de trombina / (tiempo hasta el pico-tiempo de retraso)

Como se observó con el FVIII recombinante, el anticuerpo anti-PN-1 neutralizante mejora la velocidad de generación de trombina en pacientes con hemofilia leve y moderada. Por el contrario, no tiene ningún efecto en el PRP de pacientes con hemofilia grave.

Ejemplo:

Material & Métodos

Los inventores determinaron la generación de trombina en muestras de plasma rico en plaquetas (PRP) utilizando el sistema de trombograma automatizado calibrado (CAT) que contiene el lector de placas de fluorescencia Fluoroskan Ascent (Thromboscope BV, Maastricht, Netherlands). Este es un método para cuantificar las propiedades continuas y dinámicas de la generación de trombina después de la adición de un factor tisular en la muestra. Según las instrucciones del fabricante, la generación de trombina se realiza, por triplicado, con 80 µl de PRP en un volumen total de 120 µl. Las muestras enriquecidas con 20 µl de calibrador de trombina (Diagnostica Stago, Asnieres, France) se procesan en paralelo con cada ciclo de muestra de prueba.

El PRP se incuba con el anticuerpo policlonal anti-PN-1 neutralizante durante 20 minutos a 37°C, antes de transferirlo a una placa de microtitulación precalentada (37°C) con una mezcla de TF y fosfolípidos. Veinte microlitros de FluCaKit (sustrato fluorogénico para trombina) con CaCl₂ se inyectan después automáticamente en todos los pocillos, iniciando la reacción. La señal de fluorescencia se lee cada 20 segundos durante 60 minutos en un lector fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems) equipado con un conjunto de filtros de 390/460 nm, y las curvas de generación de trombina se calculan utilizando el software de trombinoscopia.

El ensayo de generación de trombina (TGA) es una herramienta práctica para determinar la coagulación global.

Los parámetros determinados a partir de una curva de generación de trombina (trombograma) son:

- i) el potencial de trombina endógena (ETP), que corresponde al área bajo la curva de generación de trombina
- ii) el pico de trombina, que corresponde al nivel máximo de trombina
- iii) el tiempo de retraso, que corresponde al tiempo necesario para alcanzar la trombina 2 nM
- iv) el tiempo hasta el pico, que corresponde al tiempo necesario para alcanzar la altura de pico.

Generación de trombina en ratones hemofílicos

La sangre citrada se extrae de la vena cava inferior de ratones WT o ratones FVIII-KO para preparar el PRP (150000 plaquetas/µl), que se incuba o no con el anticuerpo anti-PN-1 (150 µg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La TGA se realiza por triplicado con 20 µl de PRP más 20 µl del reactivo de mezcla que contiene TF (0,5 pM) y fosfolípidos y 20 µl de sustrato fluorogénico para trombina con CaCl₂ en un volumen total de 60 µl.

Generación de trombina en un paciente con hemofilia A.

Se utilizaron muestras de pacientes con hemofilia grave (FVIII < 1%), moderada (1% < FVIII < 5%) y leve (5% < FVIII < 40%). Se extrae sangre entera citrada de pacientes para preparar el PRP (150000 plaquetas/µl), que se preincuba o no con el anticuerpo anti-PN-1 (150 µg/ml), o FVIII recombinante (IU/ml) durante 30 minutos a temperatura

ambiente. La TGA se realiza, por triplicado, con 80 µl de PRP más 20 µl de reactivo de mezcla que contiene TF (0,5 pM) y fosfolípidos y 20 µl de sustrato fluorogénico para trombina con CaCl₂ en un volumen total de 120 µl.

Generación de trombina en pacientes con hemofilia A leve, moderada y severa.

Velocidad = Pico de trombina / (tiempo hasta el pico-tiempo de retraso)

- 5 La velocidad de generación de trombina se midió en PRP de pacientes con hemofilia leve, moderada y grave con FVIII recombinante y el anticuerpo anti-PN-1 neutralizante.

