

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0616535-4 A2**

(22) Data de Depósito: 02/08/2006
(43) Data da Publicação: 21/06/2011
(RPI 2111)



★ B R P I 0 6 1 6 5 3 5 A 2 ★

(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/36 2006.01
A61P 7/04 2006.01

(54) Título: **USO DE FATOR DE TECIDO (TF) LIPIDADO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO, PRODUTO, USO DE UM PRODUTO, COMPLEXO (TF::FXa), USO DE UM COMPLEXO, COMPLEXO TF::NCIS, COMPLEXO TF::FXa:NCIS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE TF NÃO-LIPIDADO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO**

(57) Resumo: USO DE FATOR DE TECIDO (TF) LIPIDADO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO, PRODUTO, USO DE UM PRODUTO, COMPLEXO (TF::FXa), USO DE UM COMPLEXO, COMPLEXO TF::NCIS, COMPLEXO TF::FXa:NCIS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE TF NÃO-LIPIDADO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO. Agentes estimuladores do fator de coagulação X (FXa) ativado podem ser utilizados no tratamento de hemorragias em um indivíduo. São descritos compostos e combinações que são particularmente úteis para o tratamento tópico de hemorragias em indivíduos saudáveis ou nos pacientes com diatese hemorrágica.

(30) Prioridade Unionista: 03/08/2005 EP 05380179.1

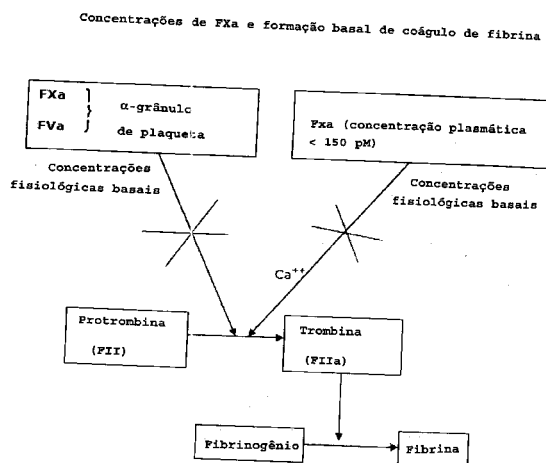
(73) Titular(es): Thrombotargets Europe, S.L.

(72) Inventor(es): Javier Pedreño Egea, Luis Caveda Catasús

(74) Procurador(es): David do Nascimento Advogados Associados.

(86) Pedido Internacional: PCT EP06007660 de 02/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/014771 de 08/02/2007



USO DE FATOR DE TECIDO (TF) LIPIDADO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO, PRODUTO, USO DE UM PRODUTO, COMPLEXO (TF::FXa), USO DE UM COMPLEXO, COMPLEXO TF::NCIS, COMPLEXO TF::FXa:NCIS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE TF
5 NÃO-LIPIDADO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao tratamento tópico de hemorragias em um indivíduo por meio da utilização de estimuladores de FXa. A presente invenção é baseada na
10 descoberta que o Fator de Tecido (TF) lipidizado exerce um novo papel regulador que estimula todas as atividades proteolíticas (atividade de protrombina amidolítica e hidrolítica) de ambas as formas de FXa, solúveis e ligadas ao complexo de protrombinase.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

1. Fisiologia da Coagulação

A hemostasia é o mecanismo por meio do qual os seres vivos respondem a uma hemorragia, e envolve a participação de dois processos que se tornam funcionais
20 imediatamente depois de uma lesão e permanecem ativos durante um longo período de tempo. O primeiro deles é conhecido como hemostasia primária e é caracterizado pela ocorrência de vasoconstrição no local da lesão vascular e formação de agregados de plaquetas. O segundo é conhecido como hemostasia
25 secundária, sendo a fase em que o coágulo de fibrina é formado devido à ação das enzimas proteolíticas em cascata de coagulação diferente.

Os agregados de plaquetas desempenham um papel chave na hemostasia nos capilares, sendo particularmente
30 relevantes em hemorragias mucocutâneas. Por outro lado, a formação de coágulo de fibrina é muito mais importante na hemostasia de grandes vasos, sendo mais relevante em hemorragias internas (gastrintestinais, cerebrais, etc.). As

seguintes fases podem ser distintas durante a formação do agregado de plaquetas: (i) aderência de plaquetas à superfície do sub-endotélio exposta pela lesão; (ii) liberação do conteúdo granular das plaquetas como uma
5 resposta à sua ativação; (iii) agregação plaquetária com o seqüestro e a concentração subseqüentes de mais plaquetas no local da lesão; e (iv) ligação do fibrinogênio, bem como de outras proteínas de coagulação, à superfície das plaquetas para produzir a trombina e formar o coágulo de fibrina que
10 irá permitir que as placas se tornem fundidas e consolidadas, estabilizando desse modo o coágulo hemostático. Além disso, é bem sabido que a contagem de plaquetas é essencial para a formação de coágulo de fibrina; contagens de plaquetas abaixo de 20.000 por μl são acompanhadas com episódios de
15 sangramento graves.

Diversos co-fatores e enzimas proteolíticas participam da segunda fase do processo de coagulação sangüínea, os denominados fatores de coagulação, e consiste em diversas fases que terminam com a formação de fibrina a
20 partir da hidrólise de fibrinogênio devido à ação da trombina. Além disso, a produção de trombina intensifica o agregado de plaquetas, aumentando a ativação e a agregação de mais plaquetas. A trombina é formada previamente pela hidrólise proteolítica de um apoenzima, a protrombina. Essa
25 proteólise é realizada pela protease de serina do FXa, a qual se liga à superfície das plaquetas ativadas e somente na presença de seu co-fator, o fator de coagulação ativado V (FVa) e aos íons de cálcio; essa protease de serina pode hidrolisar a protrombina. O FXa pode ocorrer por meio de duas
30 vias separadas, pela via intrínseca e pela via extrínseca.

A via intrínseca consiste em uma série de reações que envolvem principalmente o fator de coagulação VIII (FVIII), o fator de coagulação IX (FIX) e o fator de

coagulação XI (FXI), em que cada pró-enzima é hidrolisada, resultando em sua forma de protease ativa (FVIIIa, FIXa e FXIa). Em cada etapa, a enzima proteolítica recém formada irá catalisar a ativação da pró-enzima seguinte para resultar
 5 sucessivamente na forma ativa. A ativação de fatores de coagulação diferentes envolvidos na via intrínseca ocorre, portanto, na maneira de uma cascata, uma deficiência de qualquer uma das proteínas da via intrínseca obstrui a ativação da etapa seguinte, impedindo a formação de coágulo e
 10 aumentando a tendência hemorrágica. As deficiências de fatores de coagulação diferentes, por exemplo, FVIII, FIX ou FXI, causam síndromes hemorrágicas graves, tais como hemofilia A, B e C, respectivamente.

Na via de coagulação sangüínea extrínseca, o TF
 15 exposto às células adventícias no local da lesão, se liga ao fator de coagulação circulante VII/fator de coagulação ativado (FVII/FVIIa) para formar o complexo de TF::FVIIa e, na presença de cálcio, age como um substrato para a ativação de FX. A via extrínseca é considerado atualmente a via mais
 20 relevante na coagulação sangüínea e é aceito que, na eventualidade de uma hemorragia produzida por uma lesão vascular, a coagulação seja provocada devido à ativação da via extrínseca que envolve a interação do TF com seu ligando, FVII/FVIIa.

25 Um outro papel atribuído ao complexo de TF::FVIIa na coagulação é de agir como um substrato de modo que a ativação de FX ocorra devido ao FVIIa. Em consequência disto, aumentam os níveis basais de FXa (< 150 pM), os quais são inicialmente insuficientes para gerar a formação de coágulo
 30 de fibrina. Isto aumenta em concentrações basais de FXa na presença de seu co-fator, Fva, e de uma superfície pró-coagulante celular, e poderia produzir a trombina requerida para a formação de coágulo de fibrina. Atualmente é aceito

que, uma vez que as plaquetas são ativadas, elas desempenham um papel chave na coagulação sangüínea. Elas formam a superfície pró-coagulante rica em fosfolipídios aniônicos e, por outro lado, expõem os fatores FVa e FXa armazenados dentro das mesmas. Tudo isto permite a união correta dos diferentes agentes envolvidos na coagulação na superfície de suas membranas plasmáticas que formam o complexo de protrombinase bem conhecido (que inclui FXa, FVa, protrombina e uma superfície de fosfolipídio de plaquetas pró-coagulantes aniônica).

A teoria de ativação da via extrínseca pode explicar como a coagulação começa através do papel que foi atribuído ao complexo de TF::FVIIa. Um exemplo que ilustra a relevância biológica do complexo de TF::FVIIa no processo de coagulação sangüínea é a Síndrome de Coagulação Intravascular Disseminada (DIC). Esta condição clínica é associada com a liberação intravascular do TF e pode ocorrer no curso de condições clínicas graves (choque, septicemia, parada cardíaca, traumatismo de grande porte, doença hepática, cirurgia de grande porte, queimaduras, etc.).

Evidentemente, em um contexto em que o FVIIa não está presente, tal como ocorre em uma deficiência congênita desse fator, a coagulação hipoteticamente nunca irá ocorrer, uma vez que o FX não será ativado em níveis suficientes e, conseqüentemente, as manifestações hemorrágicas podem ser fatais. Modelos murinos confirmam essa teoria e a deficiência de FVII é incompatível com a vida, sendo acompanhada por hemorragias fatais graves. No entanto, as deficiências de FVII congênitas descritas em seres humanos até o presente nem sempre são acompanhadas por hemorragias. Casos de deficiência de FVII completa sem nenhum sintoma clínico e que ocorrem em indivíduos saudáveis sem nenhuma complicação hemorrágica foram relatados. Tudo isto sugere que outros mecanismos de

coagulação provocados independentemente do FVII devem existir em seres humanos.

O TF é uma glicoproteína integral da membrana que pertence à superfamília dos receptores de citocina da classe II que se ligam especificamente a FVII/FVIIa e desempenham um papel relevante no via extrínseco de coagulação sangüínea. Os papéis fisiológicos atribuídos ao TF são bem conhecidos; por um lado, é um receptor específico para FVIIa e, uma vez que o complexo de TF::FVIIa tenha sido formado, ele age como um substrato de modo que a ativação de FX ocorra. De fato, após uma lesão vascular, o TF, que é normalmente seqüestrado na superfície das células adventícias que circundam externamente os vasos sangüíneos, entra em contato e interage com o seu ligando, FVII, presente no sangue, para formar o complexo de TF::FVII. Uma vez que esse complexo é formado, a auto-ativação de FVII ocorre, resultando em sua forma ativa, FVIIa. Há atualmente informações extensivas sobre a estrutura do complexo de TF::FVII. Os locais de ligação de FVII principais que participam da interação com TF ficam situados no primeiro domínio similar àquele do fator de crescimento epidermal (EGF) e no domínio da protease. Por outro lado, também foi relatado que outros locais de ligação menos relevantes participam (domínio rico em 4-carbóxi glutamato (domínio de Gla) e o segundo domínio de EGF). Os locais de ligação presentes no TF ficam situados nos dois domínios de fibronectina do tipo III e na região intermediária entre ambos os domínios.

Estudos recentes permitiram a identificação do fato que resíduos da Lisina 165 e da Lisina 166 do TF interagem com o domínio de Gla de FX, nas formas ativada e não ativada. No entanto, em contraste com o que ocorre com as informações que se referem ao complexo de TF::FVIIa, pouco se sabe sobre a interação do TF com FX e FXa. Primeiramente, os dados

sugerem que os resíduos de Lys (165 e 166) agem como um substrato para a ativação de FX. Por outro lado, foi descrito recentemente que o TF pode agir como co-fator de FXa para a ativação de FVII. Isto é, a ligação de FVII ao TF estimula a auto-ativação de FVIIa e a ativação de FX. Em seguida, o limite de FXa para TF estimula a ativação de FVII que, por sua vez, aumenta a ativação de FX e conseqüentemente a hidrólise da protrombina e a formação de coágulo de fibrina.

Os autores da presente invenção descobriram que o papel postulado do TF como o co-fator para FXa é muito mais relevante, tornando-se essencial para a hemostasia. A despeito do papel aceito do TF como o receptor da membrana para FVII, os autores da presente invenção mostraram que o TF também é um estimulador potente de FXa. O TF age como estimulador de FXa produzindo uma intensificação significativa em sua atividade proteolítica. Os "estimuladores de FXa", tal como utilizado nesta descrição, fazem referência a todas as formas de FXa, tais como o FXa solúvel e o FXa ligado ao complexo de protrombinase.

É bem sabido que o FXa em concentrações picomolares é incapaz de produzir qualquer efeito na coagulação, até mesmo na presença de seu co-fator bem conhecido, o FVa (vide a Tabela 9). Portanto, sob essas condições, o complexo de protrombinase não é ativo. Surpreendentemente, na presença de TF (isto é, lesões ou administração exógena), o FXa em concentrações picomolares (isto é, concentrações basais fisiológicas ou administradas exogenamente) causa a hidrólise de protrombina, conduzindo à formação de coágulo de fibrina, até mesmo na ausência de FVII/FVIIa (Tabela 7).

No presente pedido de patente, os presentes autores descrevem que a interação de TF::FXa é um novo mecanismo de coagulação acionado independentemente dos complexos de TF::FVIIa e da via de coagulação extrínseca.

Finalmente, é bem sabido que há determinadas doenças plaquetárias que ocorrem com distúrbios na agregação plaquetária e com uma tendência maior de episódios hemorrágicos, dentre os quais se sobressaem o mal de Glanzmann e a síndrome de Bernard-Soulier, nas quais os defeitos congênitos que afetam o receptor de fibrinogênio ou o receptor de Gplb, respectivamente, foram descritos. Por outro lado, episódios hemorrágicos graves estão presentes em distúrbios trombocitopênicos congênitos e adquiridos quando a contagem de plaquetas diminui abaixo de 20.000 por μ l.

No presente pedido de patente, os autores da presente invenção demonstraram que o TF lipidizado também é eficaz no tratamento de hemorragias presentes em doenças plaquetárias congênitas, adquiridas e em distúrbios trombocitopênicos graves (abaixo de 9.000 por μ l).

2. Patologia da Coagulação

As deficiências congênitas de cada fator de coagulação podem ser associadas com a ocorrência de hemorragias e geralmente envolvem uma única proteína; desse modo, por exemplo, a hemofilia A é uma doença hemorrágica hereditária que afeta o FVIII. As doenças de coagulação adquiridas ocorrem em indivíduos sem nenhum histórico prévio de sangramento e podem ter múltiplas origens; para fins de ilustração, a presença de inibidores específicos para os fatores de coagulação pode ocorrer nos indivíduos que foram submetidos a muitas transfusões. Embora as deficiências do fator de coagulação adquiridas sejam uma entidade etiológica desconhecida que também causa problemas hemostáticos graves, elas também constituem um dos problemas mais importantes em transfusões múltiplas às quais os pacientes com coagulopatias congênitas são submetidos. Outra fonte importante de distúrbios de coagulação adquiridos são as terapias com anticoagulantes, tais como as drogas heparina e varfarina.

Uma porcentagem significativa (5-10%) dos pacientes tratados com as drogas anticoagulantes apresenta episódios de sangramento, os quais são em sua maioria difíceis de controlar.

5 Conforme mencionado previamente, os distúrbios plaquetários congênitos e adquiridos também podem ser associados com as hemorragias. As diminuições na contagem de plaquetas (abaixo de 20.000 por μ l) podem causar alterações do coágulo de fibrina normalmente acompanhadas por episódios
10 de sangramento graves.

O arsenal terapêutico atualmente disponível para uma hemorragia leve/moderada ou grave/fatal (por cirurgia ou trauma externo) é muito limitado. Há agentes hemostáticos diferentes que podem acelerar a coagulação sangüínea e
15 impedir as hemorragias, por exemplo, (1) os produtos derivados de sangue humano, tais como os concentrados do fator de coagulação e os agentes hemostáticos locais, tais como o colágeno fibrilar, a cola de fibrina e concentrados do complexo de protrombina; (2) as proteínas recombinantes
20 humanas; (3) as drogas antifibrinolíticas, tais como o ácido aminocapróico, e o ácido tranexâmico; e (4) os agentes hemostáticos locais inorgânicos, tais como as superfícies de sílica e de caulim.

As seguintes limitações críticas foram relatadas:

- 25 (1) Administração intravenosa
 (2) Requisito de dispositivo especial para administração
 (3) Foco terapêutico estreito
 (4) Tratamento impróprio ou incômodo administrado em episódios de sangramento específicos
30 (5) Ausência de efeito agudo
 (6) Instabilidade do coágulo de fibrina
 (7) Efeitos colaterais muito perigosos
 (8) Tratamento caro

Produtos derivados de sangue humano (fator de coagulação e concentrados de plaquetas)

Trata-se de um tratamento muito caro e de pouca disponibilidade que deve sempre ser administrado intravenosamente. Eles têm um foco terapêutico muito estreito, e só são úteis para o tratamento da sua deficiência específica. Eles são impróprios para o tratamento tópico de qualquer tipo de episódio de sangramento. Eles não são úteis para o tratamento de uma hemorragia aguda porque isto requer longos protocolos de administração para que seja eficaz e é, sobretudo, um tratamento muito perigoso: 20% dos pacientes hemofílicos desenvolveram a hepatite, 5% desenvolveram o HIV e até 15% apresentaram anticorpos plasmáticos contra FVIII ou FIX (hemofilia adquirida), o que requer tratamentos substitutivos especiais e muito caros (imunossuppressores, doses elevadas dos fatores de coagulação, plasmaferese, etc.). Por essas razões, as organizações de saúde pública (WHO, FDA, EMEA, etc.) estão muito interessadas no desenvolvimento de novos agentes hemostáticos melhores do que os concentrados do fator de coagulação.

Agentes hemostáticos locais

Trata-se de um tratamento caro impróprio para ser administrado em alguns episódios de sangramento (isto é, epistaxe), incômodos para o tratamento dental, forma um coágulo de fibrina instável e, assim como os concentrados do fator de coagulação, eles têm os mesmos efeitos colaterais perigosos potenciais. Eles não devem ser utilizados nos pacientes que nunca receberam produtos derivados de sangue humano ou naqueles que estão recebendo o tratamento com FVIII recombinante ou FIX por causa dos riscos potenciais da transmissão viral humana.

Proteínas Recombinantes Humanas

Trata-se do tratamento mais caro (custo médio de €

6.000) somente disponível para os países desenvolvidos. Assim como os concentrados do fator de coagulação, elas devem ser sempre administradas intravenosamente, têm um foco terapêutico muito estreito porque só são úteis para o tratamento da sua deficiência específica, são impróprias para o tratamento tópico de hemorragias, não são úteis para o tratamento de uma hemorragia aguda porque também requerem longos protocolos de administração para que sejam eficazes e, embora nenhuma transmissão viral humana tenha sido relatada, a mesma porcentagem de hemofilia adquirida foi descrita (até 15% de anticorpos presentes anti-FVIII ou FIX). Assim como os concentrados do fator de coagulação, as autoridades públicas limitam bastante o seu uso.

Drogas Antifibrinolíticas

Elas têm um foco terapêutico estreito, sendo esta sua restrição mais relevante. Essas drogas requerem a formação de coágulo de fibrina precedente para serem eficazes. Portanto, elas só são úteis em indivíduos saudáveis, no entanto, quando o coágulo de fibrina é formado impropriamente (isto é, coagulopatias congênitas, tais como a hemofilia, a deficiência de FVII) a sua eficácia terapêutica diminui drasticamente. Além disso, elas não são úteis para o tratamento de uma hemorragia aguda porque também requerem longos protocolos de administração para que sejam eficazes.

Agentes hemostáticos locais inorgânicos

A restrição mais importante para a utilização desses agentes hemostáticos é que eles são impróprios para serem administrados em muitos tipos de hemorragias, tais como a epistaxe dental e cirúrgica. Além disso, uma reação exotérmica dolorosa tem sido relatada, reduzindo significativamente o seu uso somente para o sangramento mucocutâneo em situações críticas (guerras).

Resumidamente, surpreendentemente não há atualmente

nenhuma droga disponível que seja útil para o tratamento tópico de um episódio simples de epistaxe ou de um sangramento gengival e dental após a escovação dos dentes ou simplesmente devido a um ferimento rotineiro causado ao fazer a barba, devido à veia puncionada em um exame de sangue ou devido ao ferimento por uma queda accidental na rua. O problema é adicionalmente agravado no caso de pacientes com diátese hemorrágica, por exemplo, com coagulopatias congênitas do tipo da hemofilia ou do mal de von Willebrand ou pacientes com distúrbios plaquetários congênitos, do tipo do mal de Glanzmann ou da síndrome de Bernard-Soulier, ou coagulopatias adquiridas. Esses pacientes têm problemas sérios com a rotina diária e, em uma extração dental simples ou em qualquer trauma menor que cause um ferimento que sangra, não dispõem de nenhum tratamento médico disponível para melhorar a sua qualidade de vida. O problema torna-se obviamente maior quando esses pacientes sofrem um trauma externo ou um acidente com sangramento grave, uma vez que a sua vida está em sério risco. Em todas essas situações, a única ferramenta farmacológica disponível é a administração de plasma humano que contém os fatores deficientes ou o fator recombinante humano específico para cada fator de coagulação. Todas essas terapias implicam a utilização da via parenteral e, não se destinam, portanto, a serem utilizadas com grande frequência, tal como seria o caso, por exemplo, em algum sangramento leve ou moderado do dia-a-dia. Finalmente, é extensamente aceito que os novos agentes hemostáticos locais sem as limitações descritas previamente irão representar uma melhoria significativa em relação ao tratamento atual, que irá reduzir o custo e a prevalência elevada de efeitos colaterais.

