

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 104**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/37 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06754405 .6**
96 Fecha de presentación: **16.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1902141**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2008**

54 Título: **Composiciones con actividad trombolítica que comprenden ADAMTS13**

30 Prioridad:
17.06.2005 US 691927 P
21.10.2005 US 729323 P
07.02.2006 US 771265 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.06.2012

73 Titular/es:
**BAXTER INTERNATIONAL INC.
ONE BAXTER PARKWAY
DEERFIELD, ILLINOIS 60015, US;
BAXTER HEALTHCARE SA y
CBR INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH**

72 Inventor/es:
**WAGNER, Denisa;
CHAUHAN, Anil, Kumar;
SCHEIFLINGER, Friedrich y
PLAIMAUER, Barbara**

74 Agente/Representante:
Aznárez Urbieto, Pablo

ES 2 382 104 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones con actividad trombolítica que comprenden ADAMTS13.

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que tienen actividad trombolítica que comprenden una cantidad farmacéutica efectiva de una molécula quimérica que incluye ADAMTS13 e Ig, a la utilización de dicha molécula quimérica para tratar o prevenir trastornos asociados a la formación y/o a la presencia de uno o más trombos, así como para desintegrar uno o más trombos en un paciente que lo necesita.

La púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) es un trastorno caracterizado por microangiopatía trombótica, trombocitopenia y trombosis microvascular, que puede provocar varios grados de isquemia o infarto tisular. Clínicamente, los pacientes de PTT son diagnosticados por síntomas como trombocitopenia, esquistocitos (fragmentos de eritrocitos) y altos niveles de lactato-deshidrogenasa (Moake JL., *Thrombotic microangiopathies*, *N Engl J Med.* 2002; 347:589-600; Moake JL. von Willebrand factor, ADAMTS-13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol.*, 2004; 41: 4-14; Sadler JE, Moake JL, Miyata T, George JN., Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2004: 407-423; Sadler JE., New concepts in von Willebrand disease, *Annu Rev Med.* 2005; 56: 173-191). En 1982, Moake y col. descubrieron multímeros del factor von Willebrand (UL-vWF) anormalmente grandes en el plasma de pacientes con PTT crónica recurrente (Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein MJ, Colannino NM, Azocar J, Seder RH, Hong SL, Deykin D., Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura, *N Engl J Med.* 1982; 307: 1432-1435). El vínculo entre el vWF-UL y la PTT se vio apoyado por los descubrimientos independientes de Furlan y col., así como de Tsai y Lian, de que la mayoría de los pacientes que padecen PTT carecen de la metaloproteasa plasmática que segmenta el vWF (Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Laemmle B., Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura, *Blood.* 1997; 89:3097-3103; Tsai HM, Sussman, II, Ginsburg D, Lankhof H, Sixma JJ, Nagel RL., Proteolytic cleavage of recombinant type 2A von Willebrand factor mutants R834W and R834Q: inhibition by doxycycline and by monoclonal antibody VP-1. *Blood.* 1997; 89: 1954-1962; Tsai HM, Lian EC., Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura, *N Engl J Med.* 1998; 339: 1585-1594). La proteasa pertenece a la familia ADAMTS y se denomina ADAMTS13 (**A** **D**isintegrin-like **A**nd **M**etalloprotease with **T**hrombospondin type I repeats - Desintegrina y Metaloproteasa con Repeticiones de Trombospondina Tipo I), proteína glicosilada de 190 kDa producida predominantemente por el hígado (Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R, Sarode R, Shurin SB, Chandrasekaran V, Stabler SP, Sabio H, Bouhassira EE, Upshaw JD, Jr., Ginsburg D, Tsai HM., Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura, *Nature.* 2001; 413:488-494; Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D., Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family, *Blood.* 2001; 98: 1662-1666; Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K., Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura, *J Biol Chem.* 2001; 276: 41059-41063; Soejima K, Mimura N, Hirashima M, Maeda H, Hamamoto T, Nakagaki T, Nozaki C., A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J. Biochem (Tokyo).* 2001; 130: 475-480; Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M., Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease, *Blood.* 2001; 98: 1654-1661). Se ha demostrado que mutaciones en el gen ADAMTS13 provocan PTT (Levey GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R, Sarode R, Shurin SB, Chandrasekaran V, Stabler SP, Sabio H, Bouhassira EE, Upshaw JD, Jr., Ginsburg D, Tsai HM., Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura, *Nature* 2001; 413: 488-494). La PTT idiopática, a menudo causada por autoanticuerpos que inhiben la actividad de ADAMTS-13, es un trastorno muy común que aparece en adultos y al final de la adolescencia y puede ser recurrente a intervalos regulares en el 11-36% de los pacientes (Tsai HM, Lian EC., Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura, *N Engl J Med.* 1998; 339: 1585-1594; Furlan M, Lammie B., Deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in familial and acquired thrombotic thrombocytopenic purpura, *Baillieres Clin Haematol.* 1998; 11:509-514). Los autoanticuerpos no neutralizantes también podrían inhibir la actividad de ADAMTS induciendo su eliminación de la circulación (Scheiflinger F, Knobl P, Trattner B, Ptaimauer B, Mohr G, Dockal M, Dorner F, Rieger M., Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura, *Blood.* 2003; 102:3241-3243). La actividad de ADAMTS13 en plasma en adultos sanos oscila entre el 50% y el 178% (Moake JL., *Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome*, *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126:1430-1433). En la mayoría de los pacientes con PTT familiar o adquirida, la actividad de ADAMTS13 en plasma está ausente o es inferior al 5% de la normal. Sin tratamiento, el coeficiente de mortalidad supera el 90%, pero la terapia de plasma ha reducido la mortalidad al 20% aproximadamente (Moake. JL., *Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome*, *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126: 1430-1433).

El vWF sintetizado en megacariocitos y células endoteliales se almacena en los gránulos alfa plaquetarios y en los cuerpos de Weibel-Palade, respectivamente, como vWF extragrande (vWF-UL) 5 (Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein My, Colannino NM, Azocar J. Seder RH, Hong SL, Deykin D., Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura, *N. Engl J Med.* 1982; 307: 1432-1435; Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ., Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells, *J Cell Biol.* 1982; 95: 355-360; Wagner DD, Bonfanti R. von Willebrand factor and the endothelium, *Mayo Clin Proc.* 1991; 66: 621-627; Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD., Von Willebrand factor released

from Weibel-Palade bodies binds more avidly to extra-cellular matrix than that secreted constitutively, *Blood*. 1987; 69: 1531-1534; Tsai HM, Nagel RL, Hatcher VB, Sussman, II. Endothelial cell-derived high molecular weight von Willebrand factor is converted into the plasma multimer pattern by granulocyte proteases, *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 158: 980-985; Tsai HM, Nagel RL, Hatcher VB, Sussman, II., Multimeric composition of endothelial cell-derived von Willebrand factor, *Blood*. 1989; 73: 2074-2076). Una vez secretados de las células endoteliales, estos multímeros de vWF-UL son segmentados por ADAMTS13 en circulación en una serie de multímeros más pequeños en sitios de clivaje específicos dentro de la molécula de vWF (Tsai HM, Nagel RL, Hatcher VB, Sussman, II., Endothelial cell-derived high molecular weight von Willebrand factor is converted into the plasma multimer pattern by granulocyte proteases, *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 158: 980-985; Dent JA, Galbusera M, Ruggeri ZM., Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit, *J Clin Invest*. 1991; 88: 774-782; Furlan M, Robles R, Affolter D, Meyer D, Bailod P, Lammie B., Triplet structure of von Willebrand factor reflects proteolytic degradation of high molecular weight multimers, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; 90: 7503-7507). La proteasa se cliva en la unión Tyr842-Met843 del dominio A2 central de la subunidad madura del vWF y requiere zinc o calcio para su actividad (Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, Kasper CK, Ruggeri ZM., Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 6306-6310). El vWF aparece en forma de "ovillo" y filamentosa tal como se observa por microscopía electrónica (Slayter H, Loscalzo J, Bockenstedt P, Handin RI., Native conformation of human von Willebrand protein. Analysis by electron microscopy and quasi-elastic light scattering, *J Biol Chem*. 1985; 260: 8559-8563). Además, la microscopía de fuerza atómica confirma que el vWF existe en una conformación globular en condiciones estáticas y en un estado filamentoso desplegado después de un estrés de cizalladura (Stedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE., Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor, *Blood* 1996; 88:2939-2950). Esto también podría producirse *in vivo* cuando un extremo del filamento de vWF está anclado a una superficie.