Resultados

Inhibición de PN-1 en ratones

- 10 El trombograma (generación de trombina) en ratones hemofílicos (ratones FVIII-KO) (curva ---) muestra un tiempo prolongado hasta el pico y un pico de trombina reducido. La adición del anticuerpo anti-PN-1 neutralizante mejora la generación de trombina en PRP de los ratones hemofílicos (curva negra). Esto se ilustra por la aceleración de la generación de trombina (menor tiempo hasta el pico) y el aumento del pico de trombina. Estos cambios dan lugar a un aumento de la velocidad de generación de trombina (Figura 1).

Inhibición de PN-1 en humanos

- 15 Generación de trombina en pacientes con hemofilia A.

- 20 Como se describió anteriormente, el trombograma clásico de un paciente con hemofilia (curva ---) muestra un tiempo de retraso prolongado y un tiempo hasta el pico y un pico de trombina reducido y un potencial de trombina endógeno reducido. Como se observó con la adición de FVIII recombinante (curva ---), el anticuerpo anti-PN-1 neutralizante puede mejorar la generación de trombina en PRP de pacientes con hemofilia A (curva -). Esto se ilustra por la aceleración de la generación de trombina (menor tiempo hasta el pico) y el aumento del pico de trombina. Estos cambios dan lugar a un aumento en la velocidad de generación de trombina (Figura 2).

Generación de trombina en pacientes con hemofilia A leve, moderada y grave.

- 25 Los fenotipos graves, moderados y leves se definen por un FVIII plasmático de menos del 1%, 1-5% y 5%-40%, respectivamente. Los pacientes moderados y leves representan aproximadamente el 60% de la población con hemofilia A.

Como se observó con el FVIII recombinante, el anticuerpo anti-PN-1 neutralizante mejora la velocidad (pico de trombina / (tiempo hasta el pico-tiempo de retraso) de la generación de trombina en pacientes con hemofilia leve y moderada. Por el contrario, no tiene ningún efecto en el PRP de pacientes con hemofilia grave (Figura 3).

- 30 El anticuerpo anti-PN-1 mejora la generación de trombina en pacientes con hemofilia leve y moderada, pero no en pacientes con hemofilia grave. Estos hallazgos establecen un requisito para la inhibición de la PN-1 como un anticoagulante específico en las plaquetas y demostraron que el bloqueo de la PN-1 tiene un papel en el tratamiento de enfermedades hemorrágicas.

Referencias:

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta descripción.

- 35 Boulaftali Y, Adam F, Venisse L, Ollivier V, Richard B, Taieb S, Monard D, Favier R, Alessi MC, Bryckaert M, Arocas V, Jandrot-Perrus M, Bouton MC. Anticoagulant and antithrombotic properties of platelet protease nexin-1. *Blood*. 2010; **115**: 97-106.

Bouton MC, Boulaftali Y, Richard B, Arocas V, Michel JB, Jandrot-Perrus M. Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology. *Blood*. 2012 Mar 15;119(11):2452-7.

Evans DL, McGrogan M, Scott RW, Carrell RW. Protease specificity and heparin binding and activation of recombinant protease nexin I. *The Journal of biological chemistry*. 1991; **266**: 22307-12.

Knauer DJ, Majumdar D, Fong PC, Knauer MF. SERPIN regulation of factor XIa. The novel observation that protease nexin 1 in the presence of heparin is a more potent inhibitor of factor Xia than C1 inhibitor. *The Journal of biological chemistry*. 2000; **275**: 37340-6.

McGrogan M, Kennedy J, Li MP, et al. Molecular cloning and expression of two forms of human protease nexin I. *Biotechnology*. 1988;6:172-177.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la expresión o actividad de la proteasa nexina-1 para su uso en la prevención o el tratamiento de la hemofilia A leve o moderada en un sujeto que lo necesite, en donde el inhibidor de la actividad de la proteasa nexina-1 es un anticuerpo neutralizante anti-proteasa-nexina-1, y en donde el inhibidor de la expresión de la proteína nexina-1 es un oligonucleótido antisentido o un siRNA para bloquear directamente la traducción del mRNA de la proteasa nexina-1.
2. Un inhibidor de la expresión o actividad de la proteasa nexina-1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de la expresión o actividad de la proteasa nexina-1 se utiliza en la prevención del desarrollo de la resistencia al factor de coagulación.
3. Un inhibidor de la expresión o actividad de la proteasa nexina-1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de la expresión o actividad de la proteasa nexina-1 se utiliza en combinación con uno o más factores de coagulación.
4. El inhibidor de la expresión o actividad de la proteasa nexina-1 en combinación con uno o más factores de coagulación para su uso según la reivindicación 3 en donde dicho factor de coagulación se selecciona del grupo que consiste en factor VIII, factor IX, factor VIIa, complejo de protrombina activado derivado de plasma y fibrinógeno.
5. El inhibidor de la expresión o actividad de la proteasa nexina-1 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde dicho inhibidor se une a un agente de direccionamiento plaquetario.