3. Antecedentes da Invenção

Até o presente, é aceito que o TF seja o elemento

principal responsável por provocar a coagulação sangüínea. Para que a coagulação seja iniciada, é absolutamente necessária a ativação do FX para FXa para começar a hidrólise de protrombina. A fonte deste FXa foi atribuída principalmente à interação de FVIIa com seu receptor, TF. Embora esteja descrito que o FXa está presente em grânulos de plaquetas e que pode ser exposto na superfície quando ocorre a sua ativação, as concentrações fisiológicas de FXa (< 150 pM) presentes no sangue são insuficientes para iniciar a formação de trombina, até mesmo na presença de seu co-fator, Fva, e de uma superfície pró-coagulante de plaquetas (Figura 1). Portanto, atualmente é aceito que a coagulação só pode começar quando as concentrações basais de FXa aumentam significativamente. A fonte do aumento das concentrações basais de FXa foi atribuída sempre a ambos o complexo de TF::FVIIa e as atividades proteolíticas de FIXa (Figura 2).

As proteínas recombinantes do TF lipidizado podem ser aceleradas somente em condições *in vitro*, a coagulação em amostras de sangue saudáveis e hemofílicas, em que essa ação é atribuída ao papel clássico atribuído ao TF como o receptor de FVIIa. No entanto, nas mesmas condições experimentais, o TF não-lipidizado demonstrou uma total ausência de efeito, o que indica que a lipidização é necessária para obter a funcionalidade do TF (seção 6.1 dos resultados).

A utilização do TF lipidizado como um agente hemostático tópico nunca foi descrita como um tratamento único para sangramentos leves, graves e letais (hemorragias arteriais e venosas traumáticas ou cirúrgicas).

A patente européia EP 266993 descreve a utilização de TF não-lipidizado como um agente hemostático para o tratamento parenteral de síndromes hemorrágicas. No entanto, a mesma patente descreve as diferenças importantes na atividade entre o TF não-lipidizado reivindicado pela patente

EP 266993 e o TF lipidizado, objeto do presente pedido de patente.

De fato, é bem sabido que o TF lipidizado é ativo em condições *in vitro* e a sua administração parenteral inicia imediatamente a coagulação intravascular disseminada com conseqüências fatais. Por outro lado, o TF não-lipidizado não é ativo em condições *in vitro*, no entanto, ele foi reivindicado (patente EP 266993) para o tratamento de coagulopatias pela administração parenteral.

Até o presente, não há dados sobre o efeito de ambos, o TF lipidizado e o TF não-lipidizado, para o tratamento único tópico de episódios de sangramento. No presente pedido de patente, que utiliza o modelo de transecção da cauda de rato, os autores da presente invenção demonstraram que o TF não-lipidizado era incapaz de parar um sangramento. Por outro lado, os autores da presente invenção mostraram, pela primeira vez, que o TF lipidizado é um agente hemostático útil para o tratamento tópico de qualquer tipo de hemorragias, inclusive em condições patológicas (animais tratados com heparina e varfarina) e em condições saudáveis (ratos do controle sem alteração de coagulação). De maneira geral, indica que o TF lipidizado e o TF não-lipidizado são claramente compostos diferentes. Conseqüentemente, a utilização do TF lipidizado como um agente para o tratamento único tópico das hemorragias não é óbvio para um elemento versado na técnica.

Por outro lado, a patente EP 266993 foi praticada de acordo com o estado da técnica que postula que o FVII de protease de serina é ativado somente quando ligado ao seu receptor, TF. Portanto, de acordo com a patente EP 266993 e o estado da técnica, quando o FVII/FVIIa não está presente, o TF não deve ser ativo. Não era óbvio ao elemento versado na técnica considerar que o TF (lipidizado ou não) poderia ser

eficaz no tratamento de pacientes com deficiência de FVII. Os autores da presente invenção descobriram que até mesmo na ausência do FVIIa o TF age como um co-fator para FXa. Essa descoberta é fundamental para compreender que o TF não-lipidizado também pode agir como agente hemostático parenteral para a hemorragia em pacientes com deficiência de FVII.

O pedido de patente internacional WO 94/02172 mostra que a inibição temporária de um ou mais anticoagulantes naturais pela administração sistêmica de um inibidor de um anticoagulante natural (um anticorpo) pode inibir o sangramento microvascular. Opcionalmente, o inibidor pode ser administrado em combinação com uma administração tópica de trombina ou TF lipidizado. É importante ressaltar que a utilização de ambos os compostos foi sempre feita como tratamentos adjuvantes opcionais e nunca como um tratamento único. Além disso, o pedido de patente WO 94/02172 reivindica a utilização desses tratamentos sinérgicos somente para o sangramento capilar (sangramento microvascular, isto é, queimaduras, superfícies viscerais inflamadas, sangramento de superfícies do fígado...) e nunca para as hemorragias graves ou letais causadas por cirurgia ou por trauma externo, as quais envolvem ferimento arterial e venoso. No entanto, os autores do pedido de patente WO 94/02172 admitem que, embora seja observado um efeito sinérgico por meio da administração tópica de trombina em combinação com o tratamento sistêmico, nenhum de tal efeito sinérgico foi observado ao administrar topicamente TF (pedido de patente WO 94/02172, Figura 3 e página 22, linhas 14-15). Além disso, a dose reivindicada no pedido de patente WO 94/02172 tem faixas muito elevadas, de 0,1 a 10 mg.

Contrariamente ao pedido de patente WO 94/02172, o presente pedido de patente está reivindicando um tratamento

único para a hemorragia arterial ou venosa leve/moderada a grave/fatal com TF lipidizado sozinho, mostrando exemplos nos quais tal tratamento é eficaz em uma dose de proteína ativa de 1,2 µg/ml para hemorragias traumáticas (vide o modelo
5 grave nas Tabelas 24 e 25). Tal tratamento surpreendente e extraordinariamente eficaz não foi descrito até o presente, porque não era óbvio para nenhum elemento versado na técnica que o TF lipidizado age como um estimulador da atividade proteolítica de FXa. Os autores da presente invenção
10 descobriram que, na ausência de FVIIa, o TF age como um co-fator para FXa, até mesmo na ausência de seu co-fator bem conhecido, FVa. Essa descoberta é fundamental para se compreender que o TF lipidizado sozinho pode agir como um agente hemostático para a hemorragia grave em condições
15 saudáveis e patológicas.

A Patente U.S. Nº. 4.721.618 mostra que a mistura de fosfolipídios sinérgica administrada intravenosamente (PCPS) e FXa em concentrações elevadas (0,2 a 0,5 U/Kg) pode desviar a Deficiência do Fator VIII:C em um mamífero
20 hemofílico, de modo que o processo de coagulação sanguínea em cascata possa continuar. As concentrações elevadas de FXa sugeridas são ativas sem a necessidade das vesículas do lipídio de PCPS (que podem intensificar esta atividade). Além disso, o pedido de patente WO 02/086118 mostra que as
25 composições que incluem uma mistura de pelo menos um fosfolipídio específico e pelo menos um fator de coagulação sanguínea ativado pela protease serina são úteis para o tratamento de distúrbios de coagulação sanguínea, diminuindo a necessidade dos fatores de coagulação sanguínea
30 administrados.

Além disso, o ácido elágico e outros aceleradores tais como zeólito, sílica e materiais de óxidos inorgânicos foram utilizados para intensificar a coagulação sanguínea e

são reivindicados no pedido de patente WO 02/30479.

De acordo com o pedido de patente WO 02/086118, um fator de coagulação é definido como um fator de coagulação sangüínea ativado pela protease de serina (página 5, linhas 5 13-15). Portanto, o TF pode não ser considerado como um fator de coagulação sangüínea, uma vez que o TF não é uma protease de serina, mas um receptor específico da superfície celular para o fator VIIa.

No presente pedido de patente, os autores da presente invenção demonstraram que os fosfolipídios (fosfatidilserina e fosfatidilcolina em porcentagens e em molaridades diferentes) não aumentam o efeito pró-coagulante mediado pelo TF lipidizado (Tabela 21), indicando que o efeito sinérgico reivindicado no Pedido de Patente U.S. N°. 4.721.618 e no pedido de patente WO 02/086118 é exclusivo para os fatores de coagulação sangüínea ativados pela protease de serina, mas não para os receptores da membrana tais como o TF. Surpreendentemente, quando o TF lipidizado foi combinado simultaneamente com as superfícies inorgânicas negativamente carregadas (NCIS), um efeito sinérgico significativo foi observado em condições experimentais *in vitro* e *in vivo*. As NCIS utilizadas nesta descrição são constituídas por uma mistura de lipídios e por um acelerador de coagulação sangüínea, o ácido elágico. Os lipídios têm carga negativa líquida, o que significa que a mistura lipídica pode incluir lipídios neutros ou dipolares, mas deve conter uma determinada quantidade de lipídios negativamente carregados que confira um caráter aniônico à mistura. Como um exemplo ilustrativo e não limitador, os lipídios negativamente carregados podem ser esfingolipídios (tais como ceramida-1-fosfatos, fosfatidiletanolamina glicosilada, sulfatídeos hidroxilados ou não-hidroxilados, gangliosídeos) e os lipídios com base em glicerol (tais como a

fosfatidilserina, o fosfatidilinositol, os fosfatos de fosfatidilinositol, os ácidos fosfatídicos, os fosfatidilgliceróis, as cardiolipinas). Há NCIS comercialmente disponíveis, tais como da marca registrada Dade® Actin® (Dade Behring), por exemplo, Dade® Actin® FS.

Resumidamente, o presente pedido de patente descreve um novo agente hemostático local caracterizado pelas seguintes vantagens com respeito às drogas comercialmente disponíveis:

- 10 (1) Administração tópica fácil
- (2) Nenhum requisito de dispositivo especial para a sua administração tópica
- (3) Foco terapêutico amplo (déficits de FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII e FXIII)
- 15 (4) Tratamento apropriado a ser administrado em qualquer tipo de episódio de sangramento (epistaxe, sangramento dental, hemorragias mucocutâneas, traumáticas e cirúrgicas)
- (5) Exerce um efeito agudo potente
- (6) Formação de coágulo de fibrina fisiológica (estabilidade
- 20 extrema do coágulo)
- (7) Sem efeitos colaterais
- (8) Tratamento de baixo custo

O objetivo principal da WHO, FDA, EMEA e outras autoridades de saúde pública é a redução dos efeitos colaterais perigosos associados ao consumo de produtos derivados de sangue humano. A presente invenção foi elaborada para cobrir essas necessidades ainda não satisfeitas.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

O papel atribuído ao complexo de TF::FVIIa na coagulação é extensamente conhecido. O complexo de TF::FVIIa age como um substrato de modo que a ativação de FX ocorra. Estudos recentes permitiram identificar que os resíduos da Lisina 165 e da Lisina 166 do TF interagem com o domínio de

Gla de FX, nas formas ativada e não-ativada. Contrariamente ao complexo de TF::FVIIa, pouco é conhecido sobre a interação do TF com FX e FXa. Somente foi descrito que o TF pode agir como um estimulador de FXa para a ativação de FVII. Isto é, a
5 ligação de FXa ao TF deve estimular a ativação de FVII que, por sua vez, aumenta a ativação de FX.

Os autores da presente invenção descobriram que o papel do TF como um estimulador de FXa é muito mais relevante, tornando-se essencial para a hemostasia (Figura
10 3). É bem sabido que FXa em concentrações picomolares é incapaz de produzir qualquer efeito na coagulação e na agregação plaquetária. Apesar do papel aceito do TF como o receptor da membrana para FVII, os autores da presente invenção mostraram que o TF também age como um estimulador de
15 FXa para intensificar a sua atividade proteolítica principal, a hidrólise de protrombina, conduzindo à formação de coágulo de fibrina.

Surpreendentemente, na presença de TF (isto é, lesões ou administração exógena), o Fxa, em concentrações
20 picomolares, causa a hidrólise de protrombina, conduzindo à formação de coágulo de fibrina, até mesmo na ausência de seu ligando, FVII/FVIIa. Os resultados gerais indicam que o TF age como um estimulador de FXa e a ligação específica de FXa ao TF é a primeira etapa que aciona a coagulação sanguínea.

25 Os dados dos autores da presente invenção sugerem que a rapidez com que a coagulação ocorre é dependente da interação entre o TF e em todas as formas previamente descritas de FXa.

Na presença de Fxa, em concentrações fisiológicas
30 (< 150 pM) incapazes de iniciar a coagulação por si, o TF lipidizado pode iniciar rapidamente a formação de trombina como resultado de sua ação como um co-fator.

Esses efeitos hemostáticos são surpreendentemente

independentes da presença de FVII e FVIIa, portanto, o efeito pró-coagulante mediado pelo complexo de TF::FXa endógeno (FXa < 150 pM) é particularmente útil e relevante em amostras com deficiência do fator VII. Não obstante, efeitos hemostáticos
5 potentes também foram observados em amostras de pacientes com defeitos congênitos de outros fatores de coagulação, tais como: FVIII (hemofilia A), FIX (hemofilia B), FXI (hemofilia C), FV, FX, FXII e FXIII, bem como em indivíduos com distúrbios plaquetários congênitos, tais como o mal de
10 Glanzmann e a síndrome de Bernard Soulier e distúrbios trombocitopênicos.

Portanto, a presente invenção é baseada no uso do TF lipidizado sozinho ou combinado com FXa e/ou com NCIS como um novo estimulador de FXa útil para o tratamento tópico das
15 hemorragias presentes em indivíduos saudáveis e em pacientes com diatese hemorrágica.

Os resultados obtidos pelos autores da presente invenção abrem as portas à utilização de TF não-lipidizado ou de um fragmento funcional do mesmo para o tratamento da
20 hemorragia em um indivíduo com deficiência de FVII. O dito tratamento pode ser realizado por meio da utilização de formas de administração farmacêutica apropriadas para a administração parenteral de TF não-lipidizado.

Portanto, em um aspecto, a invenção refere-se à
25 utilização de TF lipidizado ou de um fragmento funcional do mesmo, na preparação de uma droga para o tratamento tópico da hemorragia em um indivíduo.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um produto que compreende o TF lipidizado sozinho ou combinado
30 com FXa e/ou com NCIS. A utilização do dito produto como uma droga ou na preparação de uma droga para o tratamento da hemorragia em um indivíduo constitui um aspecto adicional da presente invenção.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um complexo formado pelo TF lipidizado e um composto selecionado de FXa, NCIS e às combinações de ambos. A utilização do dito complexo como uma droga ou na elaboração de uma droga para o
5 tratamento da hemorragia em um indivíduo constitui um aspecto adicional da presente invenção.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende o TF lipidizado, em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável. Em uma
10 realização particular, a dita composição farmacêutica compreende adicionalmente FXa e/ou NCIS.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um produto que compreende a dita composição farmacêutica e um suporte. Em uma realização particular, a dita composição
15 farmacêutica compreende adicionalmente FXa e/ou NCIS.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se à utilização de TF não-lipidizado ou de um fragmento funcional do mesmo, para a preparação de uma droga para o tratamento da hemorragia em um indivíduo com deficiência de FVII. Em uma
20 dita realização particular, a droga é formulada em uma forma de administração farmacêutica apropriada para a administração parenteral de TF não-lipidizado.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é uma representação esquemática que
25 mostra concentrações basais de FXa e a formação de coágulo de fibrina.

A Figura 2 é uma representação esquemática que mostra as vias intrínseca e extrínseca clássicas da coagulação sangüínea.

30 A Figura 3 é uma representação esquemática que mostra o novo efeito regulador do TF lipidizado como estimulador de FXa de acordo com a presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As descobertas da presente invenção descritas mostram pela primeira vez que o TF lipidizado, na ausência de seu ligando, FVII/FVIIa, age como um estimulador de FXa, o que faz com que essa enzima inicie a hidrólise de protrombina e, conseqüentemente, faz com que a coagulação ocorra. Esse novo mecanismo é particularmente relevante em níveis de concentração de FXa muito baixos (abaixo daqueles considerados fisiológicos de 150 pM). É bem sabido que há determinadas doenças plaquetárias que ocorrem com distúrbios na agregação plaquetária e com uma tendência maior de episódios hemorrágicos. Conseqüentemente, o TF lipidizado administrado exogenamente é não somente útil em coagulopatias congênitas, mas permite adicionalmente a hemostasia em distúrbios plaquetários congênitos e adquiridos, tais como o mal de Glanzmann, a Síndrome de Bernard-Soulier e os distúrbios trombocitopênicos.

A rapidez com a qual a coagulação ocorre não é, portanto, dependente da formação do complexo de TF::FVIIa e da ativação subsequente de FX, como se pensava até o presente, mas depende da interação do TF e do FXa em concentrações basais fisiológicas (< 150 pM). A consequência biológica mais relevante da formação dessa interação é a geração rápida do início da coagulação e o fato de que isto requer somente a presença de FXa nas concentrações fisiológicas presentes no sangue e a interação com o seu estimulador, TF. O processo é amplificado imediatamente em consequência da trombina formada inicialmente pelo complexo e em consequência da produção maior de FXa, devido ao complexo de TF::FVIIa ou devido à própria trombina.

Portanto, as descobertas dos autores da presente invenção mostram claramente que, na ausência de FVIIa e na presença de Fxa, em concentrações fisiológicas (< 150 pM) incapazes de iniciar a coagulação por si, o TF lipidizado

inicia rapidamente a formação de trombina em consequência de sua nova ação como um estimulador de FXa, promovendo o início da hidrólise de protrombina. Por outro lado, as descobertas dos autores da presente invenção mostram que o TF lipidizado e o FXa em baixas concentrações (que não são eficazes para exercer efeitos anti-hemorrágicos por si) quando administrados conjuntamente, podem causar rapidamente o início da formação de coágulo de fibrina. Os efeitos observados com as combinações de TF::FXa, especificamente com uma concentração de FXa < 150 pM, são muito melhores do que aqueles quando o TF lipidizado detectado é administrado sozinho. A combinação de FXa e de TF lipidizado com NCIS pode intensificar o efeito hemostático ainda mais. Os resultados obtidos sustentam a idéia que, na presença das concentrações basais de FXa presentes no plasma (< 150 pM), incapazes de gerar a resposta pró-coagulante inicial por si, essa resposta ocorre quando o TF age como um estimulador de FXa.

Conseqüentemente, o TF lipidizado, sozinho ou combinado com o FXa e/ou a NCIS, pode ser utilizado como novos agentes hemostáticos tópicos úteis para o tratamento da hemorragia presente em indivíduos saudáveis e nos pacientes que sofrem de diátese hemorrágica.

O TF não-lipidizado ou um fragmento funcional do mesmo pode ser utilizado do mesmo modo como um novo agente hemostático útil para o tratamento, de preferência por meio de administração parenteral, da hemorragia presente em pacientes com deficiência de FVII.

I. Utilização de TF Lipidizado no Tratamento Tópico das Hemorragias

Os autores da presente invenção verificaram surpreendentemente que o TF lipidizado aumenta a atividade proteolítica de FXa e, conseqüentemente, a produção de trombina [vide a seção 1 dos resultados do exemplo incluído

nesta descrição]. Os autores da presente invenção também observaram que o TF lipidizado coagula o plasma e o sangue em indivíduos saudáveis e em pacientes com deficiência do fator de coagulação, incluindo aqueles que têm deficiências de FV, 5 FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII e FXIII, assim como em pacientes anticoagulados (por meio de tratamentos com anticoagulante com drogas tais como a heparina, heparinas de baixo peso molecular ou derivados cumarínicos, em que esses exemplos não são limitadores), tanto *in vitro* [vide, as 10 seções 1 a 5 dos resultados do exemplo incluído nesta descrição] quanto *in vivo* [vide as seções 6 e 7 dos resultados do exemplo incluído nesta descrição]. Os autores da presente invenção verificaram adicionalmente que o TF lipidizado coagula o sangue nos pacientes que sofrem de 15 distúrbios plaquetários [vide a seção 5 dos resultados do exemplo incluído nesta descrição]. Esses resultados mostram claramente que o TF lipidizado é um agente anti-hemorrágico útil para o tratamento tópico das hemorragias em um indivíduo.

20 Levando em consideração o estado da técnica, não é óbvio pensar no TF como um tratamento único tópico pró-coagulante nos indivíduos saudáveis ou nos pacientes hemofílicos (com deficiência de FVIII, FIX e FXI).

Isso era absolutamente improvável em pacientes com 25 deficiência de FVII porque o complexo de TF-FVII não podia ser formado; em pacientes com deficiência de FV ou FX porque o complexo de protrombinase não podia ser unido; e em pacientes heparinizados porque a trombina e o FXa são obstruídos pela antitrombina III, e em pacientes tratados com 30 varfarina porque a síntese de todos os fatores de coagulação dependentes da vitamina K (FVII, FIX e FX) são eliminados.