Los multímeros de vWF-UL presentes en los cuerpos de Weibel-Palade, se unen más estrechamente (a través de GPIIb) que el vWF plasmático cuando son liberados por las células endoteliales activadas (27. Arya M, Anvari B, Romo GM, Cruz MA, Dong JF, McIntire LV, Moake JL, Lopez JA., Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers, *Blood* 2002; 99:3971-397). Se ha demostrado *in vitro* que las plaquetas se alinean como perlas sobre el vWF-UL liberado de la superficie endotelial (Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, Lopez JA., ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions, *Blood* 2002; 100:4033-4039). Estos multímeros secretados por vWF-UL están anclados en la superficie celular como estructuras de tipo hebra larga. Estos multímeros son clivados después por ADAMTS13 a medida que son secretados de las células endoteliales estimuladas (Dong JF, Moake JL, Bernardo A, Fujikawa K, Ball C, Nolasco L, Lopez JA, Cruz MA., ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor, *J Biol Chem*. 2003; 278: 29633-29639).

Los trombos de los pacientes de PTT están compuestos por poca fibrina y principalmente por vWF y plaquetas, lo que sugiere una agregación plaquetaria mediada por vWF como causa de la trombosis (30. Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J, Kaketani K., Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special referencia to factor VIII related antigen, *Thromb Res*. 1985; 38: 469-479). Los pacientes con PTT recurrente presentan multímeros extragrandes en plasma. Los multímeros de vWF-UL se acumulan con el tiempo debido a que la persistencia del inhibidor (Anti-ADAMTS13 Ab) reduce la actividad de ADAMTS13. Los multímeros de vWF-UL son hiperactivos y se despliegan como consecuencia del esfuerzo cortante que provoca la agregación plaquetaria, resultando en trombosis intravascular (Tsai HM., Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura, *J Mol Med*. 2002; 80: 639-647; Tsai HM., Deficiency of ADAMTS-13 in thrombotic and thrombocytopenic purpura, *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 2038-2040; discussion 2040-2035).

En este contexto, el documento US-A-2003/0073116 describe formas de tipo salvaje, así como mutantes y variantes de la proteasa ADAMTS13, un método para tratar pacientes que sufren de púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y un método para investigar la presencia de PTT mediante dicha proteasa.

Además, el documento EP-A-1 568 782 describe métodos diagnósticos basados en la detección de ADAMTS13, así como composiciones terapéuticas que la comprenden.

Además, Antoine G. y col. (*British Journal of Hematology*, 120(5), Marzo 2005, pp. 821-824) describen la identificación de formas mutantes del gen ADAMTS13 vinculadas a la PTT hereditaria, así como un método para tratar la PTT hereditaria mediante la administración de la proteasa ADAMTS13 a los pacientes.

Además, Fujikawa, K. y col. (*Blood*, 98(6), septiembre 2001, pp. 1662-1666) describen la identificación de una proteasa que cliva el factor von Willebrand (vWF) como un nuevo miembro de la familia de las metaloproteasas ADAMTS.

Finalmente, Plaimauer, B. y col. (*Blood*, 100(10), noviembre 2002, pp. 3626-3632) analizan la actividad funcional de ADAMTS13 y demuestran que dicha proteasa es responsable de la degradación proteolítica fisiológica de los multímeros de vWF.

Se cree que la presencia de multímeros de vWF-UL hiperreactivos en plasma debido a la deficiencia de ADAMTS13 podría asociarse a un mayor riesgo de trombosis arterial asociada a la enfermedad coronaria del corazón.

Por tanto, existe una gran necesidad de proporcionar nuevas composiciones capaces de prevenir y/o tratar los trombos causados por determinados trastornos en un paciente.

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica con actividad trombolítica. La composición farmacéutica comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de una molécula quimérica que comprende ADAMTS13 así como Ig y opcionalmente uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Dicha composición puede comprender también uno o varios ingredientes activos adicionales. Además, la presente invención se puede utilizar en un método para tratar o prevenir un trastorno asociado a la formación y/o presencia de uno o varios trombos y en un método para desintegrar uno o varios trombos en un paciente que lo necesita. Ejemplos de trastornos asociados a la formación y/o a la presencia de uno o varios trombos son púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) hereditaria, PTT adquirida, trombosis arterial, infarto agudo de miocardio (AMI), derrame cerebral, sepsis y coagulación intravascular diseminada (DIC). Así, se puede utilizar una cantidad farmacéuticamente efectiva de una molécula quimérica que comprende ADAMTS13 e Ig para tratar o prevenir un trastorno asociado a la formación y/o presencia de uno o varios trombos y para desintegrar uno o varios trombos en un paciente que lo necesita. Dicha cantidad farmacéuticamente efectiva de una molécula quimérica que comprende ADAMTS13 y un derivado activo de Ig puede oscilar, por ejemplo, entre 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de actividad trombolítica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de una molécula quimérica que comprende ADAMTS13 e Ig.

20 El término "actividad trombolítica" tal como se emplea aquí se refiere a la desintegración de uno o varios trombos. Los métodos adecuados para determinar la actividad trombolítica son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, son métodos apropiados la determinación de la lisis de un coágulo de sangre total por tPA o estreptoquinasa o la determinación de la lisis del trombo *in vivo*.

25 El término "desintegración" tal como se utiliza aquí incluye la desintegración, disolución, destrucción y/o lisis parcial o completa de un trombo.

El término "trombo" tal como se emplea aquí comprende un coágulo sanguíneo, en especial un coágulo sanguíneo comprendiendo plaquetas, un microtrombo y/o un émbolo. Dicho trombo puede estar o no unido a un vaso sanguíneo arterial o venoso y puede bloquear parcial o completamente el flujo sanguíneo de un vaso sanguíneo arterial o venoso.

30 El término "derivado biológicamente activo" tal como se utiliza aquí se refiere a todo polipéptido con sustancialmente la misma función biológica que ADAMTS13. Las secuencias polipeptídicas de los derivados biológicamente activos pueden comprender delecciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos cuya ausencia, presencia y/o sustitución, respectivamente, no tiene impacto negativo sustancial alguno sobre la actividad biológica del polipéptido. La actividad biológica de dichos polipéptidos se puede medir, por ejemplo, por la reducción o retraso de la adherencia plaquetaria al endotelio, reducción o retraso de la agregación plaquetaria, reducción o retraso de la formación de hebras plaquetarias, reducción o retraso de la formación de trombos, reducción o retraso del crecimiento de trombos, reducción o retraso de la oclusión de los vasos, clivaje proteolítico del vWF y/o desintegración de los trombos.

35 Los términos "ADAMTS13" y "derivado biológicamente activo", respectivamente, incluyen también polipéptidos obtenidos por tecnología de ADN recombinante. La ADAMTS13 recombinante (ADAMTS13-r), por ejemplo ADAMTS13 recombinante humana (ADAMTS13-r-hu), se puede producir por cualquier método conocido en la técnica. Se describe un ejemplo específico en el documento WO 02/42441 con respecto al método para producir ADAMTS13 recombinante. Esto puede incluir cualquier método conocido en la técnica para (i) producir ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo mediante transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) introducir ADN recombinante en células procarióticas o eucarióticas por transfección, esto es mediante electroporación o microinyección, (iii) cultivar dichas células transformadas, por ejemplo de forma continua o discontinua, (iv) expresar ADAMTS13, por ejemplo constitutivamente o por inducción, y (v) aislar dicha ADAMTS13, por ejemplo del medio de cultivo o cosechando las células transformadas, con el fin (vi) de obtener ADAMTS13 recombinante sustancialmente purificada, por ejemplo por cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad. El término "derivado biológicamente activo" incluye también moléculas quiméricas tales como ADAMTS13 (o un derivado biológicamente activo de la misma) en combinación con Ig, para mejorar las propiedades biológicas/farmacológicas, por ejemplo la vida media de ADAMTS13 en el sistema circulatorio de un mamífero, en particular de un ser humano. Ig podría tener también el sitio de unión a un receptor Fc opcionalmente mutado.