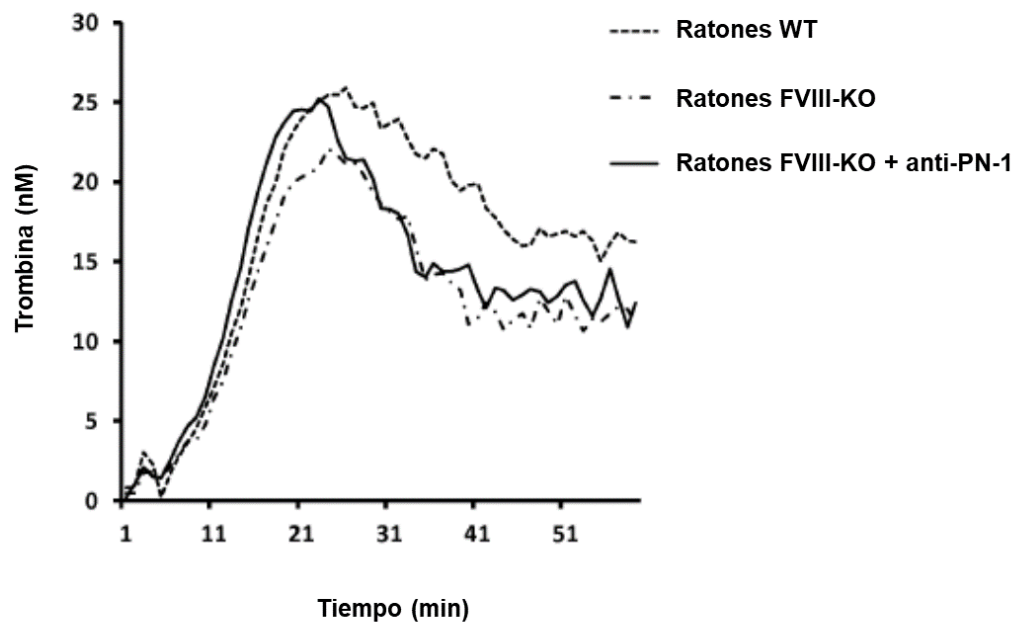


Figura 1

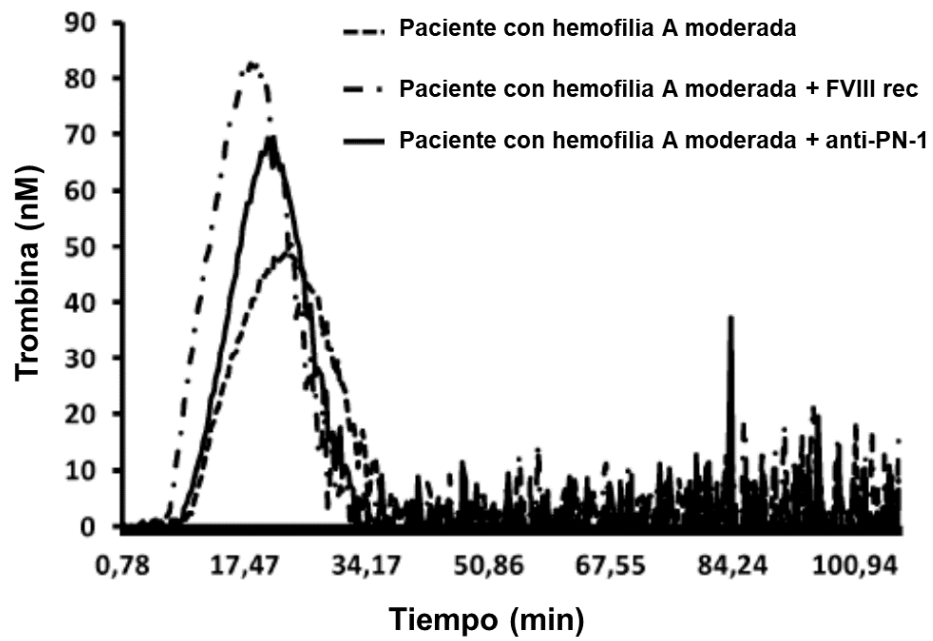