Portanto, em um aspecto, o objetivo da invenção é a utilização do TF lipidizado ou de um fragmento funcional

lipidizado do mesmo na preparação de uma droga para o tratamento tópico das hemorragias em um indivíduo.

O TF é uma glicoproteína integral da membrana que é distribuída extensamente no reino animal. A proteína do TF tem uma estrutura de domínio, isto é, é uma proteína com regiões funcionais independentes. Cada um dos domínios da apoproteína do TF humano tem características estruturais e funcionais exclusivas: (1) um peptídeo de sinal ou uma região com uma seqüência de aminoácido líder 32 que é processada pós-translacionalmente quando a proteína é processada da forma imatura para a forma madura; (2) um domínio extracelular hidrofílico N-glicosilado que compreende aproximadamente 219 aminoácidos terminais; (3) um fragmento de aproximadamente 23 aminoácidos, principalmente hidrofóbicos, os quais se acredita serem os aminoácidos do domínio da transmembrana; e (4) a extremidade carboxila de 21 aminoácidos os quais se acredita serem os aminoácidos que formam a parte do fragmento citoplasmático da proteína. Essa estrutura do domínio da proteína permite a produção, por exemplo, do domínio extracelular da proteína ou de fragmentos funcionais do mesmo. A seqüência de aminoácido da proteína do TF humano é conhecida e pode ser consultada em bancos de dados de proteína como, por exemplo, NCBI (hTF, Número de acesso: P13726).

O termo "TF lipidizado", tal como utilizado na presente invenção, refere-se a qualquer fonte de TF, sendo esse TF total ou parcialmente introduzido nas vesículas lipídicas ou nas membranas celulares. Os exemplos ilustrativos e não limitadores de fontes de "TF lipidizado" são: o TF lipidizado que contém o extrato (cujo isolamento pode ser obtido a partir de diversos tecidos tais como o tecido cerebral, placentário e pulmonar, tecidos de diferentes animais tais como carneiros, vacas, coelhos, cães,

seres humanos, etc.); componente proteínáceo do TF purificado e (re)-lipidizado (purificado a partir de um extrato ou de um TF recombinante), isto é, ao qual o componente de lipídio foi adicionado depois de sua purificação e o qual pode ser
5 preparado, a título de exemplo ilustrativo e não limitador, de acordo com o protocolo descrito previamente por Morrissey [vide o exemplo incluído nesta descrição]. No dito protocolo, o TF não-lipidizado é incorporado dentro das vesículas de fosfolipídio utilizando um detergente não-iônico, tal como N-
10 octil-beta-D-glicopiranosídeo, por exemplo. Os lipídios que podem ser utilizados no TF lipidizado de acordo com a invenção podem ter qualquer origem (animal, vegetal ou sintética). Virtualmente qualquer lipídio pode ser utilizado na preparação do TF lipidizado da presente invenção. Os
15 exemplos ilustrativos e não limitadores dos lipídios que podem ser utilizados na preparação do TF lipidizado incluem fosfolipídios (tais como a fosfatidil colina, a fosfatidil serina, a fosfatidil etanol amina, etc.), esfingolipídios (tais como a ceramida, a esfingosina-1-fosfato, a ceramida de
20 inositolfosfato, a ceramida de manosil-inositolfosfato, a ceramida de manosil-diinositolfosfato, etc.), fosfatidilinositol (tais como L- α -fosfatidilinositol, L- α -lisofosfatidilinositol, etc.) e fosfatos de fosfatidilinositol (tais como L- α -[fosfatidilinositol-4-
25 fosfato], 1, 2-dioctanol-sn-glicero-3-[fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato], etc.). A relação entre o componente proteínáceo do TF:lipídio (molar, em peso ou volumétrica) pode variar dentro de uma ampla faixa, por exemplo, de aproximadamente 1:50.000 a aproximadamente 1:3.000,
30 O termo TF, tal como utilizado na presente invenção, inclui diversas variantes e mutantes do TF de tipo selvagem que mantêm pelo menos uma das funções do TF de tipo selvagem, sendo que, vantajosamente, pelo menos uma das

funções do TF de tipo selvagem se refere à coagulação.

Em uma realização particular, o TF lipidizado utilizado na prática da presente invenção é o TF lipidizado humano e consiste no TF obtido a partir dos extratos de
5 tecido; ou o TF consiste no componente proteínáceo purificado a partir de extratos de tecido e introduzido em um componente de lipídio (com uma relação molar entre a proteína:lipídio de aproximadamente 1:8.700; ou o TF consiste em TF recombinante (rTF) obtido por um processo tal como descrito, somente como
10 um exemplo ilustrativo mas não limitador, na Patente U.S. N°. 6.261.803. A obtenção dos extratos e a purificação do TF podem ser realizadas a partir de diversos tecidos tais como o tecido cerebral, placentário e pulmonar e a partir de diferentes animais tais como carneiros, vacas, coelhos, cães
15 e seres humanos.

O termo "fragmento funcional do TF lipidizado", tal como utilizado nesta descrição, ainda inclui, embora sem ficar a eles limitado, os derivados de peptídeo do TF, particularmente do componente proteínáceo do TF, que inclui
20 mutantes e variantes do componente proteínáceo do TF de tipo selvagem, que mantêm uma ou mais funções do TF, de preferência que funcionam com respeito à coagulação, por exemplo, a potencialidade de se ligar ao FXa e/ou às NCIS e de desenvolver suas funções de formação de vasos e anti-hemorrágicas durante a cicatrização de ferimentos. A
25 seqüência de aminoácido do dito fragmento funcional do TF pode ser idêntica àquela de um fragmento do componente proteínáceo do TF de tipo selvagem ou pode ter inserções, apagamentos ou modificações de um ou mais aminoácidos, com a
30 condição que pelo menos uma das funções do TF de tipo selvagem seja preservada, vantajosamente pelo menos uma função relacionada à coagulação. Por uma questão de simplicidade, o termo "TF lipidizado" tal como utilizado na

presente invenção inclui qualquer fragmento funcional do TF lipidizado.

O componente proteínáceo do TF utilizado na realização da presente invenção pode adicionalmente fazer parte de uma proteína de fusão. Neste sentido, a dita proteína de fusão pode conter uma região A, a qual consiste na proteína do TF ou em um fragmento funcional da dita proteína do TF, ligada a uma região B que consiste em um outro fragmento do TF. A dita região B é ligada à região de terminal amino da dita proteína do TF ou do dito fragmento da proteína do TF ou a alternativamente a dita região B pode ser ligada à região de terminal carboxila da dita proteína do TF ou do dito fragmento da proteína do TF. As regiões A e B podem ser ligadas diretamente ou então ligadas através de um polipeptídeo do aglutinante entre as ditas regiões A e B. A proteína de fusão pode ser obtida pela síntese química ou por meio da expressão de genes de codificação da seqüência de nucleotídeo para a dita proteína de fusão em células hospedeiras apropriadas.

O termo "tratamento tópico", tal como utilizado na presente invenção, refere-se à aplicação do tratamento diretamente no local onde se faz necessário, por exemplo, em seções descontínuas da pele (cortes, etc.) e no tecido vascular (vasos rompidos, etc.).

De acordo com a presente invenção e tal como mostrado no exemplo incluído nesta descrição, o TF lipidizado age como um estimulador de Fxa, aumentando a sua atividade proteolítica e conseqüentemente a produção de protrombina e pode, portanto, ser utilizado para o tratamento ou a correção de distúrbios hemorrágicos, particularmente aqueles distúrbios hemorrágicos associados com a diátese hemorrágica.

O termo "diátese hemorrágica" refere-se ao processo que causa um distúrbio hemostático e que, por conseqüência,

causa a ocorrência de uma síndrome hemorrágica que pode ocasionalmente ocorrer com sangramento prolongado e excessivo. A diátese hemorrágica pode ser causada por uma coagulopatia congênita ou adquirida e/ou por um distúrbio
5 plaquetário congênito e adquirido.

O termo "coagulopatia" refere-se a um distúrbio do fator de coagulação. Esse distúrbio pode ser devido a uma deficiência ou a um déficit específico do fator de coagulação, cuja conseqüência será a ocorrência de uma
10 síndrome hemorrágica, ou devido a um distúrbio do fator de coagulação. A coagulopatia pode ser geralmente uma coagulopatia congênita ou uma coagulopatia adquirida.

Como exemplos ilustrativos e não limitadores de coagulopatias congênitas, podem ser mencionadas as
15 deficiências dos fatores de coagulação selecionados entre FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXII, FXIII, e as suas combinações.

As coagulopatias adquiridas podem ter origens diferentes. Os exemplos ilustrativos incluem deficiências da síntese do fator de coagulação na falência hepática grave,
20 terapia com anticoagulantes (tais como a heparina, heparinas de baixo peso molecular, varfarina, derivados de cumarina, dicumarinas, etc.). Um mecanismo alternativo é baseado em um consumo exagerado de fatores de coagulação de modo que não estejam disponíveis para formar o coágulo em uma lesão com
25 sangramento. Esse mecanismo ocorre na síndrome da coagulação intravascular disseminada ou na coagulopatia devido ao consumo que ocorre em doenças múltiplas como na septicemia grave que danifica as plaquetas que ativam o endotélio de
30 microcirculação e os fatores de coagulação com a formação de microtrombos múltiplos; na invasão sangüínea por TF tal como a liberação placentária; na retenção de um feto morto; em traumas múltiplos com esmagamento de tecidos; em picadas de cobras venenosas, etc. Na vasculite, os danos parietal e

endotelial liberam ativadores de coagulação. O consumo de fatores de coagulação é piorado pela lise da fibrina de numerosos microtrombos devido à ação da plasmina com liberação de PDF, que são antiplaquetas e anticoagulantes.

5 O termo "distúrbio plaquetário" refere-se a um distúrbio no número e na capacidade funcional das plaquetas, cujo resultado é a ocorrência de uma síndrome hemorrágica. O dito distúrbio plaquetário pode ser congênito ou adquirido.

Em uma realização particular, o dito distúrbio
10 plaquetário é um distúrbio plaquetário congênito. Os exemplos ilustrativos e não limitadores de distúrbios plaquetários congênitos incluem o mal de Glanzmann, o mal de Bernard Soulier, a síndrome de Bolin-Jamieson, a síndrome de Wiskott-Aldrich, a síndrome de Paris-Trousseau-Jacobsen, a
15 trombocitopenia do cromossomo X, a síndrome das plaquetas de Gray, a síndrome de Sebastian e a anemia de Fanconi.

Em uma outra dita realização particular, o distúrbio plaquetário é um distúrbio plaquetário adquirido. Os exemplos ilustrativos e não limitadores de distúrbios
20 plaquetários adquiridos incluem distúrbios mieloproliferativos, tais como a trombocitemia, a policitemia, a leucemia mielocítica crônica, etc.; há distúrbios plaquetários funcionais na metaplasia mielóide com tempo de sangramento aumentado, defeitos da retenção de
25 grânulos de vidro, defeito da agregação plaquetária, liberação anormal e defeito do fator de plaquetas III. Os defeitos plaquetários funcionais foram verificados nas disproteinemias no escorbuto e na doença cardíaca congênita e na cirrose.

30 Os termos "coagulopatia adquirida" e "distúrbio plaquetário adquirido" referem-se à origem do distúrbio, que pode ser iatrogênica ou secundária à outra doença.

O termo "indivíduo", tal como utilizado na presente

invenção, inclui qualquer membro de uma espécie animal, incluindo a espécie humana; a título de um exemplo ilustrativo e não limitador, o dito indivíduo pode ser um mamífero, tal como um primata, um animal doméstico, um roedor, etc., sendo que o dito indivíduo é de preferência um homem ou uma mulher de qualquer idade e raça. Em uma dita realização particular, o indivíduo é um ser humano sem nenhum histórico de distúrbios hemostáticos, tal como um indivíduo que não tem nenhuma coagulopatia ou distúrbio plaquetário. Em uma outra dita realização particular, o indivíduo é um ser humano que tem um histórico de distúrbios hemostáticos, tal como um indivíduo que tem diátese hemorrágica, por exemplo, uma coagulopatia, tal como uma coagulopatia congênita ou adquirida ou um distúrbio plaquetário, tal como um distúrbio plaquetário congênito ou adquirido.

Portanto, em uma realização particular, a invenção refere-se à utilização do TF lipidizado na preparação de uma droga para o tratamento tópico da hemorragia em um ser humano sem nenhum histórico de distúrbios hemostáticos. Em uma outra realização particular, a invenção refere-se à utilização do TF lipidizado na preparação de uma droga para o tratamento tópico da hemorragia de um ser humano que tem uma diátese hemorrágica.

Para a administração ao indivíduo, o TF lipidizado será formulado em uma forma farmacêutica apropriada para a sua administração tópica para o tratamento (local) tópico da hemorragia. Os exemplos ilustrativos e não limitadores das ditas formas farmacêuticas incluem aerossóis, soluções, suspensões, emulsões, géis, bálsamos, cremes, curativos, emplastros, pomadas, enxaguatórios bucais, etc. Para essa finalidade, a formulação farmacêutica que compreende o TF lipidizado irá incluir os veículos e excipientes farmaceuticamente aceitáveis requeridos para a preparação da

forma de administração farmacêutica escolhida (para maiores informações, consultar a seção relacionada à "Composição Farmacêutica" nesta descrição).

5 A dose de TF lipidizado a ser administrada ao indivíduo pode variar dentro de uma faixa muito ampla, por exemplo, entre aproximadamente 0,01 µg de proteína ativa/ml e 100 µg de proteína ativa/ml. A dose de TF lipidizado a ser administrada irá depender de diversos fatores, incluindo entre eles as características da proteína do TF utilizada, 10 tais como por exemplo, a sua atividade e vida média biológica, a concentração da proteína do TF na formulação, a condição clínica do indivíduo ou do paciente, o distúrbio hemorrágico a ser tratado, etc. (para maiores informações, consultar a seção relacionada à "Composição Farmacêutica" 15 nesta descrição).

II. Combinação de Produtos e Aplicações

II.1 TF lipidizado + FXa

Conforme é sabido, na via de coagulação sangüínea extrínseca, o TF se liga ao FVII/FVIIa circulante para formar 20 o complexo de TF::FVII e, na presença de cálcio, age como um substrato de modo que a ativação de FX ocorra. A ativação da via extrínseca envolve a interação de TF com o seu ligando, FVII/FVIIa. Esse complexo, TF::FVIIa, age como um substrato de modo que a ativação de FX por FVIIa ocorra. Os autores da 25 presente invenção verificaram agora surpreendentemente que o TF lipidizado em conjunto com o FXa, até mesmo em indivíduos com deficiência de FVII, induz a coagulação, de modo que o TF lipidizado aja como um estimulador de FXa, permitindo que essa protease de serina inicie a hidrólise de protrombina, 30 para produzir a protrombina e para que a origem da coagulação ocorra. Tal como utilizado na presente invenção, "FXa", refere-se a uma proteína, particularmente uma protease de serina, que em sua forma ativa é responsável pela iniciação

da hidrólise de protrombina e causa conseqüentemente o início da coagulação. Essa proteólise é executada por FXa que se liga à superfície de plaquetas ativada e, na presença de FVa e do cálcio iônico, hidrolisa a protrombina.

5 Mais especificamente, os autores da presente invenção verificaram surpreendentemente que a combinação de TF lipidizado e FXa, até mesmo em tais baixas concentrações de FXa em que não conseguem induzir a coagulação por si, coagula o plasma [consultar, por exemplo, as seções 1 (1.5) e
10 2 dos resultados do exemplo incluído nesta descrição].

Portanto, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um produto que compreende (i) TF lipidizado e (ii) o FXa. Com base nos resultados previamente mencionados, o dito produto pode ser utilizado como uma droga e pode ser
15 particularmente utilizado no tratamento da hemorragia, por exemplo, no tratamento tópico da hemorragia, em um indivíduo. Os ditos componentes (i) e (ii) podem estar juntos ou separados. Em uma realização particular, o TF lipidizado utilizado na preparação deste produto é o TF lipidizado
20 humano.

Em uma realização particular, a invenção apresenta um produto que compreende (i) o TF lipidizado e (ii) o FXa. Ambos os componentes podem ser combinados e estar juntos na mesma composição antes de sua administração ao indivíduo.

25 Em uma outra realização particular, a invenção apresenta um produto que compreende, separadamente, (i) o TF lipidizado e (ii) o FXa. Em uma outra realização particular, a invenção apresenta um produto que compreende, separadamente, (i) o TF lipidizado e (ii) o FXa, como uma
30 combinação para a sua administração simultânea ou sucessiva a um indivíduo. A administração combinada dos ditos componentes (i) e (ii) ao indivíduo pode ser realizada simultânea ou seqüencialmente, espaçada no tempo, em qualquer ordem, isto

é, primeiramente o TF lipidizado e então o FXa pode ser administrado, ou vice-versa. Alternativamente, o dito TF lipidizado e o FXa podem ser simultaneamente administrados.

Para a sua administração a um indivíduo, o produto previamente definido será formulado em uma forma de administração farmacêutica, de preferência uma forma de administração farmacêutica apropriada para a sua administração tópica, para cuja finalidade os veículos e os excipientes farmacêuticamente aceitáveis apropriados para a preparação da forma de administração farmacêutica desejada serão incorporados. As informações sobre os ditos veículos e excipientes, assim como sobre a dita forma de administração apropriada para a administração do dito produto da invenção, podem ser encontradas em tratados sobre farmácia galênica. Para maiores informações, consultar a seção relacionada à "Composição Farmacêutica" desta descrição.

A dose de TF lipidizado e de FXa a ser administrada ao indivíduo pode variar dentro de uma ampla faixa. Para fins de ilustração, a dose de TF lipidizado a ser administrada pode ficar compreendida entre aproximadamente 0,01 µg de proteína ativa/ml e 100 µg de proteína ativa/ml. Além disso, para fins de ilustração, a dose de FXa a ser administrada pode ficar compreendida entre aproximadamente 17 pM e 17 nM (0,001 µg de proteína ativa/ml e 10 µg de proteína ativa/ml). Geralmente, as doses de TF lipidizado e de FXa a serem administradas irão depender de diversos fatores, incluindo as características da proteína do TF utilizada e do FXa, tais como, por exemplo, a sua atividade e vida média biológica, a concentração de FXa e da proteína do TF na formulação, a condição clínica do indivíduo ou do paciente, o distúrbio hemorrágico a ser tratado, etc. (para maiores informações, consultar a seção relacionada à "Composição Farmacêutica" desta descrição).

A relação entre o peso do TF lipidizado e o FXa presente no dito produto pode variar dentro de uma ampla faixa; para fins de ilustração, a dita relação entre o peso do TF:FXa fica compreendida entre 106:1 e 10:1, embora outras
 5 relações de peso também sejam possíveis; em uma dita realização particular, o produto da invenção compreende o TF lipidizado e o FXa em uma relação de peso de 1 a 0,001, isto é, para cada miligrama de proteína de TF, há 1 micrograma de proteína de FXa presente na mistura.

10 A utilização do produto definido previamente como uma droga, especificamente a utilização do dito produto na preparação de uma droga para o tratamento da hemorragia em um indivíduo, particularmente para o tratamento tópico da hemorragia em um indivíduo, constitui aspectos adicionais da
 15 presente invenção.

II.2 TF Lipidizado + NCIS

Os autores da presente invenção também verificaram surpreendentemente que a combinação de TF lipidizado e as superfícies inorgânicas negativamente carregadas (NCIS)
 20 coagula o plasma e o sangue de indivíduos saudáveis e de pacientes com deficiência do fator de coagulação tanto *in vitro* [consultar as seções 1 (1.4), 2 (2.2), 3 (3.4), 4 (4.2) e 5 (5.2 e 5.4) dos resultados do exemplo incluído nesta descrição] quanto *in vivo* [consultar as seções 6.1 dos
 25 resultados do exemplo incluído nesta descrição].

O termo "superfície inorgânica negativamente carregada" ou "NCIS", tal como utilizado nesta descrição, é constituído por uma mistura de lipídios e de aceleradores da coagulação sangüínea, tais como o ácido elágico, zeólito,
 30 sílica, materiais inorgânicos de óxidos, etc. Os lipídios têm uma carga negativa líquida, o que significa que a mistura lipídica pode incluir lipídios neutros ou switeriônicos, mas deve conter uma determinada quantidade de lipídios

negativamente carregados que confira um caráter aniônico à mistura. Como um exemplo ilustrativo e não limitador, os lipídios negativamente carregados podem ser esfingolipídios (tais como ceramida-1-fosfatos, fosfatidiletanolamina glicosilada, sulfatídeos hidroxilados ou não-hidroxilados, gangliosídeos, etc.) e lipídios à base de glicerol (tais como fosfatidilserinas, fosfatidilinositóis, fosfatos de fosfatidilinositol, ácidos fosfatídicos, fosfatidilgliceróis, cardiolipinas). No presente pedido de patente, os produtos comercialmente disponíveis Dade® Actin® (Dade Behring, marca registrada) foram utilizados como uma fonte de NCIS.

Portanto, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um produto que compreende (i) o TF lipidizado e (ii) a NCIS. Com base nos resultados previamente mencionados, o dito produto pode ser utilizado como uma droga e pode ser particularmente utilizado no tratamento de hemorragias, por exemplo, no tratamento tópico da hemorragia, em um indivíduo. Os ditos componentes (i) e (ii) podem estar juntos ou separados.