40 La ADAMTS13-r se puede producir mediante expresión en un sistema huésped procariótico o eucariótico apropiado caracterizado por la producción de una molécula farmacológicamente efectiva de ADAMTS13. Ejemplos de células eucarióticas son células de mamífero, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2. No existe limitación particular en cuanto a los reactivos o condiciones para producir o aislar ADAMTS13 de acuerdo con la presente invención y se puede emplear cualquier sistema conocido en la técnica o comercial. En una realización de la presente invención, se obtiene ADAMTS13-r mediante métodos como los descritos en el estado de la técnica.

Se puede utilizar una amplia variedad de vectores para la preparación de ADAMTS13-r, pudiéndose seleccionar de entre vectores de expresión eucarióticos y procarióticos. Ejemplos de vectores para la expresión procariótica incluyen plásmidos tales como pRSET, pET, pBAD, etc., incluyendo los promotores utilizados en los vectores de expresión procarióticos lac, trc, trp, recA, araBAD, etc. Ejemplos de vectores para la expresión eucariótica incluyen: (i) para la expresión en levaduras, vectores como pAO, pPIC, pYES, pMET, utilizando promotores como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii) para la expresión en células de insectos, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., utilizando promotores como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., y (iii) para la expresión en células de mamíferos, vectores como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcADN3, pBPV, etc., así como vectores procedentes de sistemas virales tales como del virus vaccinia, adenovirus asociados, virus del herpes, retrovirus, etc., utilizando promotores como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y β -actina.

Opcionalmente, la composición farmacéutica de la presente invención también comprende uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender también uno o más ingredientes activos adicionales, por ejemplo agentes antitrombóticos, agentes que estimulan la producción/secreción de ADAMTS13 por el paciente/ individuo tratado, agentes inhibidores de la degradación de ADAMTS13 y que prolongan así su vida media, agentes que mejoran la actividad de ADAMTS13 (por ejemplo por unión a ADAMTS13, induciendo así un cambio conformacional de activación) o agentes inhibidores de la eliminación de ADAMTS13 de la circulación, aumentando así su concentración en plasma. Ejemplos de agentes antitrombóticos incluyen anti-plaquetarios, t-PA, aspirina y heparina.

La presente invención se puede utilizar en un método para tratar o prevenir un trastorno asociado a la formación y/o presencia de uno o varios trombos, método que comprende la etapa de administrar a un paciente una composición de acuerdo con la invención. Dicho trastorno puede ser debido a trastornos hereditarios, enfermedades inflamatorias, derrame cerebral o condiciones sépticas. Ejemplos de trastornos asociados a la formación y/o presencia de uno o varios trombos son púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) hereditaria, PTT adquirida, trombosis arterial, infarto agudo de miocardio (AMI), derrame cerebral, sepsis, coagulación intravascular diseminada (DIC), así como trombosis venosa, por ejemplo trombosis venosa profunda o embolismo pulmonar.

Además, la presente invención se puede utilizar en un método para desintegrar uno o más trombos en un paciente, comprendiendo el método la etapa de administrar al paciente una composición de acuerdo con la presente invención.

La vía de administración de la composición de la presente invención no tiene una limitación específica y puede ser, por ejemplo, subcutánea o intravenosa. El término "paciente" tal como se emplea en la presente invención incluye mamíferos, en particular seres humanos.

Además, la presente invención se refiere a la utilización de una cantidad farmacéuticamente efectiva de una molécula quimérica que comprende ADAMTS13 así como Ig para tratar o prevenir un trastorno asociado a la formación y/o presencia de uno o varios trombos.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de una cantidad farmacéuticamente efectiva de una molécula quimérica que comprende ADAMTS13 e Ig desintegrando uno o varios trombos en un paciente que lo necesita.

La cantidad farmacéuticamente efectiva de molécula quimérica que comprende ADAMTS13 e Ig puede oscilar, por ejemplo entre 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal.

Las figuras muestran:

Figura 1: Formación de trombos en microvénulas. Vénulas mesentéricas de aprox. 25-30 μm de diámetro se visualizaron después de realizar una incisión a través de la pared abdominal para descubrir el mesenterio de ratones vivos. Un minuto después de la superfusión tópica de A23187, se observó la formación de trombos en ratones *Adamts13-l* (n=5). Las flechas indican los microtrombos. No se observó formación alguna de microtrombos en ratones WT tratado de forma idéntica (n=5). Por tanto, estimular la secreción de cuerpos de Weibel-Palade puede conducir a la formación de trombos espontáneos en ratones *Adamts13-l* en ausencia de lesión vascular.

Figura 2: El inhibidor de ADAMTS13 aumenta la adherencia plaquetaria y la formación de hebras en la pared del vaso. Se observaron plaquetas etiquetadas con fluorescencia que representaban aprox. el 2,5% de plaquetas totales en las vénulas mesentéricas (200-250 μm) de ratones vivos antes (base) y después de la superfusión de A23187. A: Las plaquetas empiezan a adherirse al endotelio 30 a 45 segundos después de la superfusión. En ratones WT (n=4) (infundidos con ADAMTS13 Ab antihumana) se adhieren más plaquetas a la pared del vaso después de 4 minutos en comparación con el control WT (n=4) (infundido con PBS). Las puntas de flecha indican que las hebras de las plaquetas $\geq 20 \mu\text{m}$ están unidas en un extremo al endotelio y ondulan en la corriente sanguínea. Los puntos de tiempo insertados en la esquina derecha inferior se refieren al tiempo después de la superfusión de A23187. La barra mostrada en el panel del medio es (aprox.) de 50 μm . B: En 5 de los 7 ratones WT infundidos con el inhibidor de ADAMTS13, una hebra plaquetaria de aprox. 25-35 μm de largo se ancla en la pared del vaso durante 10 segundos. Los puntos de tiempo insertados en la

esquina derecha inferior se refieren al tiempo después de la superfusión de A23187. La barra mostrada en el panel del medio es (aprox.) de 25 μ m.

5 Figura 3: Formación de trombos en microvénulas de ratones WT infundidos con inhibidor de ADAMTS13. Se observaron vénulas mesentéricas de aprox. 25-30 μ m de diámetro. Un minuto después de la superfusión tóxica con A23187, se observó la formación de trombos en 4 de los 6 ratones WT *Adamts13* infundidos con el inhibidor de ADAMTS13. La formación de microtrombos fue similar a la que se vio en los ratones *-/- Adamts13* (Figura 1). Las puntas de flecha indican microtrombos. No se formaron microtrombos en ratones WT infundidos con PBS (n=5).

10 Figura 4: La ADAMTS13 recombinante inhibe hebras plaquetarias en los ratones *Adamts13-I*. Se utilizó Rodamina 6G para etiquetar leucocitos y plaquetas endógenas. Se administró ip histamina 1 mM (200 μ l) 15 minutos antes de la cirugía y se visualizaron en cada ratón 3 vénulas mesentéricas de aprox. 200-300 μ m de diámetro. A: No se observan hebras plaquetarias en los ratones WT *Adamts13* (n=5). B: Se observan en los ratones *Adamts13-I* (n=5) hebras plaquetarias (indicadas por las puntas de flechas). C: Las hebras plaquetarias podrían formar agregados plaquetarios en los ratones *Adamts13-I* tal como se indica con la punta de flecha. D: La infusión de la proteína de ADAMTS13 recombinante humana inhibe las hebras plaquetarias en los ratones *Adamts13-I* (n=4).