Figura 2

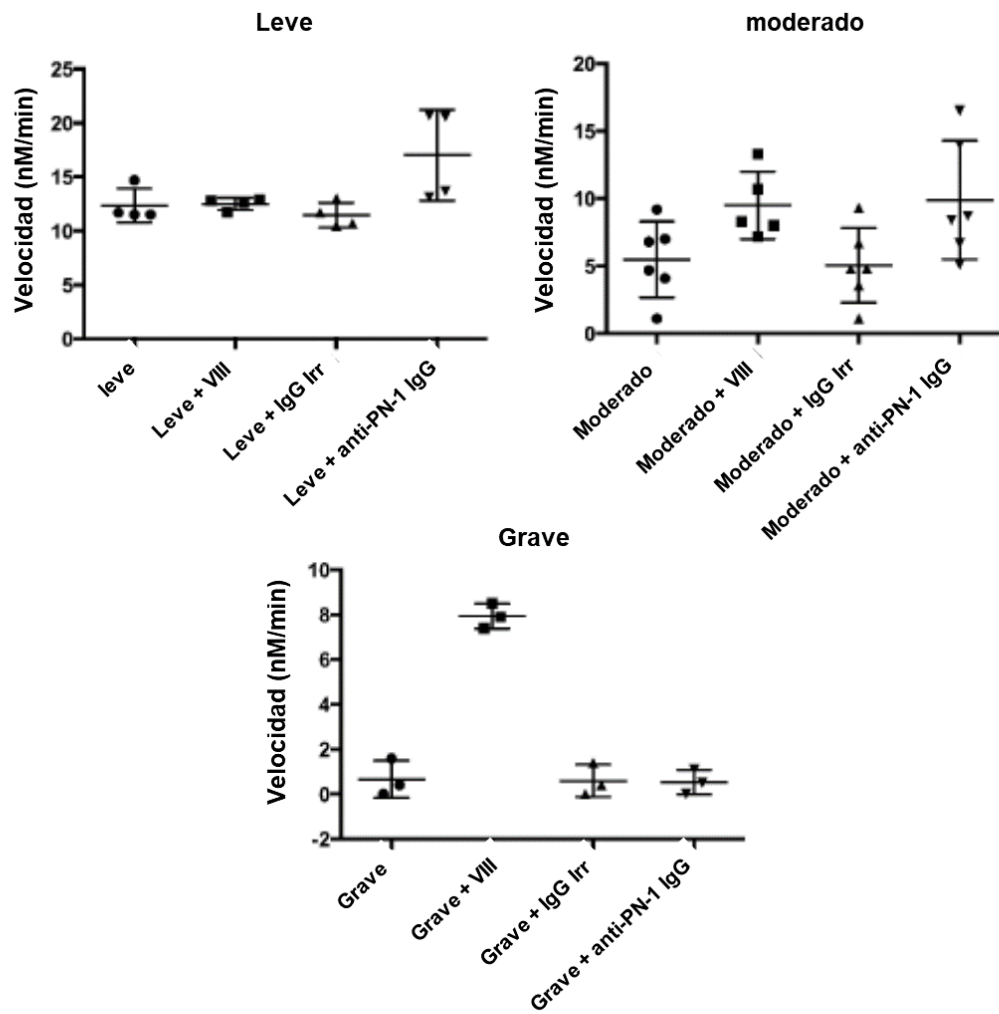


Figura 3