Em uma realização particular, a invenção apresenta um produto que compreende (i) o TF lipidizado e (ii) a NCIS. Ambos os componentes podem ser combinados e estar juntos na mesma composição antes de sua administração ao indivíduo.

Em uma outra realização particular, a invenção apresenta um produto que compreende, separadamente, (i) o TF lipidizado e (ii) a NCIS. Em uma outra realização particular, a invenção apresenta um produto que compreende, separadamente, (i) o TF lipidizado e (ii) a NCIS, como uma combinação para a sua administração simultânea ou sucessiva a um indivíduo. A administração combinada dos ditos componentes (i) e (ii) ao indivíduo pode ser realizada simultânea ou seqüencialmente, espaçada no tempo, em qualquer ordem, isto é, primeiramente o TF lipidizado e então a NCIS pode ser

administrada, ou vice-versa. Alternativamente, o dito TF lipidizado e NCIS podem ser simultaneamente administrados.

Para a sua administração a um indivíduo, o produto previamente definido será formulado em uma forma de administração farmacêutica, de preferência uma forma de administração farmacêutica apropriada para a sua administração tópica, para cuja finalidade os veículos e os excipientes farmacêuticamente aceitáveis apropriados para a preparação da forma de administração farmacêutica desejada serão incorporados. As informações sobre os ditos veículos e excipientes, assim como sobre a dita forma de administração apropriada para a administração do dito produto da invenção, podem ser encontradas em tratados sobre farmácia galênica. Para maiores informações, consultar a seção relacionada à "Composição Farmacêutica" desta descrição.

A dose de TF lipidizado e de NCIS a ser administrada ao indivíduo pode variar dentro de uma ampla faixa. Para fins de ilustração, a dose de TF lipidizado a ser administrada pode ficar compreendida entre aproximadamente 0,01 µg de proteína ativa/ml e 100 µg de proteína ativa/ml. Além disso, para fins de ilustração, a dose de NCIS (em volume) a ser administrada pode ficar compreendida entre aproximadamente 0,1 e 100 µl para cada µg de proteína ativada pelo TF lipidizado. Geralmente, as doses de TF lipidizado e de NCIS a serem administradas irão depender de diversos fatores, incluindo as características da proteína do TF utilizada e a NCIS, tais como, por exemplo, a sua atividade e vida média biológica, a concentração da proteína do TF e da NCIS na formulação, a condição clínica do indivíduo ou do paciente, o distúrbio hemorrágico a ser tratado, etc. (para maiores informações, consultar a seção relacionada à "Composição Farmacêutica" desta descrição).

A relação de peso/volume (w/v) entre o TF

lipidizado e a NCIS presente no dito produto pode variar dentro de uma ampla faixa; para fins de ilustração, a dita relação entre TF lipidizado:NCIS w/v fica compreendida entre 1:1 e 1:106, embora outras relações de w/v também sejam
5 possíveis; em uma realização particular, o dito produto da invenção compreende entre 0,1 e 100 µl de NCIS para cada µg de proteína ativada pelo TF lipidizado.

A utilização do produto definido previamente como uma droga, especificamente a utilização do dito produto na
10 preparação de uma droga para o tratamento de hemorragias em um indivíduo, particularmente para o tratamento tópico da hemorragia em um indivíduo, constitui aspectos adicionais da presente invenção.

II.3 TF Lipidizado + FXa + NCIS

15 Os autores da presente invenção também verificaram surpreendentemente que a combinação de TF lipidizado, FXa e NCIS coagula o plasma e o sangue de indivíduos saudáveis e de pacientes com deficiência do fator de coagulação *in vitro* [consultar as seções 1 (1.6) e 2 (2.2) dos resultados do
20 exemplo incluído nesta descrição].

Portanto, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um produto que compreende (i) o TF lipidizado, (ii) o FXa e (iii) a NCIS. Com base nos resultados previamente mencionados, o dito produto pode ser utilizado como uma droga
25 e pode ser particularmente utilizado no tratamento de hemorragias, por exemplo, no tratamento tópico da hemorragia, em um indivíduo. Os ditos componentes (i), (ii) e (iii) podem estar juntos ou separados. Alternativamente, dois dos componentes podem estar juntos, por exemplo, (i) + (ii), (i)
30 + (iii) ou (ii) + (iii) e o terceiro separado.

Em uma realização particular, a invenção apresenta um produto que compreende (i) o TF lipidizado, (ii) o FXa e (iii) a NCIS. Os ditos componentes podem ser combinados e

estar juntos na mesma composição antes de sua administração ao indivíduo.

Em uma outra realização particular, a invenção apresenta um produto que compreende, separadamente, (i) o TF
5 lipidizado, (ii) o FXa e (iii) a NCIS. Em uma outra realização particular, a invenção apresenta um produto que compreende, separadamente, (i) o TF lipidizado, (ii) o FXa e (iii) a NCIS, como uma combinação para a sua administração simultânea ou sucessiva a um indivíduo. A administração
10 combinada dos ditos componentes (i), (ii) e (iii) ao indivíduo pode ser realizada simultânea ou sequencialmente, espaçada no tempo, em qualquer ordem, isto é, primeiramente o TF lipidizado, então o FXa e então a NCIS pode ser administrada, ou primeiramente o TF lipidizado, então a NCIS
15 e então o FXa podem ser administrados, ou primeiramente o FXa, a seguir o TF lipidizado e então a NCIS podem ser administrados, ou primeiramente o FXa, a seguir a NCIS e então o TF lipidizado podem ser administrados, ou primeiramente a NCIS, a seguir o FXa e então o TF lipidizado
20 podem ser administrados, ou primeiramente a NCIS, então o TF lipidizado e então o FXa podem ser administrados. Alternativamente, quaisquer dois ditos componentes podem ser misturados na mesma composição e ser administrados em conjunto, sendo que o terceiro pode ser adicionado antes ou
25 depois da dita composição de componente binária. Em uma outra realização alternativa, os ditos TF lipidizado, FXa e NCIS são administrados simultaneamente.

Para a sua administração a um indivíduo, o produto previamente definido será formulado em uma forma de
30 administração farmacêutica, de preferência uma forma de administração farmacêutica apropriada para a sua administração tópica, para cuja finalidade os veículos e os excipientes farmacêuticamente aceitáveis apropriados para a

preparação da forma de administração farmacêutica desejada serão incorporados. As informações sobre os ditos veículos e excipientes, assim como sobre a dita forma de administração apropriada para a administração do dito produto da invenção, 5 podem ser encontradas em tratados sobre farmácia galênica. Para maiores informações, consultar a seção relacionada à "Composição Farmacêutica" desta descrição.

A dose de TF lipidizado, FXa e de NCIS a ser administrada ao indivíduo pode variar dentro de uma ampla 10 faixa. Para fins de ilustração, a dose de TF lipidizado a ser administrada pode ficar compreendida entre aproximadamente 0,01 µg de proteína ativa/ml e 100 µg de proteína ativa/ml. Além disso, para fins de ilustração, a dose de FXa a ser administrada pode ficar compreendida entre aproximadamente 17 15 pM e 170 nM (0,001 µg de proteína e 10 µg de proteína/ml). Adicionalmente, para fins de ilustração, a dose de NCIS (em volume) a ser administrada pode ficar compreendida entre aproximadamente 0,1 e 100 µl para cada µg de proteína ativada pelo TF lipidizado. Geralmente, as doses de TF lipidizado, 20 FXa e NCIS a serem administradas irão depender de diversos fatores, incluindo as características da proteína do TF, do FXa e da NCIS utilizada, tais como, por exemplo, a sua atividade e vida média biológica, a concentração da proteína do TF, FXa e NCIS na formulação, a condição clínica do 25 indivíduo ou do paciente, o distúrbio hemorrágico a ser tratado, etc. (Para maiores informações, consultar a seção relacionada à "Composição Farmacêutica" desta descrição).

A relação de peso entre o TF lipidizado, o FXa e a NCIS presente no dito produto pode variar dentro de uma ampla 30 faixa, tal como mencionado previamente nas seções II.1 e II.2; não obstante, em uma realização particular, o dito produto da invenção compreende TF lipidizado:FXa:NCIS em uma relação de 1:0,001:100 (w:w:v).

A utilização do produto definido previamente como uma droga, especificamente a utilização do dito produto na preparação de uma droga para o tratamento de hemorragias em um indivíduo, particularmente para o tratamento tópico da hemorragia em um indivíduo, constitui aspectos adicionais da presente invenção.

III. Complexos e Aplicações

III.1 Complexo de TF::FXa

Conforme mencionado previamente (consultar a seção II.1 desta descrição), os autores da presente invenção verificaram que a combinação de TF lipidizado e FXa, até mesmo em tais baixas concentrações de FXa que não conseguem induzir a coagulação por si, coagula o plasma. Embora não se pretenda ficar limitado a nenhuma teoria, acredita-se que a administração, combinada ou separada (em qualquer ordem), do dito TF lipidizado e FXa causa a formação de um complexo que pode exercer o efeito terapêutico (anti-hemorrágico, particularmente, anti-hemorrágico tópico) observado no local onde o dito efeito terapêutico deve ser exercido.

Portanto, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um complexo, identificado como TF::FXa nesta descrição, que compreende o TF lipidizado e o FXa. Embora por uma questão de simplicidade o dito complexo seja representado como TF::FXa, o dito complexo poderia na verdade ser formado por diversas unidades de cada um dos ditos componentes; todas estas possibilidades estão dentro do âmbito da invenção. Em vista dos resultados previamente mencionados, o dito complexo pode ser utilizado como uma droga e pode ser particularmente utilizado no tratamento de hemorragias, por exemplo, no tratamento tópico da hemorragia, em um indivíduo. Em uma realização particular, o TF lipidizado utilizado na preparação deste complexo é o TF lipidizado humano.

Para a sua administração a um indivíduo, o produto

previamente definido será formulado em uma forma de administração farmacêutica, de preferência uma forma de administração farmacêutica apropriada para a sua administração tópica, para cuja finalidade os veículos e os excipientes farmacêuticamente aceitáveis apropriados para a preparação da forma de administração farmacêutica desejada serão incorporados. As informações sobre os ditos veículos e excipientes, assim como sobre a dita forma de administração apropriada para a administração do dito produto da invenção, podem ser encontradas em tratados sobre farmácia galênica. Para maiores informações, consultar a seção relacionada à "Composição Farmacêutica" desta descrição.

As doses de TF lipidizado e de FXa presentes no dito complexo a ser administrado ao indivíduo podem variar dentro de uma ampla faixa. Geralmente, as ditas doses correspondem às doses mencionadas previamente na seção II.1, que se refere a um produto que compreende o TF lipidizado e o FXa.

A relação entre o peso do TF lipidizado e o FXa presente no dito complexo de TF::FXa pode variar dentro de uma ampla faixa; embora corresponda geralmente àquela mencionada previamente em II.1, que se refere a um produto que compreende o TF lipidizado e o FXa.

A utilização do complexo definido previamente como uma droga, especificamente a utilização do dito complexo na preparação de uma droga para o tratamento da hemorragia em um indivíduo, particularmente para o tratamento tópico das hemorragias em um indivíduo, constitui aspectos adicionais da presente invenção.

III.2 Complexo de TF::NCIS

Conforme mencionado previamente (consultar a seção II.2 desta descrição), os autores da presente invenção verificaram que a combinação de TF lipidizado e NCIS coagula

o plasma e o sangue em indivíduos saudáveis e em pacientes com deficiência do fator de coagulação *in vitro* e *in vivo*. Embora não se pretenda ficar limitado a nenhuma teoria, acredita-se que a administração, combinada ou separada (em
5 qualquer ordem), do dito TF lipidizado e NCIS, cause a formação de um complexo que pode exercer o efeito terapêutico (anti-hemorragico, particularmente, anti-hemorragico tópico) observado no local onde o dito efeito terapêutico deve ser exercido.

10 Portanto, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um complexo, identificado como TF::NCIS nesta descrição, que compreende o TF lipidizado e a NCIS. Embora por uma questão de simplicidade o dito complexo seja representado como TF::NCIS, o dito complexo poderia na verdade ser formado
15 por diversas unidades de cada um dos ditos componentes; todas estas possibilidades estão dentro do âmbito da invenção. Em vista dos resultados previamente mencionados, o dito complexo pode ser utilizado como uma droga e pode ser particularmente utilizado no tratamento de hemorragias, por exemplo, no
20 tratamento tópico da hemorragia, em um indivíduo. Em uma realização particular, o TF lipidizado utilizado na preparação deste complexo é o TF lipidizado humano.

Para a sua administração a um indivíduo, o produto previamente definido será formulado em uma forma de
25 administração farmacêutica, de preferência uma forma de administração farmacêutica apropriada para a sua administração tópica, para cuja finalidade os veículos e os excipientes farmacêuticamente aceitáveis apropriados para a preparação da forma de administração farmacêutica desejada
30 serão incorporados. As informações sobre os ditos veículos e excipientes, assim como sobre a dita forma de administração apropriada para a administração do dito produto da invenção, podem ser encontradas em tratados sobre farmácia galênica.

Para maiores informações, consultar a seção relacionada à "Composição Farmacêutica" desta descrição.

As doses de TF lipidizado e de NCIS presentes no dito complexo a ser administrado ao indivíduo podem variar dentro de uma ampla faixa. Geralmente, as ditas doses correspondem às doses mencionadas previamente na seção II.2, que se refere a um produto que compreende a combinação de TF lipidizado e a NCIS.

A relação de peso/volume entre o TF lipidizado e a NCIS presente no dito complexo de TF::NCIS pode variar dentro de uma ampla faixa; embora corresponda geralmente àquela mencionada previamente em II.2, que se refere a um produto que compreende o TF lipidizado e a NCIS.

A utilização do complexo definido previamente como uma droga, especificamente a utilização do dito complexo na preparação de uma droga para o tratamento de hemorragias em um indivíduo, particularmente para o tratamento tópico da hemorragia em um indivíduo, constitui aspectos adicionais da presente invenção.

20 III.3 Complexo de TF Lipidizado::FXa::NCIS

Conforme mencionado previamente (consultar a seção II.3 desta descrição), os autores da presente invenção verificaram que a combinação de TF lipidizado, FXa e NCIS coagula o plasma. Embora não se pretenda ficar limitado a nenhuma teoria, acredita-se que a administração, combinada ou separada (em qualquer ordem), dos ditos TF lipidizado, FXa e NCIS, cause a formação de um complexo que pode exercer o efeito terapêutico (anti-hemorrágico, particularmente, anti-hemorrágico tópico) observado no local onde o dito efeito terapêutico deve ser exercido. Portanto, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um complexo, identificado como TF::FXa::NCIS nesta descrição, que compreende o TF lipidizado, o FXa e a NCIS. Embora por questão de

simplicidade, o dito complexo seja representado como TF::FXa::NCIS, o dito complexo poderia na verdade ser formado por diversas unidades de cada um dos ditos componentes, bem como por qualquer possibilidade de interações entre os ditos
 5 componentes, por exemplo, TF::NCIS::FXa, FXa::NCIS::TF, FXa::TF::NCIS, NCIS::TF::FXa ou NCIS::FXa::TF; todas estas possibilidades estão dentro do âmbito da invenção. Em vista dos resultados previamente mencionados, o dito complexo pode ser utilizado como uma droga e pode ser particularmente
 10 utilizado no tratamento da hemorragia, por exemplo, no tratamento tópico da hemorragia, em um indivíduo. Em uma realização particular, o TF lipidizado utilizado na preparação deste complexo é o TF lipidizado humano.

Para a sua administração a um indivíduo, o produto
 15 previamente definido será formulado em uma forma de administração farmacêutica, de preferência uma forma de administração farmacêutica apropriada para a sua administração tópica, para cuja finalidade os veículos e os excipientes farmaceuticamente aceitáveis apropriados para a
 20 preparação da forma de administração farmacêutica desejada serão incorporados. As informações sobre os ditos veículos e excipientes, assim como sobre a dita forma de administração apropriada para a administração do dito produto da invenção, podem ser encontradas em tratados sobre farmácia galênica.
 25 Para maiores informações, consultar a seção relacionada à "Composição Farmacêutica" desta descrição.

As doses de TF lipidizado, FXa e NCIS presentes no dito complexo a ser administrado ao indivíduo podem variar dentro de uma ampla faixa. Geralmente, as ditas doses
 30 correspondem às doses mencionadas previamente na seção II.3, que se refere a um produto que compreende a combinação de TF lipidizado, FXa e NCIS.

A relação entre o TF lipidizado, o FXa e a NCIS

presentes no dito complexo de TF::FXa::NCIS pode variar dentro de uma ampla faixa; embora corresponda geralmente àquela mencionada previamente em II.3, que se refere a um produto que compreende o TF lipidizado, o FXa e a NCIS.

5 A utilização do complexo definido previamente como uma droga, especificamente a utilização do dito complexo na preparação de uma droga para o tratamento de hemorragias em um indivíduo, particularmente para o tratamento tópico das hemorragias em um indivíduo, constitui aspectos adicionais da
10 presente invenção.

IV. Composição Farmacêutica

Conforme mencionado previamente, o TF lipidizado pode ser utilizado como um agente anti-hemorrágico, particularmente, como um agente anti-hemorrágico para a
15 aplicação tópica. Portanto, em um outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica, daqui por diante, a composição farmacêutica da invenção, que compreende o TF lipidizado em conjunto com um veículo farmaceuticamente aceitável. Em uma realização particular, o TF lipidizado é o
20 TF lipidizado humano.

Para a sua administração a um indivíduo, o produto previamente definido será formulado em uma forma de administração farmacêutica, de preferência uma forma de administração farmacêutica apropriada para sua administração
25 tópica, para cuja finalidade os veículos e os excipientes farmaceuticamente aceitáveis apropriados para a preparação da forma de administração farmacêutica desejada serão incorporados. As informações sobre os ditos veículos e excipientes, assim como sobre a dita forma de administração
30 apropriada para a administração do dito produto da invenção, podem ser encontradas em tratados sobre farmácia galênica. Uma revisão sobre as diferentes formas de administração farmacêutica das drogas em geral e de seus processos de

preparação, pode ser encontrada no livro "Tratado de Farmácia Galénica" ("*Galenic Pharmacy Treatise*"), da autoria de C. Faulí i Trillo, 1ª Edição, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Embora formas de administração farmacêutica
5 diferentes do TF lipidizado possam ser utilizadas, a administração do dito composto topicamente é mais vantajosa na prática; portanto, o TF lipidizado será formulado em uma forma farmacêutica apropriada para a sua administração tópica. Os exemplos ilustrativos e não limitadores das ditas
10 formas farmacêuticas incluem aerossóis, soluções, suspensões, emulsões, géis, bálsamos, cremes, curativos, emplastros, pomadas, enxaguatórios bucais, etc. Para essa finalidade, a formulação farmacêutica que compreende o TF lipidizado irá incluir os veículos e excipientes farmacêuticamente
15 aceitáveis requeridos para a preparação da forma de administração farmacêutica do TF lipidizado para a administração tópica.

Portanto, em uma realização particular, a composição farmacêutica da invenção é uma composição
20 farmacêutica para a administração tópica do TF lipidizado, que compreende o TF lipidizado e um veículo farmacêuticamente aceitável apropriado para a administração tópica do dito TF lipidizado.

O TF lipidizado estará presente na composição
25 farmacêutica da invenção em uma quantidade terapeuticamente eficaz. A dita quantidade pode variar dentro de uma ampla faixa, por exemplo, entre aproximadamente 0,01 µg de proteína ativa/ml e 100 µg de proteína ativa/ml.

Em uma outra realização particular, a composição
30 farmacêutica da invenção compreende:

a) um produto que compreende (i) o TF lipidizado e (ii) o FXa, em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

b) separadamente, (i) o TF lipidizado em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável e (ii) o FXa em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

5 c) um produto que compreende (i) o TF lipidizado e (ii) a NCIS, em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

d) separadamente, (i) o TF lipidizado em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável e (ii) a NCIS em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

10 e) um produto que compreende (i) o TF lipidizado, (ii) o FXa e (iii) a NCIS, em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

f) separadamente, (i) o TF lipidizado em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável, (ii) o FXa em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável e (iii) a NCIS em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

g) um complexo de TF::FXa em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

20 h) um complexo de TF::NCIS em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

i) um complexo de TF::FXa::NCIS em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável.

25 A composição farmacêutica previamente definida da invenção contém, conforme pode ser observado, o TF lipidizado sozinho ou combinado com o FXa e/ou a NCIS ou que forma complexos com FXa e/ou NCIS, como ingrediente ativo. Em uma realização particular, o TF lipidizado presente na composição farmacêutica previamente definida da invenção é o TF
30 lipidizado humano.

Além disso, em uma realização particular, a composição farmacêutica previamente definida da invenção será formulada em uma forma farmacêutica para a administração

tópica do ingrediente ativo (o TF lipidizado sozinho ou combinado com o FXa e/ou a NCIS ou que forma complexos com FXa e/ou NCIS). Os exemplos ilustrativos e não limitadores das ditas formas farmacêuticas incluem aerossóis, soluções, 5 suspensões, emulsões, géis, bálsamos, cremes, curativos, emplastos, pomadas, enxaguatórios bucais, etc. Para essa finalidade, a formulação farmacêutica que compreende o ingrediente ativo previamente mencionado irá incluir os veículos e excipientes farmaceuticamente aceitáveis 10 requeridos para a preparação da forma de administração farmacêutica do dito ingrediente ativo por meio da administração tópica.