15 Figura 5: Análisis cuantitativo de la adhesión plaquetaria y de la formación de trombos en arteriolas de ratones WT y *Adamts13-I*. A: El número de plaquetas fluorescentes depositadas por minuto se determinó en un intervalo de 2-3 minutos después de la lesión (número total de plaquetas adheridas en el intervalo de 1 minuto). A efectos estadísticos y promedio, las plaquetas superiores a 100 se consideraron como 100. La ausencia de ADAMTS13 en plasma influye claramente en la interacción temprana plaqueta-subendotelio. En comparación con WT, en *Adamts13-I* se depositaron más plaquetas sobre la pared del vaso (P<0,05). B: Aparecieron más temprano trombos (>30 μ m) después de la lesión en los ratones *Adamts13-I* (promedio = 6,64 \pm 0,93) en comparación con WT (promedio = 10,78 \pm 0,80) significación estadística (P<0,005). Esto demuestra que el clivaje de los multímeros de vWF-UL por ADAMTS13 retrasa la formación de trombos. C: Se determinó el tiempo de oclusión cuando el flujo sanguíneo se interrumpió completamente durante 10 segundos. Los ratones tanto WT como *Adamts13-I* experimentaron oclusión en el lugar de la lesión; sin embargo en los ratones *Adamts13-I* el tiempo de oclusión fue más corto (promedio = 10,56 \pm 0,72) en comparación con WT (promedio = 16,69 \pm 1,25 min). Diferencia estadísticamente muy significativa (P<0,0005). D: Plaquetas etiquetadas con fluorescencia que representaban aprox. el 2,5% de plaquetas totales se observaron en las arteriolas mesentéricas de ratones vivos después de la lesión con cloruro férrico. El flujo sanguíneo iba de izquierda a derecha. Los puntos de tiempo insertados en la esquina inferior derecha se refieren al tiempo después de la lesión. Se ven plaquetas adherentes únicas en la arteriola a los 4 minutos después de la lesión en el ratón WT, mientras que se puede ver ya un trombo (aprox. 30 μ m) en la arteriola de ratón *Adamts13-I* en el mismo punto de tiempo. Se ocluyó el vaso a los 10 minutos con un trombo en el lugar de lesión en los ratones *Adamts13-I*, mientras que la arteriola de ratón WT se quedó abierta en ese momento. Las fotografías son representativas de 10 ratones de cada genotipo.

20 Figura 6: La inhibición de la integrina α IIb β 3 bloquea la formación de trombos de las plaquetas ADAMTS13 *-/-* sobre colágeno en condiciones de cizalladura sobre la pared arterial. Sangre total con *Adamts13+/+* o *Adamts13-/-* se perfundió durante 2 minutos en una superficie de colágeno a una cizalladura de 1500s⁻¹. A: Se muestran imágenes representativas. En los paneles superiores, sangre total no tratada, en los paneles inferiores, sangre total pretratada con anticuerpo bloqueante contra α IIb β 3 (JON/A). B: Cuantificación de la zona superficial cubierta por plaquetas después de 2 minutos de perfusión. Se analizaron en cada muestra de sangre cuatro cuadros procedentes de distintas zonas de la cámara de flujo. Los datos representan el porcentaje medio de la zona superficial cubierta por plaquetas fluorescentes \pm SEM (n=3-4).

25 Figura 7: La infusión de ADAMTS13 recombinante humana inhibe el crecimiento de trombos. Se infundió (iv) ADAMTS13 recombinante humana en ratones con *Adamts13 -/-* 15 minutos antes de la lesión con cloruro férrico. Se determinó el tiempo de oclusión (flujo sanguíneo totalmente interrumpido durante 10 s). A: Cinco de entre 13 ratones *Adamts13 -/-* infundidos con ADAMTS13 recombinante humana no experimentaron oclusión en la arteriola hasta 40 minutos de tiempo de observación (tiempo de oclusión medio = 23,80 \pm 3,71 min), mientras que la totalidad de los 10 ratones *Adamts13 -/-* infundidos con tampón recombinante experimentaron oclusión solamente (tiempo de oclusión medio = 11,17 \pm 0,87); (P=0,005). B: Tiempo de oclusión en arteriolas lesionadas de ratones WT (C57Bl/6J) infundidos con ADAMTS13r-hu (tiempo de oclusión medio = 27,99 \pm 4,72 min) o con tampón solo (tiempo de oclusión medio = 13,12 \pm 0,55 min). C: Se muestran imágenes fluorescentes representativas de la arteriola lesionada de un ratón *Adamts13 -/-* tratado con ADAMTS13hu-r. Las puntas de flecha indican un trombo desintegrándose.

30 Figura 8: La infusión de ADAMTS13 recombinante de ratón inhibe el crecimiento de trombos en ratones WT. Se infundió (iv) ADAMTS13 recombinante de ratón (2,6 mg/kg de ratón) en ratones WT 5 min antes de la

lesión con cloruro férrico. Cuatro de entre los nueve ratones WT infundidos con ADAMTS13 recombinante de ratón no experimentaron oclusión de las arteriolas lesionadas a los 40 minutos de observación (tiempo de oclusión medio = 27,04±3,84 min), mientras que la totalidad de ratones WT infundidos con tampón experimentaron oclusión (tiempo de oclusión medio = 15,15±1,18 min, P = 0,006).

Figura 9: Tabla 1: parámetros hemodinámicos antes y después de aplicar A23187 en vénulas (Figura 1); Tabla 2: parámetros hemodinámicos antes y después de aplicar cloruro férrico en las arteriolas (Figura 5).

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

10 **Ejemplo 1: La activación endotelial resulta en la formación de trombos en microvénulas de ratones *Adamts13* -/-**

Se observa mayor adherencia/desplazamiento plaquetario en las vénulas (200-250 μm) activadas por un ionóforo de calcio A23187 (un secretagogo de los cuerpos de Weibel-Palade) a baja velocidad de corte (aprox. 100 s^{-1}) en ratones *Adamts13* -/- en comparación con WT. Se investigó si la activación del endotelio de las microvénulas por A23187 pudiese resultar en una agregación plaquetaria que provoca la formación de trombos. El A23187 no desnuda el endotelio (André P, Denis CV, Ware J, Saffaripour S, Hynes RO, Ruggeri ZM, Wagner DD., Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins, Blood. 2000; 96: 3322-3328). La velocidad de corte (200-250 s^{-1}) y el diámetro de todas las vénulas (25-30 μm) estudiadas eran similares en relación a los ratones *Adamts13* -/- y WT (Tabla 1). Se observó en las microvénulas de los ratones *Adamts13* -/-, 45 segundos a 1 minuto después de la superfusión tópica de A23187, que la agregación plaquetaria resultaba en la formación de trombos (Figura 1). Los trombos eran inestables y se eliminaban en la corriente sanguínea conduciendo a embolización frecuente, lo que causaba oclusión aguas abajo. Sin embargo, la oclusión duraba solamente 3 a 4 segundos y la vénula se reabría después. Ya no se veía formación de trombos en el lugar de estímulo 2 minutos después de la superfusión con A23187. En los ratones WT tratados de forma idéntica, hebras de plaquetas y agregados plaquetarios muy pequeños se podían ver unidos al endotelio durante 1 segundo, pero ello no resultaba en la formación de trombos. Las arteriolas con un recorrido en paralelo a las vénulas en los ratones *Adamts13* -/- o WT no mostraron ninguna agregación plaquetaria o formación de trombos. No se observaron en las arteriolas hebras plaquetarias. Estas observaciones demuestran que ADAMTS13 inhibe la agregación plaquetaria y, por tanto, impide la formación de trombos en las microvénulas.

30 **Ejemplo 2: Un anticuerpo anti-ADAMTS13 induce la formación de hebras plaquetarias en vénulas de ratones WT**

Estudios anteriores han demostrado que la mayoría de los pacientes que sufren de la forma adquirida de PTT presentan inhibidores autoinmunes contra ADAMTS13 (Tsai HM, Lian EC., Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura, N Engl J Med. 1998; 339: 1535-1594; Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M, Lammler B., von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome, N Engl J Med. 1998; 339: 1578-1584). Se infundió ADAMTS13 Ab policlonal antihumana (disuelta en PBS) en ratones WT 2 horas antes de la cirugía. Después de la superfusión tópica de A23187 en ambos ratones de control (infundidos con PBS) y en ratones infundidos con Anti-ADAMTS13-Ab, muchas plaquetas se adhirieron/desplazaron en el endotelio, alcanzando un pico de adherencia plaquetaria entre 45 segundos y 1 minuto, que se redujo progresivamente con el tiempo. Sin embargo, se observó mayor adherencia plaquetaria 4 minutos después de la aplicación de A23187 en los WT infundidos con Ab en comparación con el control (Figura 2A). El fenómeno observado era similar al *Adamts13* -/-. Se observaron hebras de plaquetas que oscilaban entre 20 y 40 μm unidas en un extremo al endotelio y ondulando en la corriente sanguínea. No se observaron hebras de plaquetas o éstas tuvieron muy corta vida (menos de 2 s) en los ratones inyectados con PBS o Ig de control. En ratones WT en un contexto genético marcado por niveles elevados de vWF (CASA/RK), tratados con anticuerpo inhibidor, las hebras de plaquetas eran aun más largas (oscilando entre 30 y 60 μm), indicando que éstas estaban formadas principalmente por polímeros de vWF (en algunos ratones estas hebras plaquetarias se anclaban al endotelio hasta 10 segundos (Figura 2B) y luego se eliminaban por lavado).