O ingrediente ativo estará presente na composição farmacêutica da invenção em uma quantidade terapeuticamente 15 eficaz. A dose do ingrediente ativo a ser administrada a um indivíduo irá depender, entre outros fatores, da gravidade da patologia que o dito indivíduo está sofrendo, da forma de administração farmacêutica escolhida etc. Por esta razão, as doses mencionadas na presente invenção devem ser consideradas 20 somente como guias para um elemento versado na técnica e essa pessoa deve ajustar as doses de acordo com as variáveis previamente mencionadas. Não obstante, a composição farmacêutica da invenção pode ser administrada uma ou mais vezes ao dia para finalidades preventivas ou terapêuticas.

25 A composição farmacêutica da invenção pode ser utilizada em conjunto com outras drogas adicionais úteis no tratamento e/ou na prevenção de uma diátese hemorrágica (por exemplo, fatores de coagulação, plasma humano, etc.) para prover uma terapia de combinação. As ditas drogas adicionais 30 podem fazer parte da mesma composição farmacêutica ou, alternativamente, podem ser fornecidas na forma de uma composição separada para a sua administração simultânea ou sucessiva (seqüencial no tempo) com respeito à administração

da composição farmacêutica da invenção.

V. Composição Farmacêutica Suportada

A composição farmacêutica da invenção pode ser colocada em um suporte. Portanto, em um outro aspecto, a
5 invenção refere-se a um produto que compreende a composição farmacêutica da invenção e um suporte. O termo "suporte", tal como utilizado na presente invenção, refere-se a um substrato de material apropriado que permite a colocação da composição farmacêutica da invenção no mesmo, sendo carregado e liberado
10 no local desejado, por exemplo, no local onde a composição farmacêutica da invenção exerce o seu efeito terapêutico. O dito suporte pode ser um suporte sólido ou um suporte não-sólido, por exemplo, um suporte líquido ou um suporte gasoso. Os exemplos ilustrativos e não limitadores de suportes
15 sólidos incluem curativos, *band-aids*, compressas, emplastros, etc. Os exemplos ilustrativos e não limitadores de suportes líquidos incluem géis, sprays, enxaguatórios bucais, etc. Os exemplos ilustrativos e não limitadores de suportes gasosos incluem o ar, propelentes, etc. Em uma realização particular,
20 a composição farmacêutica da invenção depositada sobre o dito suporte compreende:

(a) (i) um suporte, (ii) um produto que compreende o TF lipidizado e o FXa, em conjunto com um veículo farmaceuticamente aceitável, (iii) um produto que compreende
25 o TF lipidizado e a NCIS, em conjunto com um veículo farmaceuticamente aceitável e (iv) um produto que compreende TF lipidizado, FXa e NCIS, em conjunto com um veículo farmaceuticamente aceitável, ou

(b) um complexo de TF::FXa, em conjunto com um
30 veículo farmaceuticamente aceitável, ou

(c) um complexo de TF::NCIS, em conjunto com um veículo farmaceuticamente aceitável, ou

(d) um complexo de TF::FXa::NCIS, em conjunto com

um veículo farmacêuticamente aceitável.

Em uma realização particular, o TF lipidizado presente na composição farmacêutica da invenção é o TF lipidizado humano.

5 Esse produto que compreende a composição farmacêutica da invenção depositada em um suporte pode ser obtido por métodos convencionais, por exemplo, ao misturar a composição farmacêutica da invenção e o suporte. A interação entre a composição farmacêutica da invenção e o suporte pode
10 ser uma interação física ou química, dependendo da natureza dos componentes da composição farmacêutica da invenção e do suporte utilizado.

VI. Utilização de TF Não-lipidizado para o Tratamento de Hemorragias

15 Os resultados obtidos nos ensaios realizados pelos autores da presente invenção mostram claramente que o TF:

- aumenta a atividade proteolítica de FXa e conseqüentemente a produção de trombina,
- coagula o plasma e o sangue de indivíduos
20 saudáveis e de pacientes com deficiência do fator de coagulação, incluindo o sangue com deficiência de FVII,
- coagula o sangue dos pacientes que sofrem de distúrbios plaquetários, e
- interrompe as hemorragias graves e letais *in vivo*
25 em modelos animais diferentes.

Portanto, esses resultados como um todo mostram claramente que o TF lipidizado é um agente anti-hemorrágico útil para o tratamento de hemorragias em indivíduos saudáveis e com deficiências do fator de coagulação, incluindo
30 pacientes com deficiência de FVIII, FIX, FXI, FXIII, FVII, F e FX.

A patente européia EP 266993 descreve a utilização de TF não-lipidizado no tratamento da hemorragia,

particularmente no tratamento da hemorragia devida a uma deficiência de um fator de coagulação, especificamente de um fator de coagulação escolhido entre FVIII, FIX, FXI ou FXIII. No entanto, a dita patente não descreve nem sugere a
5 possibilidade de utilizar o TF não-lipidizado no tratamento da hemorragia devida à deficiência de FVII.

A descoberta feita agora pelos autores da presente invenção que se refere ao papel do TF como um agente estimulante da atividade proteolítica de Fxa, independente do
10 fato se o indivíduo tem deficiência de FVII ou não, permite estabelecer a possibilidade de utilizar o TF não-lipidizado ou um fragmento não-lipidizado funcional do mesmo, no tratamento da hemorragia em um indivíduo com deficiência de FVII.

15 Portanto, em um outro aspecto, a invenção refere-se à utilização de TF não-lipidizado ou de um fragmento não-lipidizado funcional do mesmo, para a preparação de uma droga para o tratamento da hemorragia em um indivíduo com deficiência de FVII.

20 O termo "TF não-lipidizado", tal como utilizado na presente invenção, refere-se ao TF purificado (sem as membranas lipídicas plasmáticas). O termo TF, tal como utilizado na presente invenção, inclui variantes e mutantes do TF de tipo selvagem que mantêm pelo menos uma das funções
25 do TF de tipo selvagem, vantajosamente pelo menos uma das funções do TF de tipo selvagem que se refere à coagulação. O isolamento e a purificação do TF podem ser realizados a partir de diversos tecidos tais como tecido cerebral, placentário e pulmonar, tecidos de diferentes animais tais
30 como carneiros, vacas, coelhos, cães, seres humanos, etc. O TF também pode ser TF recombinante (rTF) obtido por um processo tal como descrito, somente como um exemplo ilustrativo mas não limitador, na Patente U.S. N°. 6.261.803.

Em uma realização particular, o TF não-lipidizado utilizado na prática da presente invenção é o TF não humano e consiste no componente proteináceo de um TF isolado e purificado a partir de tecido humano esgotado completamente das membranas lipídicas plasmáticas.

O termo "fragmento funcional de TF não-lipidizado", tal como utilizado nesta descrição, inclui, embora sem ficar a eles limitado, derivados de peptídeo do TF, particularmente do componente proteináceo do TF, incluindo mutantes e variantes do componente proteináceo do TF de tipo selvagem, que mantêm uma ou mais funções do TF, que funcionam de preferência com respeito à coagulação, por exemplo, a potencialidade de se ligar ao FXa e/ou à NCIS e de desenvolver sua função anti-hemorrágica de formação de vasos durante a cicatrização de ferimentos. A seqüência de aminoácido do dito fragmento funcional do TF pode ser idêntica àquela de um fragmento do componente proteináceo do TF de tipo selvagem ou pode ter inserções, eliminações ou modificações de um ou mais aminoácidos, com a condição que pelo menos uma das funções do TF de tipo selvagem seja preservada, vantajosamente pelo menos uma função que se refere à coagulação. Por uma questão de simplicidade, o termo "TF não-lipidizado", tal como utilizado na presente invenção, inclui qualquer fragmento funcional de TF não-lipidizado.

O TF não-lipidizado pode ser obtido por métodos convencionais. Para fins de ilustração, o componente proteináceo do TF é dissociado do componente de lipídio por meio da extração com solventes orgânicos. Os exemplos ilustrativos do dito solvente orgânico incluem misturas de piridina, etanol, heptano-butanol, etc. O componente proteináceo do TF pode ser purificado por meio de processos químicos convencionais. Os exemplos dos ditos processos químicos incluem o tratamento com detergentes, por exemplo,

deoxicolato, Triton X-100, etc., a filtração em gel e a eletroforese preparativa em géis de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, a utilização de concavalina A ligada a uma coluna de sefarose, a utilização
5 de colunas por afinidade utilizando anticorpos para o componente proteínáceo (proteína) do TF, etc.

Para a sua administração a um indivíduo com deficiência de FVII, o TF não-lipidizado será formulado em uma forma farmacêutica apropriada para a sua administração
10 por qualquer via apropriada. Embora virtualmente qualquer forma farmacêutica possa ser utilizada, a utilização de formas farmacêuticas para a administração parenteral do dito TF não-lipidizado é vantajosa.

Portanto, em uma realização particular, a invenção
15 refere-se à utilização de TF não-lipidizado ou de um fragmento não-lipidizado do mesmo, na preparação de uma droga para administração parenteral do dito TF não-lipidizado ou de um fragmentos não-lipidizados do mesmo.

Neste caso, as composições farmacêuticas que contêm
20 o TF não-lipidizado e excipientes ou veículos farmaceuticamente aceitáveis serão adaptadas para a sua administração parenteral na forma, por exemplo, de soluções estéreis, suspensões ou produtos liofilizados na forma de dosagem apropriada; neste caso, as ditas composições
25 farmacêuticas irão incluir excipientes apropriados, tais como tampões, tensoativos, etc. Em qualquer caso, os excipientes serão escolhidos de acordo com a administração farmacêutica escolhida. As informações sobre os ditos veículos e excipientes, assim como sobre a dita forma de administração
30 apropriada para a administração do dito produto da invenção, podem ser encontradas em tratados sobre farmácia galênica. Uma revisão de diferentes formas de administração farmacêutica das drogas em geral e de seus processos de

preparação pode ser encontrada no livro "Tratado de Farmacia Galénica" ("Galenic Pharmacy Treatise"), da autoria de C. Faulí i Trillo, 1ª Edição, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

A dose de TF não-lipidizado a ser administrada a um indivíduo com deficiência de FVII pode variar dentro de uma ampla faixa, por exemplo, entre aproximadamente 0,01 µg de proteína ativa/ml e 100 µg de proteína ativa/ml. A dose de TF não-lipidizado a ser administrada irá depender de diversos fatores, incluindo as características da proteína do TF utilizada, tais como, por exemplo, a sua atividade e vida média biológica, a concentração de proteína de TF na formulação, a condição clínica do paciente, o distúrbio hemorrágico a ser tratado, etc.

EXEMPLO

Para a finalidade de avaliar a capacidade do TF lipidizado como um estimulador de FXa, uma série de ensaios *in vitro* e *in vivo* foi realizada, especificamente:

1. Os ensaios *in vitro* demonstram que o TF lipidizado (sozinho e combinado) age como um estimulador direto de FXa, causando a formação de coágulo de fibrina e a coagulação sangüínea na ausência de FVII (causada por ausência, deficiência ou imunobloqueio)

1.1 O TF lipidizado aumenta a atividade proteolítica de FXa e conseqüentemente a produção de trombina na ausência de FVII (ensaios cromogênicos na solução e na suspensão de plaquetas lavadas).

1.2 O TF lipidizado pode coagular o plasma e o sangue dos pacientes com deficiência de FVII (ensaios de coagulação no plasma e no sangue integral não-anticoagulado).

1.3 O TF lipidizado pode coagular o plasma de indivíduos saudáveis na presença de um anticorpo monoclonal contra FVII (ensaios de coagulação).

1.4 A combinação de TF lipidizado e NCIS aumenta

sinergisticamente a coagulação sangüínea em plasmas deficientes em FVII (ensaios de coagulação).

1.5 A combinação de TF lipidizado e FXa aumenta sinergisticamente a coagulação sangüínea na presença de anticorpo monoclonal contra FVII) (ensaios de coagulação em plasmas deficientes em FX).

1.6 A combinação de TF lipidizado, FXa e NCIS aumenta sinergisticamente a coagulação na presença do anticorpo anti-FVII (ensaio de coagulação em plasmas deficientes em FX).

2. Os ensaios *in vitro* demonstram que a combinação de TF lipidizado com FXa em baixas concentrações (que não conseguem induzir quaisquer efeitos pró-coagulantes) causa a coagulação de plasmas deficientes em FX

2.1 O TF lipidizado age como um estimulador de FXa quando essa protease de serina está presente em baixas concentrações.

2.2 A combinação de TF lipidizado com FXa e NCIS age sinergisticamente na estimulação de FXa.

3. Os ensaios *in vitro* demonstram que o TF lipidizado (sozinho e combinado) causa a coagulação em pacientes com deficiências de outros fatores de coagulação que não o FVII

3.1 O TF lipidizado coagula o plasma e o sangue dos pacientes com deficiências nos fatores de coagulação FV, FVIII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII e FXIII (ensaios de coagulação em plasmas deficientes no fator de coagulação e no sangue integral não-anticoagulado a partir de FVIII e de FIX).

3.2 O TF lipidizado coagula o sangue integral e o plasma previamente heparinizados.

3.3 O TF lipidizado coagula o plasma de animais tratados com varfarina.

3.4 A combinação de TF lipidizado com NCIS intensifica sinergisticamente a coagulação sangüínea no plasma dos pacientes com deficiências nos fatores de coagulação FV,

FVIII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII e FXIII (ensaios de coagulação em plasmas deficientes no fator de coagulação) e no sangue integral dos pacientes hemofílicos.

4. Os ensaios *in vitro* demonstram que o TF lipidizado (sozinho e combinado) causa a coagulação sangüínea em indivíduos saudáveis

4.1 O TF lipidizado coagula o plasma e o sangue dos indivíduos saudáveis.

4.2 A combinação de TF lipidizado com NCIS intensifica sinergisticamente a coagulação sangüínea no plasma e no sangue dos indivíduos saudáveis. Ausência de efeitos sinérgicos quando o TF lipidizado é associado com os fosfolipídios.

5. Os ensaios *in vitro* demonstram o efeito coagulante do TF lipidizado (sozinho e combinado) no plasma dos pacientes com distúrbios plaquetários (trombocitopênicos) congênitos e adquiridos

5.1 O TF lipidizado coagula o plasma dos pacientes com distúrbios plaquetários congênitos.

5.2 A combinação de TF lipidizado com NCIS aumenta a coagulação no sangue integral dos pacientes com distúrbios plaquetários congênitos.

5.3 O TF lipidizado coagula amostras trombocitopênicas.

6. Os ensaios *in vivo* demonstram que o TF é um agente útil para o tratamento anti-hemorrágico tópico em ratos do controle (por meio de aplicação direta sozinha ou em combinação com NCIS no vaso sangüíneo previamente seccionado)

6.1 O TF lipidizado (sozinho ou combinado com a NCIS) é útil como um agente hemostático tópico em um modelo animal de hemorragia grave pela seção proximal da cauda do rato.

6.2 O TF lipidizado é útil como um agente hemostático tópico em um modelo animal de hemorragia grave tratado previamente com heparina ou varfarina.

6.3 O TF lipidizado é útil como um agente hemostático tópico em um modelo animal de hemorragia fatal pela seção proximal da cauda do rato.

I. MATERIAIS E MÉTODOS

5 Materiais

Como uma fonte de TF lipidizado, foram utilizados o Fator de Tecido recombinante humano (rTF), Thromborel® S e Neoplastin® Plus. Os seguintes preparados comerciais foram especificamente utilizados: Fator de tecido recombinante humano (Não-lipidizado) (American Diagnostica, EUA), relipidizado seguindo o método descrito por Morrissey; tromboplastina placentária humana liofilizada contendo cálcio (Thromborel® S, Dade Behring, Inc.); cérebro de coelho liofilizado contendo cálcio (Neoplastin® Plus, Diagnostica Stago-Roche).

A atividade pró-coagulante da proteína do TF foi determinada por uma curva padrão utilizando como material de referência um TF lipidizado recombinante humano (American Diagnostica, EUA) e foi expressa no texto como µg de proteína ativa/ml e nas tabelas como µg/ml. Para fins de simplicidade, neste exemplo, os termos rTF ou TF referem-se ao TF lipidizado, a menos que esteja indicado de alguma outra maneira. Os compostos comerciais da Haematologic Technologies foram utilizados como fontes de FXa, FII e FVa. O reagente Commercial Dade® Actin® FS (Dade Behring) foi utilizado como a NCIS. Os plasmas deficientes no fator de coagulação comerciais (FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII e FXIII) foram adquiridos junto à Dade Behring Marburg GmbH.

Métodos

30 Método para a Relipidação do TF nas Vesículas do Lipídio Utilizando a Diálise com Octilglicosídeo (Método de Morrissey)

O TF não-lipidizado é incorporado nas vesículas do lipídio utilizando o detergente não-iônico N-octil-beta-D-

glicopiranosídeo (octilglicosídeo). O TF e os lipídios são dissolvidos no octilglicosídeo formando as micelas. O octilglicosídeo pode ser facilmente removido da solução por meio de diálise devido à sua concentração de micelas essencial elevada (CMC = 20 a 50 mM). Quando o octilglicosídeo é removido, os lipídios são organizados nas vesículas unilamelares. O TF é embebido nestas vesículas em virtude de seu domínio de transmembrana. Normalmente, 50 a 80% das moléculas do TF são arranjadas voltadas para fora das vesículas.

Tampões e soluções de partida

Octilglicosídeo (n-octil-beta-D-glicopiranosídeo) junto à Calbiochem.

Lipídios:

	Lipídio	Concentração	Peso molecular
15	PC L-alfa-fosfatidilcolina	10 ou 25 mg/ml	761
	PS L-alfa-fosfatidilserina, sal de sódio de cérebro bovino	10 mg/ml	
	810		
20	PE L-alfa-fosfatidiletanolamina, fígado de bovino	10 mg/ml	768

Tampões:

HBS

100 mM de NaCl 20 mM de Hepes/NaOH, pH 7,5, 0,02% (m/v) de azida sódica

HBSA (manter a 4°C)

Albumina de soro bovino em 0,1% (m/v) de HBS

OG/HBS (preparar no momento do uso)

n-octil-beta-D-glicopiranosídeo em 100 mM de HBS (29,2 mg de OG/ml de HBS)

Preparação da solução de lipídio em octilglicosídeo (OG)

1. 2,6 micromoles de lipídios totais são preparados para cada amostra em um tubo de vidro, utilizando o raio

molar do lipídio desejado.

2. Secar a mistura do lipídio sob uma corrente de argônio ou nitrogênio.

3. Quando o tubo parecer estar seco, secar a
5 vácuo por mais sessenta minutos.

4. Adicionar 400 µl de uma solução fresca de OG/HBS (à temperatura ambiente) ao tubo que contém os lipídios secos.

Para as vesículas de PC:PS (relação molar de 80:20)

10 62 µl de PC (em 25 mg/ml) = 1,58 mg = 2,08 mmol

42 µl de PS (em 10 mg/ml) = 0,42 mg = 0,52 mmol

Para as vesículas de PC:PE:PC (relação molar de 40:40:20)

32 µl de PC (em 25 mg/ml) = 0,79 mg = 1,04 mmol

80 µl de PE (em 10 mg/ml) = 0,80 mg = 1,04 mmol

15 42 µl de PS (em 10 mg/ml) = 0,42 mg = 0,52 mmol

Relipidação

Adicionar a quantidade desejada de TF ao tubo que contém 400 µl de OG/lipídios e HBSA suficiente até completar o volume final de 1 ml. Executar essa etapa à temperatura
20 ambiente.

Obtenção de suspensões de plaquetas lavadas

As suspensões de plaquetas lavadas foram preparadas de acordo com o método descrito por Radomski M. et al. (Radomski M, Moncada S.; 1983 Thromb Res. 15; 30(4):383-9).
25 Este é um método aprimorado para a lavagem de plaquetas humanas com prostaciclina a partir de extrações de sangue (3,15% de citrato de sódio) de voluntários saudáveis. O processamento dos espécimes foi realizado sempre imediatamente depois da extração de sangue e à temperatura
30 ambiente. Os estados de ativação e de funcionalidade de plaquetas foram testados por meio de ensaios de agregação antes e durante o desempenho dos ensaios. A auto-ativação e a funcionalidade foram estimadas por meio da ativação com um

agonista conhecido (colágeno).

Ensaio *in vitro*

Ensaio cromogênico

Diferentes ensaios cromogênicos foram projetados na
5 solução e em suspensões ativadas por plaquetas para
demonstrar o efeito do rTF na atividade proteolítica do fator
Xa.

A atividade amidolítica de FXa foi determinada por
meio de um ensaio cromogênico utilizando S-2765 (Chromogenix)
10 como o substrato cromogênico para FXa, ao passo que a
atividade de formação de trombina foi analisada utilizando S-
2238 (Chromogenix) como o substrato cromogênico para a
trombina.

Os ensaios cromogênicos foram realizados em
15 suspensão (em tampão) e foram utilizadas suspensões de
plaquetas lavadas. Volumes apropriados de cada um dos fatores
a serem estudados foram aplicados em uma placa de ELISA e, no
caso de utilizar a suspensão de plaquetas lavadas, em um
volume apropriado para se obter uma concentração de 250.000
20 plaquetas/ μ l no meio. Finalmente, a adição do substrato
cromogênico específico permitiu a quantificação da atividade
proteolítica em questão por meio de leituras
espectrofotométricas em 405 nm. Nos ensaios para determinar a
atividade amidolítica, somente o FXa e concentrações
25 diferentes de rTF foram aplicados, ao passo que nos ensaios
para a determinação da atividade de formação de trombina foi
necessária a adição do fator II (protrombina) e FVa (este
último somente no caso de ensaios em suspensão, uma vez que
nos ensaios de plaquetas lavadas estes já continham FVa
30 endógeno).

Ensaio de coagulação no plasma

A atividade pró-coagulante espontânea (não-
estimulada) no plasma foi medida por meio de um ensaio de

coagulação com uma determinada etapa em um coagulômetro (temporizador de coagulação Fibrintimer BFT-II, Dade-Behring, Alemanha). Resumidamente, 50 µl de plasma pobre em plaquetas foram adicionados às cubetas já moderadas e 50 µl de água destilada foram adicionados. Essa mistura foi colocada para 5 incubar por 60 segundos a 37°C e 50 µl de cloreto de cálcio 25 mM foram adicionados imediatamente e o tempo de coagulação foi determinado em segundos no coagulômetro, verificado pela formação de coágulos. Cada uma das amostras foi testada em 10 duplicata. Os plasmas pobres em plaquetas foram obtidos pelo procedimento de centrifugação e o número de plaquetas foi determinado por Coulter.

Ensaio de coagulação no sangue integral

A atividade pró-coagulante no sangue integral não-anticoagulado foi determinada por meio de um método de 15 coagulação. Os diferentes agentes a serem estudados foram adicionados a 1 ml de sangue integral não-anticoagulado e o tempo de coagulação foi medido com um cronômetro do início da extração até que um coágulo de sangue estável e consolidado 20 aparecesse. O efeito dos diferentes agentes foi avaliado por meio de seus tempos de coagulação sangüínea diminuídos ou aumentados.

Ensaio *in vivo*

Modelo de hemorragia grave pela seção proximal da cauda de 25 rato

Vinte e três ratos Sprague-Dawley machos pesando 350-450 gramas foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de tratamento: um grupo de controle, composto de catorze animais que receberam o tratamento tópico com solução 30 salina fisiológica, sendo que outros dois grupos, também compostos de cinco animais receberam tratamento tópico com 1,2 µg/ml de rTF e n = 4 receberam tratamento tópico com 1,2 µg/ml de rTF + NCIS (vol:vol 1:2), respectivamente. Todos os

compostos entraram em contato tópico com a seção proximal da cauda do animal ao agir hemostaticamente aplicado por uma pipeta de Eppendorf de plástico. A formação de coágulo estável e consolidado foi evidenciada por meio da confirmação de nenhum sangramento adicional.

Modelo de hemorragia grave pela seção proximal da cauda de rato em animais tratados com drogas anticoagulantes

Vinte e sete ratos Sprague-Dawley machos pesando 350-450 gramas foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de tratamento: um grupo de controle, composto de catorze animais que receberam tratamento tópico com solução salina fisiológica. Dois grupos receberam 200 U/Kg da heparina i.v. quinze minutos antes para começar o procedimento de transecção da cauda (a serem tratados com TF n = 3 e a serem tratados com solução salina n = 5) e outros dois grupos receberam 0,1 mg/kg/dia de varfarina via oral durante três dias antes para começar o procedimento de transecção da cauda (a serem tratados com TF n = 3 e a serem tratados com solução salina, n = 2). O tratamento tópico com 1,2 µg/ml de rTF foi administrado a somente um de cada grupo de tratamento. Portanto, havia um grupo de controle tratado para cada tratamento de anticoagulação. O TF lipidizado entrou em contato tópico com a seção proximal da cauda do animal para agir hemostaticamente dispensado por uma pipeta plástica de Eppendorf. A formação de coágulo estável e consolidado foi evidenciada por meio da confirmação de nenhum sangramento adicional.

Modelo de hemorragia fatal pela punção na artéria carótida de ratos

Cada um de quatro ratos Sprague-Dawley machos pesando 350-450 gramas foi distribuído aleatoriamente em dois grupos de tratamento incluindo dois animais. Os animais do grupo de controle receberam a solução salina fisiológica como

tratamento, sendo que o outro grupo recebeu o TF lipidizado administrado topicamente (na dose final de 2 µg de proteína ativa). O modelo de hemorragia fatal pela punção na artéria carótida de ratos foi realizado depois dos procedimentos
 5 padrão. O TF lipidizado e a solução salina fisiológica foram administrados diretamente no ponto da punção em uma bandagem contendo 3 ml de cada. Isto foi combinado com a pressão e o contato do tratamento correspondente durante dois minutos.

II. RESULTADOS

10 1. Os ensaios *in vitro* demonstram que o TF lipidizado (sozinho e combinado) age como um estimulador direto de FXa, causando a formação de coágulo de fibrina e a coagulação sangüínea na ausência de FVII (causada por ausência, deficiência ou imunobloqueio)

15 1.1 *O TF lipidizado aumenta a atividade proteolítica de FXa e conseqüentemente a produção de trombina na ausência de FVII*

Diversos ensaios *in vitro* foram executados a fim de avaliar a capacidade do TF lipidizado como um agente estimulante do fator Xa na ausência de FVII: (i) ensaios
 20 cromogênicos para a atividade amidolítica de FXa em solução; e (ii) ensaios cromogênicos para a atividade de formação de trombina em suspensão de plaquetas lavadas.

Ensaio cromogênico para a atividade amidolítica de FXa

Ensaio direto para a atividade amidolítica de FXa
 25 em solução utilizando o substrato específico de FXa S-2765 demonstraram que o TF lipidizado pode aumentar muito significativamente a atividade proteolítica de FXa. Na presença de concentrações de rTF elevadas (1 µg/ml), foi observado um aumento da atividade produzido por concentrações
 30 baixas e elevadas de FXa ($p < 0,001$). Efeitos estimulantes significativos similares ($p < 0,001$) foram observados na presença de concentrações de TF lipidizado mais baixas (0,1 µg/ml). A Tabela 1 mostra os resultados obtidos em cinco

experiências independentes.

Tabela 1

TF lipidizado, na ausência de FVII, aumenta a atividade proteolítica de FXa na ausência de FVII

	Sem rTF	rTF 0,1 µg/ml	rTF 1 µg/ml
5 FXa 30 nM	550 ± 51	2.108 ± 61	3.316 ± 89
FXa 5 nM	0	341 ± 32	505 ± 63

Ensaio cromogênico para a atividade de formação de trombina em suspensões de plaquetas lavadas

- 10 O efeito pró-coagulante detectado foi muito maior quando as suspensões de plaquetas foram utilizadas como fonte da superfície pró-coagulante e a formação de trombina foi determinada por meio do substrato específico S-2238 (Tabela 2). Na ausência de FXa exógeno, o TF lipidizado produziu um
- 15 efeito estimulante significativo na formação de trombina ($p < 0,001$). Efeitos estimulantes similares foram observados na presença de FXa exógeno em concentrações baixas e elevadas ($p < 0,001$).

Tabela 2

- 20 TF lipidizado induz a formação de trombina em plaquetas lavadas na presença de FII, mas na ausência de FVa (já presente nas plaquetas) e de FVII

	Sem rTF	rTF 0,1 µg/ml	rTF 1 µg/ml
FXa 1.250 pM	421 ± 19	13.854 ± 145	14.910 ± 168
25 FXa 250 pM	213 ± 21	9.324 ± 155	9.610 ± 114
FXa 125 pM	201 ± 29	7.802 ± 113	8.508 ± 178
FXa ausente	0	906 ± 89	3.504 ± 69

- 1.2 O TF lipidizado pode coagular o plasma e o sangue dos pacientes com deficiência de FVII (ensaio de coagulação no
- 30 plasma e no sangue integral não-anticoagulado).

Uma série de ensaios de coagulação *in vitro* foi executada, a qual mostra o efeito coagulante do TF lipidizado

no plasma e no sangue integral não-anticoagulado dos pacientes com deficiência de FVII e, portanto, o TF lipidizado é um agente útil para o tratamento anti-hemorrágico.

5 Ensaio de coagulação no plasma e no sangue integral não-anticoagulado comercialmente esgotado de FVII dos pacientes com deficiência de FVII

O efeito do TF lipidizado na coagulação foi investigado por meio de ensaios de coagulação utilizando o plasma e o sangue integral não-anticoagulado de dois
10 pacientes com deficiência de FVII (Tabela 3). O TF lipidizado, de uma maneira dependente de concentração, pôde acelerar significativamente a coagulação em plasmas deficientes em FVII. Da mesma maneira, o sangue integral não-
15 anticoagulado dos pacientes com deficiência de FVII também foi coagulado na presença de concentrações baixas, médias e elevadas de TF lipidizado, indicando que pode produzir uma coagulação normal pelo TF lipidizado até mesmo na ausência de FVII. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos de cinco
20 experiências independentes para plasmas esgotados de FVII.

Tabela 3

Demonstração do efeito pró-coagulante do TF lipidizado em plasmas deficientes em FVII

	Tempo de coagulação (s)			
	Basal	Com rTF		
		1 g/ml	0,1 g/ml	0,01 g/ml
25				
	Plasma normal	215,1 ± 24,6	11,1 ± 0,2	15,3 ± 0,2
		25,7 ± 0,4		
30	Plasma deficiente em FVII	> 300	67,7 ± 7,2	113,7 ± 28,3
		202,7 ± 41,6		
	Média ± SEM (n = 5)			

O efeito do TF lipidizado no sangue do voluntário saudável era significativo após a concentração de 0,01 µg/ml, ao passo que concentrações maiores eram necessárias nos pacientes com deficiência de FVII (Tabela 4). Embora efeitos
 5 pró-coagulantes significativos ($p < 0,001$) detectados após 0,1 µg/ml, o TF lipidizado pôde normalizar o tempo de coagulação na concentração de 0,01 µg/ml, não havendo nenhuma diferença entre os tempos de coagulação detectados em indivíduos normais em condições basais e nos indivíduos com
 10 deficiência de FVII com a dita concentração de TF lipidizado. Finalmente, embora o TF lipidizado em 1 µg/ml não pudesse induzir o mesmo efeito pró-coagulante forte no plasma esgotado de FVII, um efeito muito significativo foi observado, que indicou que o TF lipidizado pode normalizar a
 15 hemostasia nestes pacientes.

Tabela 4

Efeito pró-coagulante do TF lipidizado no sangue integral não-anticoagulado de indivíduos saudáveis e com deficiência de FVII

	Basal	rTF			
		0,01 ng/ml	0,1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml
20					
	Amostra de controle n° 1	5,8	4,7	4,4	3,1
	2,1	1,3			
25	Amostra de controle n° 2	7,2	6,7	5,5	3,7
	2,1	1,0			
	Paciente n° 6 deficiente em FVII	11,4	n.d.	10,5	9,5
	5,2	2,3			
30	Paciente n° 7 deficiente em FVII	12,5	n.d.	11,3	10,5
	6,3	3,1			
	n.d. não determinado.				

1.3 O TF lipidizado pode coagular o plasma de indivíduos saudáveis na presença de um anticorpo monoclonal contra FVII (ensaios de coagulação).

5 Ensaios de coagulação *in vitro* foram executados, os quais mostram o efeito coagulante do TF lipidizado no plasma em indivíduos saudáveis na presença de um anticorpo monoclonal contra FVII (este anticorpo pode obstruir a coagulação em plasmas normais).

10 Ensaios de coagulação no plasma normal esgotado de FVII pela obstrução com anti-FVII

O efeito do TF lipidizado na coagulação do plasma foi investigado por meio de ensaios de coagulação utilizando plasmas de voluntários saudáveis na presença de um anticorpo monoclonal contra FVII (Tabela 5). O TF lipidizado pôde 15 causar a coagulação até mesmo na presença de um anticorpo monoclonal contra FVII, (que pode inibir completamente a coagulação sangüínea). Sob estas condições experimentais, (tal como as amostras com deficiência de FVII), o TF lipidizado pode produzir a coagulação do plasma.

20 Tabela 5

Demonstração do efeito pró-coagulante do TF no plasma normal na presença de um anticorpo monoclonal contra FVII

	Sem rTF	Com rTF 1 µg/ml
Plasma normal	126,8	28,1
25 Plasma normal com anti-FVII (400 µg/ml)	216,8	
	42,5	

1.4 A combinação de TF lipidizado e NCIS aumenta sinergisticamente a coagulação sangüínea em plasmas deficientes em FVII (ensaios de coagulação)

30 Uma série de ensaios de coagulação *in vitro* foi executada, a qual mostra o efeito coagulante do TF lipidizado associado com as superfícies inorgânicas negativamente

carregadas [NCIS] no plasma deficiente em FVII. O dito efeito pró-coagulante excedeu o efeito obtido quando o TF lipidizado foi utilizado sozinho como um agente pró-coagulante. Esses resultados mostram que o efeito mediado pelo TF lipidizado é independente de FVII e pode induzir a coagulação do plasma até mesmo na ausência de seu ligando específico. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos em cinco experiências independentes.

Tabela 6

Efeito pró-coagulante do rTF associado com superfícies inorgânicas negativamente carregadas em plasmas heparinizados e deficientes no fator de coagulação

Tempo de coagulação (s)

Basal

Com rTF

- 1 µg/ml 1 µg/ml + NCIS

Plasma normal 211,1 ± 18,5 18,6 ± 0,1 13 ± 1,2*

Plasma deficiente em FVII > 300 67 ± 11 32 ± 3,4*

1.5 A combinação de TF lipidizado e FXa aumenta sinergisticamente a coagulação sangüínea na presença de anticorpo monoclonal contra FVII (ensaios de coagulação em plasmas deficientes em FX).

Os efeitos pró-coagulantes da associação de TF lipidizado e FXa em baixas concentrações (170 pM e 1700 pM) na ausência de FVII foram investigados no plasma deficiente em FXa imunobloqueado com anti-FVII (Tabela 7).

Tabela 7

Efeito pró-coagulante do TF lipidizado associado com FXa no plasma deficiente em FXa na ausência de FVII (imunobloqueado com anti-FVII)

Plasma deficiente em FXa Tempo de coagulação (s)

Sem FXa Com FXa (1.700 Pm) Com FXa (170 pM)

Basal (5 mM de cálcio)	> 400	133 ± 18
290 ± 10,2		

Mais rTF 1 µg/ml	253,5 ± 11	83,1 ± 3,2*
124 ± 6,1*		

5	Mais rTF 1 µg/ml + anti FVII (400 µg/ml)	234,5 ± 9	78 ± 2*
	124 ± 6,1*		

Média ± SEM (n = 5); *p < 0,001 sem FXa versus FXa. t-Student.

1.6 A combinação de TF lipidizado, FXa e NCIS aumenta sinergisticamente a coagulação na presença do anticorpo anti-FVII (ensaio de coagulação em plasmas deficientes em FX).

Os efeitos pró-coagulantes da associação de TF lipidizado, FXa em baixas concentrações (170 pM e 1700 pM) e NCIS também foram investigados no plasma deficiente em FXa (Tabela 8).

Tabela 8

Efeito pró-coagulante do rTF associado com FXa e NCIS no plasma deficiente em FXa

Plasma deficiente em FXa	Tempo de coagulação (s)	
	Com NCIS (1 µl)	Com NCIS (2 µl)
Basal (5 mM de cálcio)	> 400	> 400
290 ± 10,2		
rTF 1 µg/ml + FXa (170 pM)	124 ± 6,1*	109 ± 4,1*
84 ± 3*		
rTF 1 µg/ml + FXa (1.700 pM)	83,1 ± 3,2*	65,5 ± 5,2*
45,5 ± 3,2*		
rTF 1 µg/ml + FXa (170 pM + anti FVII (400 µg/ml)	119 ± 5*	101 ± 5*
± 3*		99

rTF 1 µg/ml + FXa (1.700 pM + 78 ± 2 27,7 ± 1,2
25 ± 2

anti FVII (400 µg/ml)

Média SEM (n = 5); * p < 0,001 sem NCIS versus NCIS. t-
5 Student.

2. Os ensaios *in vitro* demonstram que a combinação de TF
lipidizado com FXa em baixas concentrações (que não conseguem
induzir quaisquer efeitos pró-coagulantes) causa a coagulação
de plasmas deficientes em FX

10 2.1 O TF lipidizado age como um estimulador de FXa quando
essa protease de serina está presente em baixas
concentrações.

Ensaio de coagulação *in vitro* foram executados no
plasma deficientes em FX de coagulação para mostrar que o
15 efeito sinérgico do TF lipidizado em FXa (adicionado em
baixas concentrações, 170 pM e 1.700 pM, ao plasma deficiente
em FX, portanto, esses plasmas não conseguem produzir FXa a
partir de qualquer via de coagulação). Os efeitos pró-
coagulantes da associação de TF lipidizado e FXa em baixas
20 concentrações é mostrado na Tabela 9.

Tabela 9

Efeito pró-coagulante do TF lipidizado associado com o FXa em
plasma deficiente em FXa

Plasma deficiente em FX Tempo de coagulação (s)

25 Sem FXa Com FXa (1.700 Pm) Com FXa (170 pM)

Basal (5 mM de cálcio) > 400 133 ± 18

290 ± 10,2

Mais rTF 1 µg/ml

253,5 ± 11 83,1 ± 3,2*

124 ± 6,1*

30 Média ± SEM (n = 5); *p < 0,001 sem FXa versus FXa. t-
Student.

2.2 A combinação de TF lipidizado com FXa e NCIS age

sinergisticamente na estimulação de FXa

Os efeitos pró-coagulantes da associação de TF lipidizado, FXa em baixas concentrações (170 pM e 1.700 pM) e NCIS também foram investigados no plasma deficiente em FX

5 (Tabela 10).

Tabela 10

Efeito pró-coagulante de TF lipidizado associado com FXa e NCIS em plasma deficiente em FXa

Plasma deficiente em FX Tempo de coagulação (s)

10	Sem FXa		Com FXa (1.700 Pm)
	Com FXa (170 pM)		
	Basal (5 mM de cálcio)	> 400	133 ± 18
	290 ± 10,2		
	Mais rTF 1 µg/ml + FXa (170 pM)	124 ± 6,1*	109 ±
15	4,1*	84 ± 3*	
	Mais rTF 1 µg/ml + FXa (1.700 pM)	83,1 ± 9	
	65,5 ± 5,2*	45,5 ± 3,2*	

Média ± SEM (n = 5); *p < 0,001 sem FXa versus FXa. t-Student.

20 3. Ensaio *in vitro* demonstram que o TF lipidizado (sozinho e combinado) causa a coagulação em pacientes com deficiências de outros fatores de coagulação que não o FVII

3.1 O TF lipidizado coagula o plasma e o sangue dos pacientes com deficiências nos fatores de coagulação FV, FVIII, FVIII,

25 FIX, FX, FXI, FXII e FXIII

O efeito pró-coagulante do TF lipidizado (sozinho) em plasmas deficientes no fator de coagulação foi investigado utilizando plasmas comerciais esgotados por meio de técnicas de imunoafinidade, assim como o plasma de três pacientes

30 diagnosticados com hemofilia A (deficientes em FVIII) e dois pacientes diagnosticados com hemofilia B (deficientes em FIX). A Tabela 11 mostra os resultados. Na concentração de 1

pg/ml, o TF lipidizado pôde coagular eficazmente todos os plasmas com deficiências em FV, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII e FXIII. Por outro lado, na ausência do co-fator de Fxa conhecido, FVa, o TF lipidizado também pôde produzir a

5 coagulação do plasma, embora somente em concentrações elevadas e médias. Nas deficiências do fator de coagulação restantes, o TF lipidizado foi eficaz em todas as concentrações utilizadas, com resultados excelentes obtidos em concentrações muito baixas. Até mesmo na ausência de FX

10 (1%), o TF lipidizado pôde coagular, mas somente em concentrações elevadas. Todos esses resultados foram confirmados com as amostras de pacientes com hemofilia A e hemofilia B.