Ejemplo 3: El inhibidor de ADAMTS13 resulta en la formación de trombos en microvénulas de ratones WT

50 En ratones WT, infundidos con ADAMTS13-Ab antihumana, 2 horas antes de la preparación quirúrgica, se formaron microtrombos en la pared de los vasos 45 segundos a 1 minuto después de la superfusión tópica de A23187 en 4 de los 6 ratones (Figura 3). El aspecto de los microtrombos era similar al aspecto de aquellos vistos en los ratones *Adamts13* -/- (Figura 1). Después, se infundió el anticuerpo inhibidor en los ratones WT en un fondo de C57BU6. En tres de los 5 ratones se formaron microtrombos. En los ratones WT de control se pudieron observar agregados plaquetarios unidos al endotelio, pero no resultaron en la formación de trombos (n=3).

Ejemplo 4: La histamina induce hebras plaquetarias en vénulas de ratones *Adamts13* *-/-*, mientras que la ADAMTS13 recombinante inhibe su formación

La histamina producida durante la inflamación es un secretagogo de cuerpos de Weibel-Palade y estimula el endotelio. Se etiquetaron plaquetas endógenas mediante la infusión de Rodamina 6G iv antes de la cirugía. Se inyectó ip 1 mM (200 μ l) de histamina 15 minutos antes de la preparación quirúrgica en los ratones *Adamts13* *-/-* (n=5) y WT (n=5) y se visualizaron vénulas a una velocidad de corte de aprox. 100 s^{-1} . En los ratones WT, no se observaron hebras de plaquetas o éstas tuvieron corta vida (menos de 5 segundos, Figura 4A), mientras que se pudieron observar en los ratones *Adamts13* *-/-* hebras plaquetarias que oscilaban entre 20 y 100 μ m (Figura 4B) ancladas al endotelio durante aproximadamente un minuto. En algunos ratones, las hebras plaquetarias se anclaban al endotelio en 2 a 5 minutos. Algunas hebras parecieron fusionarse formando agregados (Figura 4C) que se liberaron más tarde dentro de la corriente sanguínea. La infusión de la proteína ADAMTS13 recombinante humana (ADAMTS13r-hu) en los ratones *Adamts13* *-/-* (n=4, 3 vénulas por ratón) inhibió las hebras plaquetarias en las 12 vénulas totales examinadas (Figura 4D), demostrando así la actividad de ADAMTS13 a bajo esfuerzo de cizalladura.

Ejemplo 5: La unión de plaquetas al subendotelio aumenta en los ratones *Adamts13* *-/-*

La lesión con cloruro férrico ($FeCl_3$) conduce a la desendotelización y descubre el subendotelio (Ni H, Denis CV; Subbarao S, Degen JL, Sato TN, Hynes RO, Wagner DD., Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen, J Clin Invest. 2000; 106: 385-392). Las interacciones plaqueta-subendotelio después de la lesión por cizalladura arterial son iniciadas por la interacción GPIb-vWF y luego son propagadas por otros receptores (Ni H, Denis CV; Subbarao S, Degen JL, Sato TN, Hynes RO, Wagner DD., Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen, J Clin Invest. 2000; 106: 385-392). En ambos ratones WT y *Adamts13* *-/-*, la interacción plaqueta-pared del vaso empezó rápidamente después de la aplicación de cloruro férrico a la arteriola. El número de animales en los que se depositaron más de 100 plaquetas 2-3 minutos después de la lesión era más alto en los ratones *Adamts13* *-/-* (Figura 5A). En los *Adamts13* *-/-*, 7 de entre 12 ratones mostraron más de 100 plaquetas depositadas en la pared del vaso, en comparación con 3 de 10 en los ratones WT. Los resultados fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$, Figura 5A).

Ejemplo 6: Formación acelerada de trombos en arteriolas lesionadas de ratones *Adamts13* *-/-*

El vWF presente en el plasma es sintetizado constitutivamente por las células endoteliales o es segregado en forma de multímeros inhabitualmente grandes a partir de los gránulos-alfa plaquetarios y cuerpos endoteliales de Weibel-Palade a su activación. El vWF-UL es la forma más adhesiva y reactiva del vWF y puede conducir a la agregación plaquetaria, resultando en un trombo si no es procesado por ADAMTS13. En el modelo de trombosis inducida por cloruro férrico en ratones *Adamts13* *-/-*, los trombos crecieron más rápidamente en trombos de tamaño superior a 30 μ m y se observaron a los 6,64 \pm 0,93 min en comparación con los 10,78 \pm 0,80 min en los ratones WT, los resultados fueron estadísticamente significativos ($P < 0,005$, Figura 5B). Los trombos crecieron hasta el tamaño oclusivo en 10,56 \pm 0,72 min en los ratones *Adamts13* *-/-*, mientras que en los WT los vasos seguían abiertos ($P < 0,0005$, Figuras 5C y 5D). En los WT, el tiempo medio de oclusión de los vasos era de 16,69 \pm 1,25 después de la lesión ($P < 0,0005$). Todos los vasos se ocluyeron en el lugar de la lesión. La velocidad de corte y el diámetro de las arteriolas estudiadas eran similares para los ratones *Adamts13* *-/-* y WT (Tabla 2). Es importante observar que en las arteriolas de ratones *Adamts13* *-/-*, el tiempo medio para la formación de trombos (<30 Mm) así como el tiempo medio de oclusión eran inferiores al de cualquier ratón WT individual (Figuras 5B y 5C). Se ha observado que las embolias (>30 μ m) formadas en 4 de entre 10 (40%) ratones *Adamts13* *-/-* mientras sólo en 2 de entre 11 (18,2%) ratones WT mostraron embolización. Así, los trombos de los ratones *Adamts13* *-/-* parecen ligeramente menos estables que los WT. La embolización observada en los ratones *Adamts13* *-/-* no condujo a la oclusión aguas abajo.

Ejemplo 7: La carencia en ADAMTS13 intensifica el crecimiento de trombos de forma integrina α IIb β 3 dependiente

Se realizaron estudios *in vitro* en cámara de flujo con sangre total en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueante (JON/A) anti α IIb β 3 (Bergmeier W, Schulte V, Brockhoff G, Bier U, Zirngibl H, Nieswandt B., Flow cytometric detection of activated mouse integrin α IIb β 3 with a novel monoclonal antibody, Cytometry 2002; 38:80-86) (Figura 6). Para cuantificar el tamaño de los trombos, se determinó la zona superficial cubierta por las plaquetas etiquetadas con fluorescencia. La sangre de *Adamts13* *-/-* formó trombos significativamente más largos que los WT cuando se realizó la perfusión sobre colágeno durante 2 minutos a una velocidad de corte de 1500 s^{-1} (44,66 \pm 3,63% contra 20,22 \pm 3,88%, $P < 0,0005$), demostrando de nuevo el papel clave de la ADAMTS13 en la limitación del crecimiento de trombos. En presencia del anticuerpo bloqueante anti α IIb β 3, sólo las plaquetas únicas se adhirieron a la superficie de colágeno y la formación de trombos se inhibió completamente tanto en la sangre de WT como de *Adamts13* *-/-* (3,01 \pm 0,97% contra 2,82 \pm 0,39%, $P > 0,05$). Además, se sometió a prueba si la infusión del anticuerpo inhibidor de ADAMTS13 en ratones carentes de integrina beta3 (Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, Rayburn H, Crowley D, Ullman-Cullere M, Ross FP, Collier BS, Teitelbaum S, Hynes RO., Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival, J Clin Invest 1999; 103: 229-238) induciría la formación de trombos después de la lesión de cloruro férrico. En las arteriolas lesionadas de ratones beta3 $-/-$ (se evaluaron 3 animales) no se pudieron detectar trombos a pesar de la presencia del anticuerpo anti-ADAMTS13 (no mostrado). Tomados en su

conjunto, estos resultados indican que, a velocidades de corte arteriales, el vWF extragrande intensifica el crecimiento de trombos de forma $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -dependiente.