Tabela 11

15 Efeito pró-coagulante do TF lipidizado em plasmas deficientes no fator de coagulação

Tempo de coagulação (s)

Sem rTF Com rTF

		-	1 g/ml	0,1 g/ml	0,01 g/ml
20	Plasma normal	215,1 ± 24,6	11,1 ± 0,02	15,3 ± 0,2	25,7 ± 0,4
	Plasma FV-D	> 600	84,3 ± 15,2	123,3 ± 24,5	350 ± 29,5
	Plasma FVIII-D	> 600	15,5 ± 2,3	21,5 ± 2,8	32,1 ± 2,6
25	Plasma FIX-D	> 600	14,8 ± 3,2	22,3 ± 2,5	34,6 ± 2,4
	Plasma FX-D	> 600	446,2 ± 32	> 600	> 600
30	Plasma FXI-D	> 600	14,3 ± 0,5	19,4 ± 1,5	27,3 ± 0,6

	Plasma FXII-D	> 600	16,2 ± 0,3	22,5 ± 1,1
			32,5 ± 0,5	
	Plasma FXIII-D	> 600	14,2 ± 0,3	21,5 ± 1,0
			30,5 ± 0,5	
5	Plasma Hemofilia A	> 600	12,2 ± 1,5	13,8 ± 0,6
			21,3 ± 0,8	
	Plasma Hemofilia B	> 600	12,1 ± 0,5	15,3 ± 0,4
			26,8 ± 0,6	
	Média ±SEM (n = 5)			

10 O efeito pró-coagulante do TF lipidizado (sozinho)
no sangue integral não-anticoagulado de ser humano, de
pessoas que sofrem de hemofilia A e B, foi avaliado por meio
de um ensaio de coagulação. A formação de coágulo foi
determinada ao estimar o tempo em minutos para a consolidação
15 do coágulo. O efeito do TF lipidizado no sangue de
voluntários saudáveis era significativo a partir de
concentrações de 0,001 µg/ml, sendo que doses maiores foram
requeridas em pacientes hemofílicos, efeitos pró-coagulantes
significativos (p<0,001) sendo detectados a partir de 0,01
20 µg/ml. Na concentração de 0,1 µg/ml, o TF lipidizado podia
normalizar completamente o tempo de coagulação, não havendo
nenhuma diferença entre os tempos de coagulação detectados em
indivíduos normais e em indivíduos hemofílicos. A Tabela 12
mostra os resultados obtidos de quatro amostras de indivíduos
25 saudáveis (amostras números 1-4), sendo que três dos
pacientes sofrem de hemofilia A e dois sofrem de hemofilia B.
Tabela 12

Efeito pró-coagulante de TF lipidizado no sangue integral não
coagulado de indivíduos saudáveis e de pacientes hemofílicos

30	Basal	rTF		
		0,001 µg/ml	0,01 µg/ml	0,1

		µg/ml			
	Amostra de controle nº 1	5,8	3,3	2,1	1,3
	Amostra de controle nº 2	7,2	3,7	2,1	1,0
	Amostra de controle nº 3	7,2	4,2	2,1	0,9
5	Amostra de controle nº 4	7,5	3,8	2,0	1,0
	Paciente nº 1 Hemofilia A	13,3	8,0	4,6	
	1,6				
	Paciente nº 2 Hemofilia A	17,3	9,0	5,6	
	1,0				
10	Paciente nº 3 Hemofilia A	15,3	12,4	7,0	
	1,5				
	Paciente nº 4 Hemofilia B	20,5	11,1	6,1	
	1,5				
	Paciente nº 5 Hemofilia B	16,3	11,3	5,5	
15	1,6				

Tempo de coagulação (expresso em minutos): o tempo que o coágulo leva para consolidar em uma amostra de sangue não-anticoagulado.

3.2. O TF lipidizado coagula o sangue integral e o plasma previamente heparinizado

O TF lipidizado pôde coagular plasmas (tabela 13) e sangue integral não-anticoagulado (tabela 14) previamente incubado com elevadas concentrações de heparina, demonstrando que o seu efeito em FXa é independente do efeito inibidor mediado por essa droga anticoagulante e, até mesmo na presença de inibidores o tipo de heparina.

Tabela 13

Efeito de TF lipidizado no plasma heparinizado (tempo de coagulação em segundos)

30	Sem TF lipidizado	Com TF lipidizado
	Controle	
	320,4 ± 160	17,2 ± 1

Heparina 3 U/ml > 600 58 ± 12

Tabela 14

Efeito de TF lipidizado no sangue integral heparinizado
(tempo de coagulação em minutos)

5	Sem TF lipidizado	Com TF lipidizado
---	-------------------	-------------------

Controle	3,96 ± 0,54	0,4 ± 0,28
----------	-------------	------------

Heparina 0,25 U/ml	12,45 ± 0,69	15,7 ± 0,22
--------------------	--------------	-------------

Heparina 1 U/ml	26,6 ± 5,76	4,5 ± 2,38
-----------------	-------------	------------

10 3.3. O TF lipidizado coagula o plasma dos animais tratados com varfarina

O TF lipidizado pôde coagular plasmas dos ratos tratados com varfarina depois do procedimento detalhado nos métodos. Os resultados mostrados na tabela 15 indicam que até mesmo quando a síntese de todos os fatores de coagulação dependentes da vitamina K são abolidos, o TF lipidizado pode coagular, demonstrando que o seu efeito em FXa é independente do efeito inibidor mediado por essas drogas anticoagulantes.

Tabela 15

20 Efeito de TF lipidizado no plasma de animais tratados com varfarina (tempo de coagulação em segundos)

Sem TF lipidizado	Com TF lipidizado
-------------------	-------------------

Controle	49 ± 10,2	10,9 ± 2,2
----------	-----------	------------

25 Plasmas tratados com varfarina (0,1 mg/kg por três dias)	60,1 ± 5,6	12,8 ± 3,2
---	------------	------------

3.4. A combinação de TF lipidizado com NCIS intensifica sinergisticamente a coagulação de sangue no plasma dos pacientes com deficiências nos fatores de coagulação FV, FVIII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII e FXIII (ensaios de coagulação em plasmas deficientes em fator de coagulação) e no sangue integral de pacientes hemofílicos

Uma série de ensaios de coagulação in vitro foi executada, mostrando o efeito coagulante de TF lipidizado associado com NCIS no plasma dos pacientes deficientes em fator de coagulação (FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII e FXIII). O dito efeito pró-coagulante excedeu aquele obtido quando o TF lipidizado foi utilizado sozinho como um agente pró-coagulante. Até mesmo a baixas concentrações (1 µg/ml) com as quais o TF lipidizado não podia coagular o plasma deficiente em FV (plasma FV-D), a combinação de ambos os agentes produziu um efeito pró-coagulante significativo. Do mesmo modo, efeitos sinérgicos similares foram obtidos quando o plasma deficiente em FVII (plasma FVII-) foi utilizado. Esses resultados mostram que o efeito mediado pelo TF lipidizado é independente de FVII e pode induzir a coagulação do plasma até mesmo na ausência de FV. Analogamente, a combinação (TF lipidizado + NCIS) também exerceu potentes efeitos pró-coagulantes em amostras do plasma de pacientes hemofílicos (A e B). A tabela 16 mostra os resultados obtidos em cinco experiências independentes.

Tabela 16

Efeito pró-coagulante de rTF associado com NCIS em plasmas deficientes em fator de coagulação

Tempo de coagulação (s)

	Sem rTF	Com rTF		
		-	1 µg/ml	1 µg/ml + NCIS
Plasma normal		281 ± 12,5	11,1 ± 0,2	9,1 ± 0,4*
Plasma FV-D		> 600	84,3 ± 15,2	55,2 ± 2,3*
Plasma FVII-D		> 600	15,5 ± 2,3	10,1 ± 0,5*
Plasma FIX-D		> 600	14,8 ± 3,2	10,3 ± 0,2*
Plasma FX-D		> 600	446,2 ± 32	253,5 ± 19*
Plasma FXI-D		> 600	14,3 ± 0,5	11,5 ± 0,6*
Plasma FXII-D		> 600	16,2 ± 0,3	12,9 ± 1,5*

Plasma FXIII-D	> 600	14,2 ± 0,3	10,8 ± 0,9*
Plasma hemofilia A	> 600	12,2 ± 1,5	10,4 ± 0,9*
Plasma Hemofilia B	> 600	12,1 ± 0,5	10,1 ± 0,8*

Média ± SEM (n = 5); * p < 0,001 sem NCIS versus com NCIS; t-Student.

O efeito pró-coagulante no sangue integral não-anticoagulado da combinação de TF lipidizado e NCIS também foi investigado por meio de ensaios de coagulação utilizando o sangue dos pacientes que sofrem de hemofilia A (três

10 pacientes) e B (três pacientes). Por meio da comparação com os ensaios em que TF lipidizado estava sozinho (tabela 12), o efeito pró-coagulante da associação (rTF + NCIS) foi significativamente (p < 0,001) maior (tabela 17).

Tabela 17

15 Efeito pró-coagulante de rTF em conjunto com NCIS no sangue integral

	Sem NCIS	Com NCIS
Amostra de controle	7,1 ± 0,6	6,0 ± 1,4*
rTF 0,1 µg/ml	1,1 ± 0,9	0,5 ± 0,1*
20	Basal	rTF 0,1 µg/ml
	+ NCIS	
Paciente n° 1 Hemofilia A	13,3	6,8*
Paciente n° 2 Hemofilia A	17,3	7,2*
Paciente n° 3 Hemofilia A	15,3	9,1*
25 Paciente n° 4 Hemofilia B	20,5	8,5*
Paciente n° 5 Hemofilia B	16,3	8,6*

Tempo de coagulação (expresso em minutos): o tempo que o coágulo leva para consolidar em uma amostra de sangue não-anticoagulado.

30 4. Os ensaios in vitro demonstram que o TF lipidizado (sozinho e combinado) causa a coagulação de sangue em indivíduos saudáveis

4.1. O TF lipidizado coagula o plasma e o sangue de indivíduos saudáveis

Uma série em ensaios de coagulação in vitro foi executada, mostrando o efeito coagulante de TF lipidizado no plasma e no sangue integral não-anticoagulado de voluntários saudáveis sem históricos de distúrbios hemostáticos. A tabela 18 mostra os resultados obtidos de cinco experiências independentes em plasmas saudáveis e a tabela 19 no sangue integral não-anticoagulado.

10 Tabela 18

Efeito pró-coagulante de TF lipidizado no plasma de indivíduos saudáveis

Plasma normal	Tempo de coagulação (s)
Basal	281 ± 12,5
15 rTF 0,00001 µg/ml	201 ± 12,2
rTF 0,0001 µg/ml	184 ± 5,8
rTF 0,01 µg/ml	73,5 ± 2,3
rTF 0,1 µg/ml	28,6 ± 0,1
rTF 1 µg/ml	16,4 ± 0,9
20 Média ± SEM (n = 5)	

O TF não lipidizado nas mesmas concentrações não pôde modificar o tempo de coagulação.

Tabela 19

Efeito pró-coagulante do TF no sangue anticoagulado de indivíduos saudáveis

Basal	rTF			
0,01 µg/ml	0,01 µg/ml	1 µg/ml		
Amostra nº 1	5,8	3,3	2,1	1,3
Amostra nº 2	7,2	3,7	2,1	1,0
30 Amostra nº 3	7,2	4,2	2,1	0,9
Amostra nº 4	7,5	3,8	2,0	1,0

4.2 A combinação de TF lipidizado com NCIS intensifica

sinergisticamente a coagulação de sangue no plasma e no sangue de indivíduos saudáveis. Há uma ausência de efeitos sinérgicos quando o TF lipidizado é associado com fosfolipídios.

5 Uma série em ensaios de coagulação in vitro foi executada, mostrando o efeito coagulante do rTF associado com NCIS no plasma de voluntários saudáveis. A tabela 20 mostra os resultados obtidos de cinco experiências independentes. Por meio da comparação com os ensaios em que o rTF estava sozinho, o efeito pró-coagulante da associação (rTF + NCIS) foi significativamente maior ($p < 0,001$) em cada uma das concentrações empregadas.

Tabela 20

15 Efeito pró-coagulante de TF lipidizado associado com NCIS no plasma normal

Plasma normal		Tempo de coagulação (s)	
		Sem NCIS	Com NCIS
	Basal	281,08 $\pm$ 12,5	167 $\pm$ 10*
	rTF 0,0001 μ g/ml	201 $\pm$ 12,2	69 $\pm$ 0,8*
20	rTF 0,0001 μ g/ml	184 $\pm$ 5,8	44,9 $\pm$ 3,2*
	rTF 0,001 μ g/ml	73,5 $\pm$ 2,3	30,6 $\pm$ 2,5*
	rTF 0,1 μ g/ml	28,6 $\pm$ 0,1	16 $\pm$ 4,2*
	rTF 1 μ g/ml	16,4 $\pm$ 0,9	12,8 $\pm$ 0,5*

25 Média $\pm$ SEM (n = 5); *p < 0,001 sem NCIS versus com NCIS; t-Student.

A tabela 21 mostra a ausência de efeitos sinérgicos quando o TF lipidizado é associado com fosfolipídios. (0,66 mM de PC/PS; fosfatidil colina/fosfatidil serina a uma razão molar diferente).

30 Tabela 21

Efeito de fosfolipídios lipidizados sobre a atividade pró-coagulante de TF

TF lipidizado (0,1 µg/ml)		Tempo de coagulação (s)
Sem PC/PS		37,9
Sem PC/PS 90/10		44
80/20		39,7
5	70/30	41,7
	60/40	40,1
	50/50	43,5
	40/60	34,6
	30/70	41,5
10	20/80	44,3
	10/90	41,9

5. Os ensaios in vitro demonstram o efeito coagulante de TF lipidizado (sozinho e combinado) no sangue dos pacientes com distúrbios de plaquetas congênitos e adquiridos (trombocitopênicos).

5.1. O TF lipidizado coagula o sangue integral de pacientes com distúrbios de plaquetas congênitos

O efeito pró-coagulante de TF lipidizado na coagulação do sangue nos pacientes com distúrbios de plaquetas foi investigado por meio de ensaios de coagulação utilizando o sangue de dois pacientes que sofrem de mal de Glanzmann e da síndrome de Bernard Soulier. O rTF pôde acelerar de uma maneira muito significativa, e de uma maneira dependente da concentração, a coagulação de sangue nos indivíduos que sofrem do mal de Glanzmann e da síndrome de Bernard Soulier (tabela 22); o rTF é, portanto, um agente útil para o tratamento anti-hemorrágico dos ditos indivíduos.

Tabela 22

Efeito pró-coagulante do TF nos pacientes com distúrbios de plaquetas

	Basal	rTF
	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml 1 µg/ml

	Amostra de controle n° 1	5,8	3,3
	2,1 1,3		
	Paciente n° 6 mal de Glanzmann	13,6	7,3
	3,4 2,9		
5	Paciente n° 7 Síndrome de Bernard-Soulier	11,9	7,1
	4,1 3,1		

5.2. A combinação de TF lipidizado com NCIS aumenta a coagulação no sangue integral de pacientes com distúrbios de plaquetas congênitos

10 Uma série de ensaios de coagulação in vitro foi executada, mostrando o efeito coagulante do rTF associado com NCIS no sangue integral de pacientes com distúrbios de plaquetas congênitos. A tabela 23 mostra os resultados obtidos de dois pacientes com mal de Glanzmann e Síndrome de

15 Bernard-Soulier. Por meio da comparação com os ensaios em que o rTF estava sozinho, o efeito pró-coagulante da associação (rTF + NCIS) foi significativamente maior ($p < 0,001$) em cada paciente.

Tabela 23

20 Efeito pró-coagulante do rTF em conjunto com NCIS no sangue integral

	Sem NCIS	Com NCIS
Amostra de controle	7,1 $\pm$ 0,6	6,0 $\pm$ 1,4*
rTF 0,1 μ g/ml	1,1 $\pm$ 0,9	0,5 $\pm$ 0,1*
25 Basal rTF 0,1 g/ml + NCIS		
Paciente n° 6 mal de Glanzmann	13,6	
4,7		
Paciente n° 7 Síndrome de Bernard-Soulier	11,9	
4,6		

30 Tempo de coagulação (expresso em minutos): o tempo que o coágulo leva para consolidar em uma amostra de sangue não-anticoagulado. * $p < 0,001$ sem NCIS versus com NCIS. t-

Student.

5.3. O TF lipidizado coagula amostras trombocitopênicas

Uma série de ensaios de coagulação in vitro foi executada, mostrando o efeito coagulante de TF lipidizado nos plasmas com contagem de plaquetas diferentes. A tabela 24 mostra os resultados obtidos da contagem de plaquetas normal para as condições trombocitopênicas.

Tabela 24

Efeito de TF lipidizado em amostras trombocitopênicas

10	Contagem de plaquetas lipidizado (1 µg/ml)	Sem TF lipidizado	Com TF
	350.000 µ/l	226,3	21,9
	150.000 µ/l	232,6	22,8
	50.000 µ/l	253,9	22,4
15	9.000 µ/l	321,2	21,3
	< 1.000 µ/l	> 400	21,3

6. Os ensaios de vivo que demonstram que o TF é um agente útil para o tratamento anti-hemorrágico tópico em ratos de controle (mediante a aplicação direta no vaso sanguíneo previamente seccionado)

6.1. O TF lipidizado é útil como um agente hemostático tópico em um modelo animal de hemorragia grave pela seção proximal das caudas de ratos

Os ensaios in vivo foram executados, mostrando que o TF lipidizado administrado sozinho ou associado com NCIS é um agente útil para o tratamento anti-hemorrágico tópico. O uso de TF lipidizado como um agente hemostático tópico administrado sozinho ou combinado com NCIS foi avaliado por meio do uso de uma hemorragia grave em um modelo animal pela seção proximal das caudas de ratos. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 25. Conforme pode ser observado, no dito modelo de hemorragia grave, a hemorragia coagulou

espontaneamente nos animais de controle (PSS Controle, tratados com uma solução salina fisiológica) a $18,1 \pm 5,98$ minutos; no entanto, a administração tópica de rTF lipidizado rtf (sozinho) produziu uma redução significativa ($11,1 \pm 5,54$ minutos, $p < 0,001$). Quando o rTF foi administrado em combinação com NCIS, o efeito pró-coagulante foi ainda maior ($5,0 \pm 1,1$ minutos; $p < 0,001$).

Tabela 25

Modelo de hemorragia grave pela seção proximal das caudas de
10 ratos

Tempo de coagulação do sangramento		
Grupo de Solução Salina de Controle (n = 14)	18,16	$\pm 5,98$
15 Grupo tratado com TF lipidizado (n = 5)	11,1	$\pm 5,5$
TF lipidizado + NCIS (n = 4)	5,0	$\pm 1,1$

Os resultados são expressos como o tempo em minutos para atingir a coagulação consolidada.

Sob as mesmas condições experimentais, o TF não-lipidizado (n = 3) foi avaliado. Nenhum efeito foi observado e o tempo de coagulação do sangramento era similar àquele dos animais de controle. Esses resultados indicam que o TF não-lipidizado não era útil no tratamento de episódios de sangramento tópico.

25 6.2 O TF lipidizado é útil como um agente hemostático tópico em um modelo animal de hemorragia grave tratado previamente com heparina ou varfarina

Os ensaios in vivo foram executados, mostrando que o TF lipidizado administrado sozinho é um agente útil para o
30 tratamento antihemorrágico tópico em condições anticoagulantes (tabela 25). O uso de TF lipidizado como um agente hemostático tópico administrado sozinho foi avaliado

por meio do uso de uma hemorragia grave em um modelo animal pela seção proximal das caudas de ratos tratadas previamente com 200 U/Kg de heparina i.v. quinze minutos antes de começar o procedimento de transecção das caudas, ou com 0,1 mg/kg/dia de varfarina oralmente durante três dias antes de começar o procedimento de transecção das caudas. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 26. Conforme pode ser observado, no dito modelo de hemorragia grave, o grupo de solução salina de controle, tratado com a solução salina fisiológica, coagulou espontaneamente em $18,1 \pm 5,98$ minutos. A hemorragia do grupo de controle tratado com heparina não coagulou espontaneamente (> 90 minutos). O grupo de controle tratado com varfarina coagulou espontaneamente em $41,6 \pm 8,5$ minutos. A tabela 26 mostra que a administração tópica de TF lipidizado (sozinho) produziu uma redução significativa em todos os grupos de tratamento.

Tabela 26

Modelo de hemorragia grave pela seção proximal das caudas de ratos em animais tratados anticoagulados

Tempo de coagulação do sangramento

	Tempo de coagulação do sangramento (min)	
Grupo de solução salina de controle (n = 14)	$18,16 \pm 5,98$	
Grupo de controle tratado com heparina (n = 5)	> 90	
Grupo de controle tratado com varfarina (n = 2)	$41,6 \pm 8,5$	
Grupo tratado com heparina (n = 3) + TF lipidizado	$26,3 \pm 2,5$	

Os resultados são expressos como o tempo em minutos para atingir a coagulação consolidada.

6.3. O TF lipidizado é útil como um agente hemostático tópico em um modelo animal de hemorragia letal pela perfuração na

artéria carótida

Os ensaios in vivo foram executados, mostrando que o rTF administrado sozinho é um agente útil para o tratamento anti-hemorrágico tópico aplicado diretamente no vaso sangüíneo. O uso do rTF administrado sozinho foi avaliado por meio do uso de uma hemorragia letal em um modelo animal pela perfuração na artéria carótida. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 27 e foram muito significativos. Conforme pode ser observado, no grupo de animais de controle, (PSS Controle, tratados com a solução salina fisiológica), todos os animais morreram de sangramento, ao passo que no grupo de TF lipidizado nenhum animal morreu e a seção pôde ser vedada e coagulada com sucesso em todos os casos. O tratamento foi eficaz em termos do tempo necessário para atingir a coagulação e a vedação estáveis do ferimento da perfuração.

Tabela 27

Modelo de hemorragia letal pela perfuração na artéria carótida de ratos

	SF de Controle		rTF	
20	Animal n° 1	Morte	Animal n° 3	125
	Animal n° 2	Morte	Animal n° 4	135
	Média ± Desvio Padrão			130 ± 7,1

Os resultados são expressos como o tempo em segundos para atingir a coagulação consolidada e a vedação do ferimento da perfuração. O rTF é administrado tal como indicado no texto na dose de 2 µg de proteína ativa).