Ejemplo 8: La infusión de ADAMTS13 recombinante humana en ratones *Adamts13* $-/-$ o WT (C57BL/6J) inhibe el crecimiento de trombos por desestabilización del agregado o trombo plaquetario

5 El clivaje de la subunidad de vWF en fragmentos proteolíticos por ADAMTS13 recombinante humana (ADAMTS13r-hu) se ha demostrado *in vitro* (Plaimauer B, Zimmermann K, Volkel D, Antoine G, Kerschbaumer R, Jenab P, Furlan M, Gerritsen H, Lammle B, Schwarz HP, Scheiflinger F., Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), *Blood*. 2002; 100: 3626-3632). Se ha demostrado que la ADAMTS13r-hu corrige el defecto de clivaje de vWF en plasma con PTT hereditaria (Antoine G, Zimmermann K, Plaimauer B, Grillowitz M, Studt JD, Laemmle B, Scheiflinger F., ADAMTS13 gene defects in two brothers with constitutional thrombotic thrombocytopenic purpura, *Br J Haematol* 2003; 120: 821-824). Como se ha observado el crecimiento acelerado de trombos en ratones *Adamts13* $-/-$, se supone que la ADAMTS13 modula negativamente el crecimiento de trombos y, por tanto, la infusión de ADAMTS13r-hu en ratones *Adamts13* $-/-$ podría retrasar la formación de trombos. La concentración de proteína circulante humana era aproximadamente de 8,8 U/ml 17 minutos después de la infusión y de 1,1 U/ml 53 minutos después de la infusión de ADAMTS13r-hu en ratones *Adamts13* $-/-$. Estos tiempos corresponden aproximadamente al principio de la lesión con cloruro férrico y a la finalización del experimento. En 5 de los 13 ratones *Adamts13* $-/-$ infundidos con ADAMTS13r-hu, las arteriolas lesionadas no se ocluyeron durante 40 minutos máximo cuando finalizó el experimento (Figura 7A). El efecto de la ADAMTS13r-hu infundida era mayor que el de la ADAMTS13 endógena en ratones WT, ya que en este modelo de lesión todos los vasos de WT se ocluyeron en menos de 24 min (Figura 5C). El tiempo medio de oclusión se prolongó significativamente en comparación con los ratones de control infundidos con tampón ($P < 0,0005$). En todos los ratones cuyas arteriolas no se ocluyeron se formaron trombos, pero eran inestables y se desintegraban (Figura 7C). Este fenómeno de formación de trombos y de desintegración estaba presente durante todo el período de observación. La infusión de ADAMTS13r-hu antes de la lesión en ratones WT (C57BL/6J) provocó un retraso significativo en el tiempo de oclusión, con la mitad de las arteriolas sin ocluirse a los 40 minutos, mientras que todas las arteriolas de los ratones WT infundidos con el vehículo se ocluyeron a los 15 minutos (Figura 7B, $P < 0,008$). Por tanto, la ADAMTS13 parece tener un potencial antitrombótico significativo aun en ratones WT con niveles normales de proteína ADAMTS13 endógena.

Ejemplo 9: La infusión de ADAMTS13 recombinante de ratón inhibe el crecimiento de trombos en ratones WT

30 Se infundió (iv) ADAMTS13r de ratón (2,6 mg/kg de ratón) en ratones WT 5 minutos antes de la lesión con cloruro férrico. Se utilizó el modelo descrito anteriormente con ligeras modificaciones tal como se describe a continuación. La Figura 8 muestra que cuatro de los nueve ratones WT infundidos con ADAMTS13r no experimentaron oclusión de las arteriolas lesionadas a los 40 minutos de observación (tiempo medio de oclusión = $27,04 \pm 3,84$ min), mientras que todos los ratones WT infundidos con tampón experimentaron oclusión con (tiempo medio de oclusión = $15,15 \pm 1,18$ min, $P = 0,006$). El análisis Western de muestras de plasma tomadas al final del experimento demostró que el tiempo de oclusión más corto en algunos ratones infundidos con ADAMTS13r (similar a WT) se debía a la mayor eliminación de la proteína recombinante. Por tanto, la ADAMTS13 de ratón parece tener el mismo potencial antitrombótico que la ADAMTS13 humana en ratones WT con niveles normales de proteína ADAMTS endógena.

Estos resultados demuestran que ADAMTS13 tiene actividad antitrombótica y trombolítica.

40 **Procedimientos Experimentales**

Animales

Los ratones utilizados en los ejemplos eran hermanos obtenidos de cruces de ratones *Adamts13* $\pm/-$ sobre fondo de C57BL/6J/129Sv (Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, Homeister J, Lamb CB, Desch KC, Zhang W, Tsai HM, Wagner DD, Ginsburg D., Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice, *J Clin Invest* 2005; 115: 2752-2761). Los ratones de fondo puro C57BL/6J se compraron a Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME y los ratones con integrina β3 $-/-$ sobre fondo Balb/C fueron un regalo de Richard Hynes (MIT). Los ratones utilizados para la microscopía intravital eran ratones jóvenes (aprox. de 4 semanas), tanto machos como hembras, que pesaban de 14 a 18 gramos. Se aislaron plaquetas infundidas procedentes de ratones de 4 a 6 meses de edad del mismo genotipo. Los animales fueron criados y alojados en el CBR Institute for Biomedical Research y todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Animal Care and Use Committee.

Materiales

El ionóforo de calcio A23187 y el cloruro férrico procedían de Sigma Chemicals, St. Louis, MO.

Muestreo de sangre y preparación de plaquetas

55 Se cosechó sangre del plexo retroorbital venoso mediante punción y se recogió en tubos de polipropileno de 1,5 ml que comprendían 300 μl de heparina (30 U/ml). Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos. El plasma y la capa leucoplaquetaria (buffy coat) que comprende algunos RBC fueron

transferidos suavemente en tubos frescos de polipropileno y se volvieron a centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos. El PRP se transfirió a tubos frescos que comprendían $2 \mu\text{l}$ de PGI_2 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron a 37°C durante 5 minutos. Después de centrifugación a 2800 rpm, se resuspendieron los gránulos en 1 ml de tampón Tyrode-HEPES modificado (137 mM Na-Cl, 0,3 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KCl, 12 mM NaHCO_3 , 5 mM HEPES, 5 mM glucosa, 0,35% BSA) que comprendía 2 μl de PGI_2 y se incubaron a 37°C durante 5 minutos. Los gránulos suspendidos se centrifugaron a 2800 rpm durante 5 minutos. Para eliminar PGI_2 , se repitió dos veces la etapa de lavado y se etiquetaron fluorescentemente las plaquetas con calceína AM 0,25 mg/ml (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Producción y purificación de IgG anti-ADAMTS13 policlonal

La IgG anti ADAMTS13 humana policlonal de conejo fue producida por Baxter Bioscience, Viena, Austria. Se obtuvo el anticuerpo mediante inmunización de conejos blancos de Nueva Zelanda con ADAMTS13r-hu purificada, marcada en su terminal C con seis residuos His. Se inmunizaron dos conejos por inyección de 20 μg de ADAMTS13r-hu (6-His) en 200 μl de adyuvante completo de Freund. Los animales fueron revacunados después de dos, cuatro y seis semanas por inyección de 20 μg de ADAMTS13r-hu (6-His) en 200 μl de adyuvante incompleto de Freund. Tras ocho semanas, los conejos fueron sacrificados y desangrados. Los anticuerpos IgG se purificaron por cromatografía de afinidad en Proteína G (HiTrap Protein G HP column; Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) y se formularon en PBS.

Trombosis en microvénulas

Se llevó a cabo la microscopía intravital tal como se describe en Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD., Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin, Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92: 7450-7454. Brevemente, se anestesiaron ratones con un 2,5% de tribromoetanol (0,15 ml/10 g) y se hizo una incisión en la pared abdominal para descubrir el mesenterio, estudiándose la vénula mesentérica de 25 a 30 μm de diámetro. El mesenterio descubierto se mantuvo húmedo por superfusión periódica utilizando PBS (sin Ca^{2+} o Mg^{2+}) calentado a 37°C . El mesenterio fue transiluminado con una fuente DC estabilizada de 12 V, 100 W. La velocidad de corte se calculó con un velocímetro Doppler óptico tal como se describe en Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD., Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules, Blood. 1998; 91: 1318-1324. Se visualizó la vénula con un microscopio invertido (Objetivo 10X y 32X) Axiovert 135 de Zeiss (Alemania) conectado a un vídeo grabador SVHS (AG-6730; Panasonic, Tokio, Japón). Se eligió una vénula por ratón y se filmó durante 3 minutos en cuanto a la línea de base antes de la perfusión de A23187 (30 μl de una solución de 10 Mmol/l) y se monitorizó durante 10 minutos.

Adherencia plaquetaria en vénulas grandes

Se llevó a cabo la microscopía intravital tal como se describe anteriormente, salvo que se estudiaron vénulas mesentéricas de 200 a 300 μm de diámetro. Se infundieron por la vena de la cola plaquetas fluorescentes (1,25 x 10⁹ plaquetas/kg). Se filmó una vénula por animal durante 3 minutos en cuanto a la línea base antes de la superfusión de A23187 (30 μl de una solución de 10 $\mu\text{mol}/\text{l}$) y la filmación continuó hasta después de que volver a la línea base la adherencia y el rodamiento de las plaquetas. Se disolvió en PBS el anticuerpo ADAMTS13 antihumano purificado policlonal de conejo (5 mg/kg de ratón). La IgG de conejo de control (Sigma, St. Louis, MO) se realizó en PBS. Se inyectaron ip 200 μl de histamina 1 mM (Sigma) para estimular el endotelio. Se inyectaron iv 100 μl (0,2 mg/ml) de Rodamina 6G (Sigma) para etiquetar los leucocitos y las plaquetas endógenas antes de la cirugía y formación de imágenes.

Trombosis en las arteriolas

Se utilizó el modelo descrito en Ni H, Denis CV, Subbarao S, Degen JL, Sato TN, Hynes RO, Wagner DD., Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen, J Clin Invest. 2000; 106: 385-392, con ligeras modificaciones (Ni H, Denis CV, Subbarao S, Degen JL, Sato TN, Hynes RO, Wagner DD., Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen, J Clin Invest. 2000; 106: 385-392). Brevemente, se anestesiaron ratones con un 2,5% de tribromoetanol (0,15 ml/10 g) y se infundieron plaquetas fluorescentes (1,25 x 10⁹ plaquetas/kg) a través del plexo retroorbital del ojo. Se hizo una incisión en la pared abdominal para descubrir el mesenterio y se estudiaron arteriolas de aprox. 100 μm de diámetro. El mesenterio descubierto se mantuvo húmedo por superfusión periódica utilizando PBS (sin Ca^{2+} o Mg^{2+}) calentado a 37°C . El mesenterio fue transiluminado y la velocidad de corte se calculó tal como se ha descrito anteriormente. Se visualizaron las arteriolas por el mismo microscopio descrito anteriormente, provisto de una fuente luminosa fluorescente HBO de 100-W (Optic Quip, Highland Mills, NY) con una unidad de filtro de isotiocianato de fluoresceína de banda estrecha (Chroma Technology, Brattleboro, VT) y una cámara de tubo aumentado de silicio C2400 (Hamamatsu, Tokio, Japón). Se aplicó de forma tópica papel Whatman saturado con una solución de cloruro férrico (10%), lo que indujo la lesión del vaso y la denudación del endotelio. Se retiró el papel a los 5 minutos y se monitoreó el vaso durante 40 minutos después de la lesión o hasta la oclusión. Se eligió una arteriola por ratón.

Análisis cuantitativo del trombo arteriolar

Se analizó la cinta grabada sin conocer el genotipo. Los parámetros que se aplicaron para describir las características de la formación de trombos fueron: (1) Interacción plaqueta única-pared de vaso en un plazo de 2-3 minutos,

- determinada como número de plaquetas fluorescentes depositado sobre la pared del vaso de 250 μm (visto en el monitor de vídeo) durante 1 minuto. (2) El tiempo necesario para la formación de un trombo superior a 30 μm . (3) Estabilidad del trombo mediante la determinación del número de trombos de diámetro superior a 30 μm que se eliminan del campo visual por embolización antes de la oclusión del vaso. (4) Tiempo de oclusión del vaso, es decir tiempo necesario para que la sangre deje de circular durante 10 segundos y (5) Lugar de oclusión del vaso, es decir en el lugar de la lesión o aguas abajo.

Infusión de ADAMTS13 recombinante humana

- Se obtuvo la ADAMTS13 recombinante humana mediante los métodos que se describen en Plaimauer B, Zimmermann K, Völkel D, Antoine G, Kerschbaumer R, Jenab P, Furlan M, Gerritsen H, Lämmle B, Schwarz HP, y Scheiflinger F., Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), *Blood* 2002; 100(10): 3626-3632. Se disolvió la proteína de ADAMTS13 recombinante humana en 150 mmol de NaCl/20 mmol, histidina/2%, Sacarosa/0,05%, Crillet 4HP (Tween 80), pH 7,4 (Baxter Bioscience, Viena, Austria). Se inyectó iv (3460 U/kg de ratón) ADAMTS13 recombinante humana. Los niveles de antígeno de ADAMTS13 humana se determinaron por ligera modificación del método ELISA descrito por Rieger (Rieger M, Kremer Hovinga JA, Konetschny C, Herzog A, Koller L, Weber A, Remuzzi G, Dockal M, Plaimauer B y Scheiflinger F., Relation between ADAMTS13 Activity and ADAMTS13 Antigen Levels in Healthy Donors and Patients with Thrombotic Microangiopathies (TMA), *Thrombosis and Hemostasis* 2006; 95(2):212-20) y se determinó la actividad de ADAMTS13-hu de acuerdo con Gerritsen (Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, Laemmle B, and Furlan M., Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), *Thromb Haemost* 1999; 82: 1386-1389). 1 U corresponde al nivel de actividad de ADAMTS13 en plasma humano normal mezclado.

Infusión de ADAMTS13 recombinante de ratón

- Se obtuvo ADAMTS13 recombinante de ratón por los métodos descritos en Bruno K, Völkel D, Plaimauer B, Antoine G, Pable S, Motto DG, Lemmerhirt HL, Dörner F, Zimmermann K, y Scheiflinger F., Cloning, expression and functional characterization of the full-length murine ADAMTS13, *J Thromb Haemost* 2005; 3(5): 1064-1073. Se disolvió la proteína de ADAMTS13 recombinante de ratón en 150 mmol de NaCl / 20 mmol de Histidina / 2% de Sacarosa / 0,05% de Crillet 4HP (Tween 80), pH 7,4 (Baxter Bioscience, Viena, Austria).

Estudios con cámara de flujo

- Se realizaron estudios con cámara de flujo tal como se describe en Bergmeier (Bergmeier W, Burger PC, Piffath CL, Hoffmeister KM, Hartwig JH, Nieswandt B, and Wagner DD, Metalloproteinase inhibitors improve the recovery and hemostatic function of in vitro-aged or -injured mouse platelets, *Blood* 2003; 102: 4229-4235). Brevemente, se aislaron plaquetas de sangre total heparinizada, lavada en tampón Tyrode-HEPES modificado, y etiquetada con 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de calceína. La sangre total pobre en plaquetas fue reconstituida con plaquetas etiquetadas antes de la perfusión en un sistema de cámara de flujo de placas paralelas recubiertas de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colágeno Horm (NYCOMED, Munich, Alemania) durante 1 hora a temperatura ambiente. Donde venía indicado, se pretrataron muestras con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de JON/A (Emfret Analytics, Wuerzburg, Alemania) durante 10 minutos antes de la perfusión. Se visualizó la adherencia plaquetaria con un microscopio invertido Axiovert 135 (Zeiss). El porcentaje de zona superficial cubierta por plaquetas fluorescentes se analizó con el software de NIH Image 1.61 por un individuo que desconocía los genotipos.

Análisis estadístico

- Los resultados se indican como promedio \pm SEM. La significancia estadística de la diferencia entre los promedios fue evaluada con el test de Student.