Em conclusão:

Os resultados do Exemplo número 1 demonstram claramente que:

1) Na ausência de seu ligando, FVII, o TF lipidizado pode interagir diretamente com o FXa, aumentando significativamente a sua atividade proteolítica (tanto amidolítica quanto de formação de trombina), este resultado mostra pela primeira vez um novo papel para o TF lipidizado,

agindo como um novo co-fator para FXa (independente do FVa bem conhecido).

2) O TF lipidizado pode coagular plasmas defeituosos em FVII. Portanto, o TF lipidizado é uma boa alternativa para o tratamento desses pacientes (atualmente o único tratamento é o FVIIa recombinante humano dispendioso).

3) O TF lipidizado age sinergisticamente com NCIS e FXa (a baixas concentrações sem poder produzir a coagulação).

Os resultados do Exemplo número 2 demonstram claramente que:

1) O TF lipidizado faz com que as concentrações de FXa fisiológico, que não podem produzir nenhum efeito pró-coagulante significativo, ativem a hidrólise da protrombina e, conseqüentemente, ocorre a formação de trombina.

2) O TF lipidizado tem um novo papel agindo como um co-fator para todas as atividades proteolíticas de todas as formas de FXa (solúveis e ligadas ao complexo de protrombinase).

3) Até mesmo os plasmas defeituosos em FX (que contêm resquícios de FX) podem ser coagulados pelo TF lipidizado. Portanto, o TF lipidizado é uma boa alternativa para o tratamento desses pacientes.

4) O TF lipidizado age sinergisticamente com NCIS no efeito da estimulação da atividade de FXa.

Os resultados do Exemplo número 3 demonstram claramente que:

1) O TF lipidizado pode causar a coagulação de sangue nos pacientes hemofílicos (FVIII, FIX e FXI). Portanto, o TF lipidizado é uma boa alternativa para o tratamento desses pacientes.

2) O TF lipidizado pode causar a coagulação de sangue até mesmo na ausência de FV. Esses resultados mostram claramente

que o TF lipidizado causa um forte efeito estimulador em FXa, porque na ausência de seu co-fator (plasmas deficientes em FV), o TF lipidizado age como co-fator, causando o mesmo efeito estimulador.

3) O TF lipidizado pode causar a coagulação de sangue até mesmo nos plasmas defeituosos em FX (que contêm resquícios de FX). Portanto, o TF lipidizado é uma alternativa para o tratamento desses pacientes.

5 4) O TF lipidizado pode causar a coagulação de sangue nos plasmas tratados com heparina e varfarina, indicando que o TF lipidizado interfere no efeito da antitrombina III e provavelmente embora o seu efeito estimulador em concentrações basais pode coagular até mesmo em condições
10 tratadas com varfarina.

5) Finalmente, o TF lipidizado age sinergisticamente com NCIS no efeito pró-coagulante observado em todas as deficiências do fator de coagulação.

Os resultados do Exemplo número 4 demonstram claramente que:

15 1) O TF lipidizado pode causar a coagulação de sangue em indivíduos saudáveis. Portanto, o TF lipidizado é uma boa alternativa para o tratamento de episódios de sangramento em indivíduos saudáveis.

2) O TF lipidizado age sinergisticamente com NCIS mas não
20 apenas com os fosfolipídios no efeito pró-coagulante observado em indivíduos saudáveis.

Os resultados do Exemplo número 5 demonstram claramente que:

1) O TF lipidizado pode causar a coagulação de sangue nos pacientes com distúrbios de plaquetas, tais como congênitos e
25 adquiridos (isto é, a trombocitopenia). Portanto, o TF lipidizado é uma boa alternativa para o tratamento de episódios de sangramento nos pacientes com alterações do número de plaquetas e/ou da funcionalidade.

Os resultados do Exemplo número 6 demonstram claramente que:

30 1) O TF lipidizado administrado topicamente pode parar o sangramento em um modelo animal de hemorragia grave (transecção total proximal da cauda).

2) O TF lipidizado administrado topicamente pode parar o

sangramento em um modelo animal de hemorragia grave (transecção total proximal da cauda) complicada com terapia anticoagulante (heparina ou varfarina).

3) O TF lipidizado administrado topicamente pode parar o
5 sangramento em um modelo animal de hemorragia letal (perfuração na artéria carótida).

REIVINDICAÇÕES

1. USO DE FATOR DE TECIDO (TF) LIPIDADO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO, caracterizado pelo fato de servir na manufatura de um medicamento para o tratamento
5 tópico de hemorragias em um indivíduo.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito indivíduo é um indivíduo saudável ou um indivíduo com uma diátese hemorrágica, onde a dita diátese hemorrágica compreende uma
10 coagulopatia e/ou um distúrbio de plaqueta.

3. USO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a dita coagulopatia é uma coagulopatia congênita ou uma coagulopatia adquirida.

4. USO, de acordo com a reivindicação 3,
15 caracterizado pelo fato de que a dita coagulopatia congênita é uma coagulopatia baseada em uma deficiência de um fator de coagulação escolhido entre o fator de coagulação V, o fator de coagulação VII, o fator de coagulação VIII, o fator de coagulação IX, o fator de coagulação X, o fator de coagulação
20 XI, o fator de coagulação XII, o fator de coagulação XIII, e as combinações destes.

5. USO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o dito indivíduo tem uma coagulopatia adquirida produzida por um tratamento
25 anticoagulante com anticoagulantes.

6. USO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que os anticoagulantes consistem em heparina, heparinas de baixo peso molecular, warfarina, derivados de cumarina ou dicumarinas.

7. USO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o dito indivíduo tem um distúrbio de plaquetas congênito ou adquirido.

8. USO, de acordo com a reivindicação 7,

caracterizado pelo fato de que o dito distúrbio de plaquetas congênito é selecionado entre o mal de Glanzmann, a síndrome de Bernard Soulier, a síndrome de Bolin-Jamieson, a síndrome de Wiskott-Aldrich, a síndrome de Paris-Trousseau-Jacobsen, a trombocitopenia do cromossoma X, a síndrome de plaquetas de Grey, a síndrome de Sebastian e a anemia de Fanconi.

9. USO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o dito distúrbio de plaquetas adquirido é selecionado entre um distúrbio mieloproliferativo, tal como o trombocitemia, policitemia, ou leucemia mielocítica crônica; metaplasia mielóide; disproteinemias em escorbuto, em doença cardíaca congênita e em cirrose.

10. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito lipídado TF é TF humano lipídado.

11. PRODUTO, caracterizado pelo fato de compreender (i) TF lipídado e (ii) fator X de coagulação (FXa) ativado separadamente ou como uma combinação para a sua administração simultânea ou sucessiva a um indivíduo.

12. PRODUTO, caracterizado pelo fato de compreender (i) TF lipídado e (ii) uma superfície inorgânica carregada negativamente (NCIS) separadamente ou como uma combinação para a sua administração simultânea ou sucessiva a um indivíduo.

13. PRODUTO, caracterizado pelo fato de compreender (i) TF lipídado, (ii) Fxa, e (iii) NCIS separadamente ou como uma combinação para a sua administração simultânea ou sucessiva a um indivíduo.

14. PRODUTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado pelo fato de que o dito TF lipídado é TF humano lipídado.

15. PRODUTO, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 11 a 14, caracterizado pelo fato de ser um medicamento.

5 16. USO DE UM PRODUTO, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 11 a 14, caracterizado pelo fato de servir para a manufatura de um medicamento para o tratamento de hemorragias em um indivíduo.

10 17. USO DE UM PRODUTO, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 11 a 14, caracterizado pelo fato de servir para a manufatura de um medicamento para o tratamento tópico de hemorragias em um indivíduo.

18. COMPLEXO (TF::FXa), caracterizado pelo fato de compreender TF lipidado e FXa.

19. COMPLEXO TF::NCIS, caracterizado pelo fato de compreender TF lipidado e NCIS.

15 20. COMPLEXO TF::FXa:NCIS, caracterizado pelo fato de compreender TF lipidado, FXa e NCIS.

21. COMPLEXO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 18 a 20, caracterizado pelo fato de ser um medicamento.

20 22. USO DE UM COMPLEXO, conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 18 a 20, caracterizado pelo fato de servir para a manufatura de um medicamento para o tratamento de hemorragias em um indivíduo.

25 23. USO DE UM COMPLEXO, conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 18 a 20, caracterizado pelo fato de servir para a manufatura de um medicamento para o tratamento tópico de hemorragias em um indivíduo.

24. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada pelo fato de compreender:

30 a) um produto de acordo com a reivindicação 11, conjuntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável; ou

b) separadamente, (i) TF lipidado conjuntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável, e (ii) FXa

conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

c) um produto de acordo com a reivindicação 12, conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

d) separadamente, (i) TF lipidado conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável, e (ii) NCIS conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

e) um produto de acordo com a reivindicação 13, conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

f) separadamente, (i) TF lipidado conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável, (ii) FXa conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável, e (iii) NCIS conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

g) um complexo de TF::FXa, de acordo com a reivindicação 18, conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

h) um complexo de TF::NCIS, de acordo com a reivindicação 19, conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável; ou

i) um complexo de TF::FXa::NCIS, de acordo com a reivindicação 20, conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável.

25. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de se apresentar em uma forma de administração farmacêutica para a sua administração tópica.

26. PRODUTO, caracterizado pelo fato de compreender uma composição farmacêutica conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 24 a 25 e um suporte.

27. PRODUTO, caracterizado pelo fato de compreender uma composição farmacêutica que compreende:

(i) um suporte, (ii) um produto de acordo com a reivindicação 11, conjuntamente com um veículo

farmaceuticamente aceitável, (iii) um produto de acordo com a reivindicação 12, conjuntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável e (iv) um produto de acordo com a reivindicação 13, conjuntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável; ou

um complexo de TF::FXa de acordo com a reivindicação 18, conjuntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável, ou

um complexo de TF::NCIS de acordo com a reivindicação 19, conjuntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável, ou

um complexo de TF::FXa::NCIS de acordo com a reivindicação 20, conjuntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável.

28. USO DE TF NÃO-LIPIDADO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO, caracterizado pelo fato de servir para a manufatura de um medicamento para o tratamento de hemorragias em um indivíduo com deficiência no fator de coagulação VII.

29. USO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de servir para a manufatura de um medicamento para a administração parenteral de TF não-lipidado ou um fragmento do mesmo.

Concentrações de FXa e formação basal de coágulo de fibrina

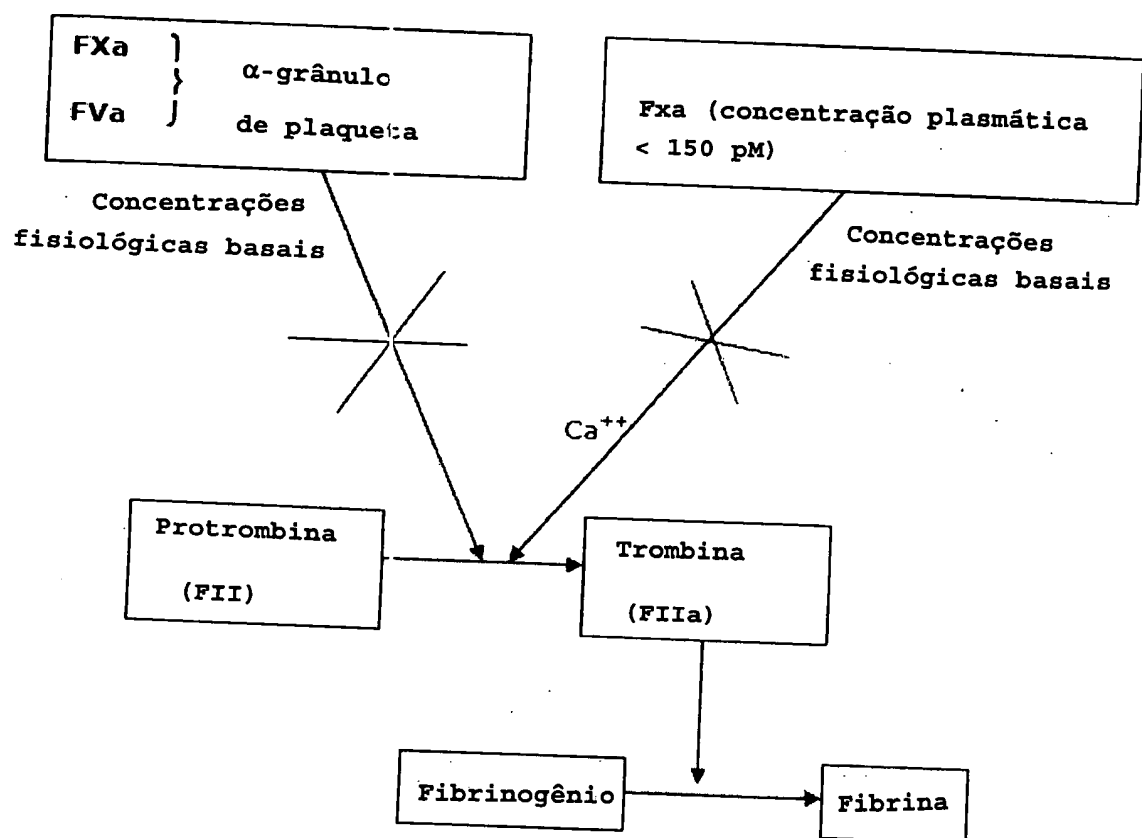


Fig. 1

Passagens intrínsecas e extrínsecas clássicas

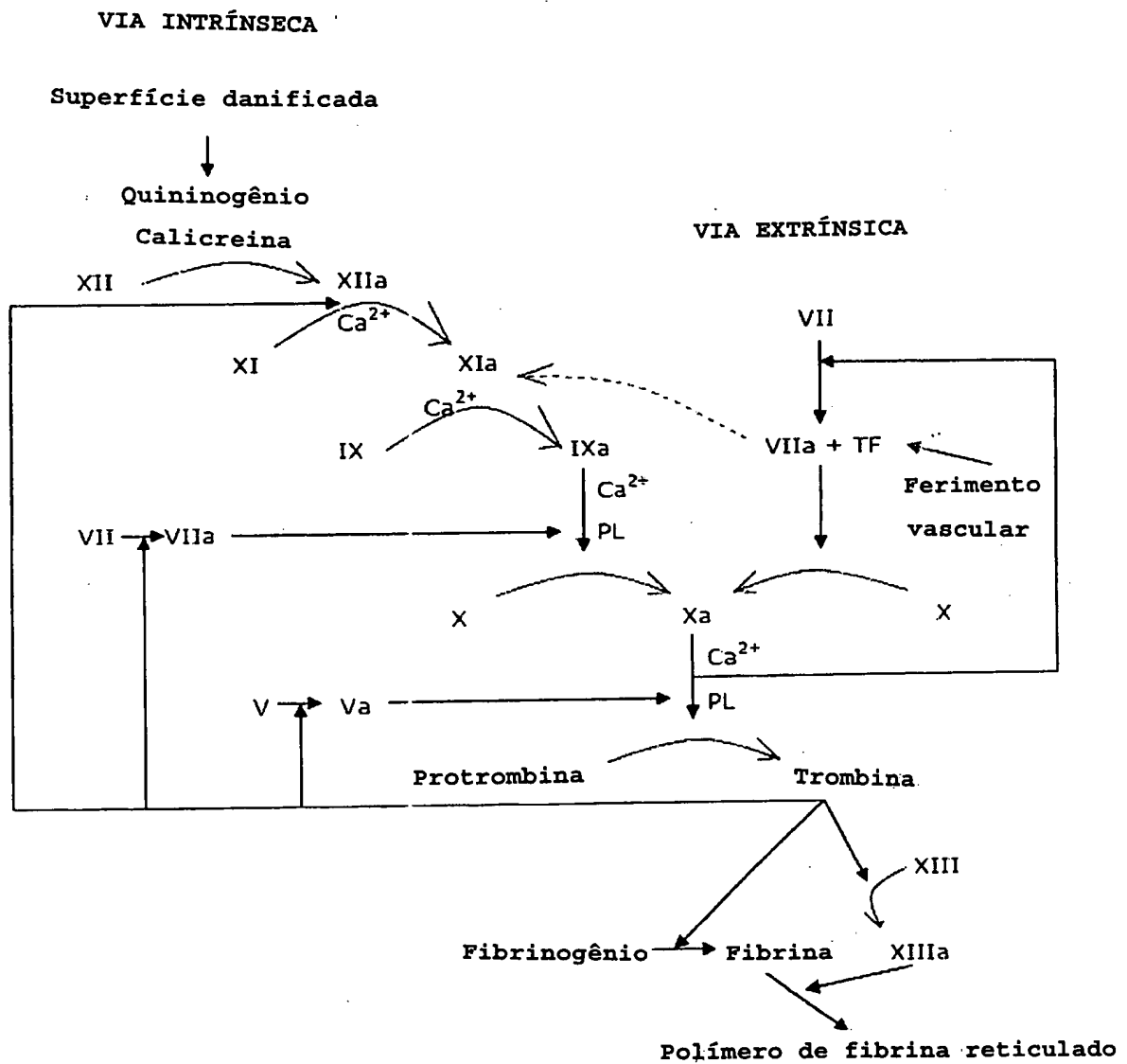
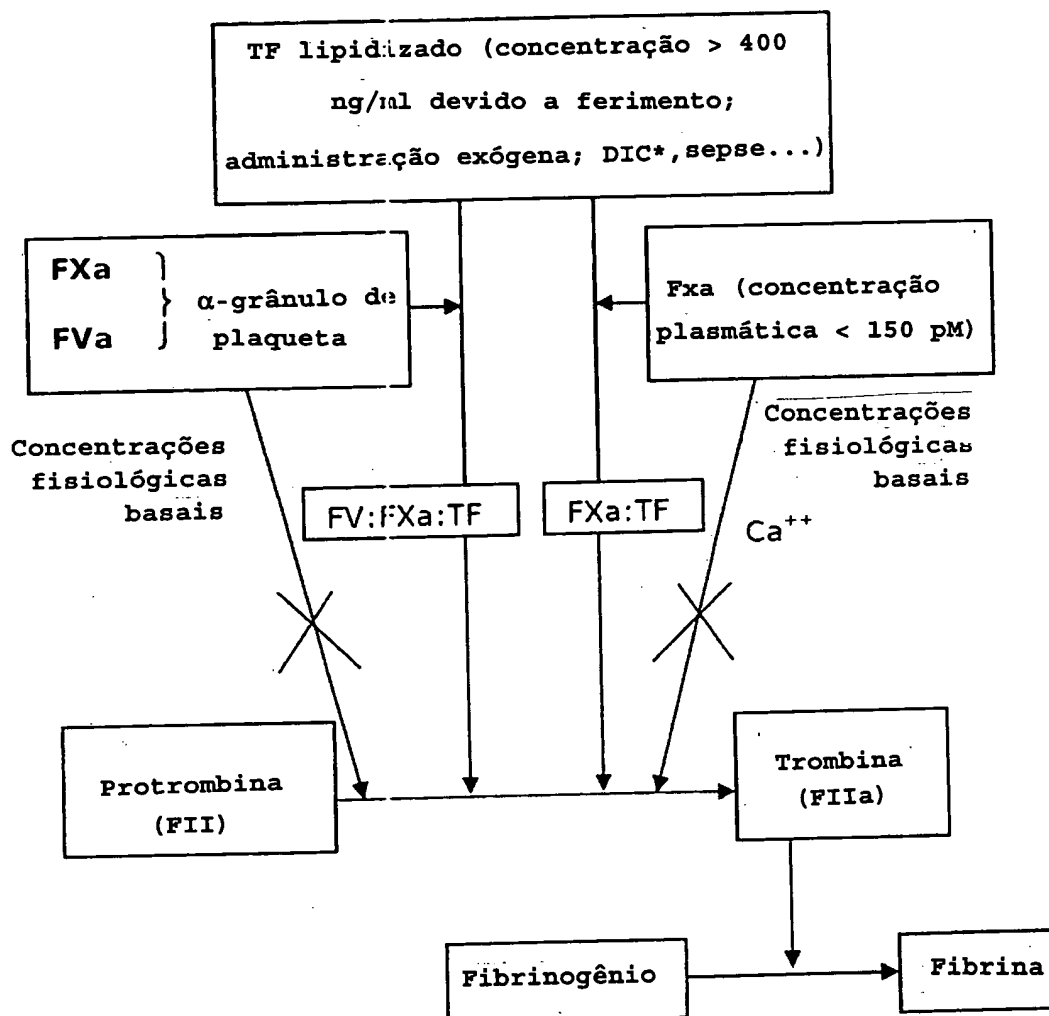


Fig. 2

Novo efeito regulador de TF lipidizado como estimulador de Fxa.



*DIC: Coagulação Intravascular Disseminada

Fig. 3

RESUMO

USO DE FATOR DE TECIDO (TF) LIPIDADO OU UM
FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO, PRODUTO, USO DE UM PRODUTO,
COMPLEXO (TF::FXa), USO DE UM COMPLEXO, COMPLEXO TF::NCIS,
5 COMPLEXO TF::FXa:NCIS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE TF
NÃO-LIPIDADO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO

Agentes estimuladores do fator de coagulação X
(FXa) ativado podem ser utilizados no tratamento de
hemorragias em um indivíduo. São descritos compostos e
10 combinações que são particularmente úteis para o tratamento
tópico de hemorragias em indivíduos saudáveis ou nos
pacientes com diatese hemorrágica.