Discusión de los resultados experimentales

- Los resultados experimentales han definido un papel clave para la ADAMTS13 en la prevención de la formación de trombos en microvénulas activadas y formación excesiva de trombos en las arteriolas lesionadas de ratones. Por microscopía intravital, se demuestra *in vivo* en ratones ADAMTS13^{-/-} que la activación de vénulas (25-30 μm) resulta en una agregación plaquetaria que conduce a la formación de microtrombos (Figura 1). Los microtrombos no se forman en las vénulas de ratones WT tratados idénticamente. Cuando se liberan del endotelio activado, estos microtrombos pueden desplazarse aguas abajo y provocan la oclusión en otro sitio en los pequeños capilares donde no pueden pasar, llevando así a la isquemia del órgano. Los pacientes que padecen PTT presentan a menudo microtrombos que se forman en la microvasculatura de órganos como el cerebro, corazón, páncreas, bazo, riñón y mesenterio. Varios agentes incluidos virus, toxinas Shiga bacterianas, fármacos como ticlopidina y clopidogrel, anticuerpos y complejos inmunes pueden provocar la activación vascular, quizás induciendo la liberación de cuerpos de Weibel-Palade. En arteriolas (que tienen un esfuerzo cortante más alto) tratadas de forma idéntica con A23187, no pudieron verse trombos. Ello se debe a que no se liberaron los cuerpos de Weibel-Palade en estos vasos o, y es más probable, el vWF se limpia demasiado rápidamente de la superficie endotelial como para favorecer la adherencia plaquetaria.

Los autoanticuerpos que neutralizan la ADAMTS13 humana son la principal causa del tipo adquirido de PTT. La infusión del anticuerpo anti-ADAMTS13 en ratones WT resultó en la adherencia prolongada de plaquetas al vWF segregado y a

la formación de hebras plaquetarias sobre el endotelio estimulado (Figura 2A) que era similar a la que se ve en los ratones *Adamts13* *-/-*. Hebras de plaquetas, que oscilan entre aprox. 20 y 70 μm de longitud pueden verse ancladas al endotelio (Figura 2B). Las hebras y agregados plaquetarios se vieron frecuentemente en los ratones *Adamts13* *-/-* cuando fueron desafiados con secretagogos de cuerpos de Weibel-Palade tales como histamina, citoquina TNF- α inflamatoria y plaquetas activadas. La infusión de proteína de ADAMTS13r-hu en los ratones *Adamts13* *-/-* desafiados con histamina inhibe la formación de hebras plaquetarias. Estas hebras están clivadas en el extremo aguas arriba.

La activación de las microvénulas (25 a 30 μm) con A23187 resulta en agregados plaquetarios que conducen a la formación de trombos en los ratones *Adamts13* *-/-* WT infundidos con anti-ADAMTS13-Ab (Figura 3). Sin embargo, estos trombos se embolizaron rápidamente, como aquellos en los ratones *Adamts13* *-/-*. La formación de microtrombos puede ser inducida también en los ratones WT sobre un fondo C57BU6 infundido con anticuerpo inhibitor. Por tanto, el ratón infundido con anti-ADAMTS13 Ab es, en muchos aspectos, un buen modelo para la PTT adquirida. Además, demuestra el papel de la ADAMTS13 en la prevención de la agregación plaquetaria en la circulación.

El vWF, a través de sus receptores, GPIIb/IIIa y $\alpha\text{IIb}\beta_3$, contribuye a la función plaquetaria en la iniciación de la agregación plaquetaria y progresión de la formación de trombos. Las observaciones experimentales de que las interacciones plaqueta-endotelio se prolongan y que la activación endotelial resulta en microtrombos en los ratones *Adamts13* *-/-* condujeron a la hipótesis de que la carencia de ADAMTS13 puede acelerar la formación de trombos en las arteriolas lesionadas. Realmente, la ausencia de ADAMTS13 favorecía todos los aspectos de crecimiento de trombos. De manera inesperada, incluso se depositaron más plaquetas sobre la pared del vaso desnudo después de 2-3 minutos de lesión en los ratones *Adamts13* *-/-* en comparación con WT (Figura 5A). Como la deposición plaquetaria temprana en arteriolas depende del vWF, significa o bien que la ADAMTS13 en plasma reduce la incorporación de vWF en la membrana del basamento cuando se expone a la sangre, o bien que digiere el vWF ya presente en la matriz extracelular. El crecimiento rápido de los trombos y la oclusión en los ratones *Adamts13* *-/-* indica que la ADAMTS13 puede clivar los multímeros de vWF incorporados en el trombo.

Se ha sugerido que el clivaje del dominio VWF A2 por la ADAMTS13 se ve facilitado por la unión del vWF a GPIIb/IIIa. Así, la interacción vWF-GPIIb dentro del trombo puede regular negativamente el crecimiento de trombos. La formación de trombos en condiciones de flujo venoso y arterial depende también de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ mayor. Los presentes ejemplos a velocidades de corte arteriolas demuestran que la ADAMTS13 modula el crecimiento de los trombos sólo cuando las plaquetas del trombo expresan una integrina beta3 activa. En estas condiciones experimentales *in vitro* e *in vivo*, la carencia en ADAMTS13 no favorece el crecimiento de trombos si la integrina mayor de plaquetas está ausente o se ha inhibido (Figura 6).

Para inhibir el crecimiento rápido de los trombos observados en los ratones *Adamts13* *-/-*, se infundió ADAMTS13r-hu en ratones *Adamts13* *-/-* y WT antes de la lesión. El efecto antitrombótico del ADAMTS13r-hu, aunque muy significativo estadísticamente, variaba entre los animales (Figura 7A y 7B). Algunos ratones no respondieron al tratamiento con ADAMTS13r-hu. Es posible que en estos ratones, la ADAMTS13r-hu se inactivara proteolíticamente por la trombina y la plasmina producidas en los lugares de lesión vascular. Se liberaron IL-6 y cantidades elevadas de vWF después de que la inflamación o la lesión pudieran reducir también la actividad de ADAMTS13. En los vasos que no se ocluyeron, se observa un fenómeno de desintegración y reformación de trombos (Figura 7C). Estos descubrimientos demuestran que la ADAMTS13 tiene actividad tanto antitrombótica como trombolítica. Un mecanismo posible es que la ADAMTS13 cliva los multímeros de vWF-UL en fragmentos más pequeños, que son menos adherentes, o cliva directamente las plaquetas que forman puente con las moléculas de vWF en un trombo, como es el caso en el clivaje de plaquetas unidas a hebras. *In vivo*, la ADAMTS13 es activa en condiciones tanto de alto esfuerzo cortante arterial como de bajo esfuerzo cortante venoso. Cliva hebras plaquetarias y regula la interacción plaquetaria con la pared "activada" del vaso en las vénulas, impide los trombos en microvénulas activadas y modula la respuesta trombótica en arteriolas lesionadas.

Los pacientes de PTT congénita son tratados actualmente por intercambio plasmático, mientras que los pacientes con PTT adquirida son sometidos a plasmaféresis, en la que los autoanticuerpos son eliminados del plasma. El efecto antitrombótico y trombolítico de la proteína de ADAMTS13 indica que, aparte de la PTT, se puede utilizar por ejemplo ADAMTS13 recombinante para tratar pacientes que sufren de trastornos trombóticos debidos a defectos hereditarios, enfermedad inflamatoria, condiciones sépticas o trombosis venosa, por ejemplo trombosis venosa profunda o embolismo pulmonar. La actividad trombolítica de ADAMTS13 demuestra que esta proteína puede utilizarse en combinación con otras terapias para desintegrar trombos en arterias obstruidas o después de un derrame cerebral menor.

En resumen, los datos experimentales demuestran que la metaloproteasa ADAMTS13 regula negativamente la trombosis, lo que indica que la molécula tiene actividad antitrombótica. Por tanto, se puede utilizar la proteína de ADAMTS13 recombinante humana con actividad trombolítica como agente terapéutico para tratar trastornos trombóticos.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que tiene actividad trombolítica, que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de una molécula quimérica que incluye ADAMTS13 e Ig.
- 5 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además un agente antitrombótico seleccionado de entre el grupo consistente en antiplaquetas, t-PA, aspirina y heparina.
3. Molécula quimérica que comprende ADAMTS13 e Ig para su utilización en el tratamiento o la prevención de un trastorno asociado a la formación y/o presencia de uno o más trombos.
- 10 4. Molécula quimérica según la reivindicación 3, caracterizada porque el trastorno se selecciona de entre el grupo consistente en púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) hereditaria, PTT adquirida, trombosis arterial, infarto agudo de miocardio (AMI), derrame cerebral, sepsis, coagulación intravascular diseminada (DIC) y trombosis venosa, por ejemplo trombosis venosa profunda o embolismo pulmonar.
5. Molécula quimérica que comprende ADAMTS13 e Ig para su utilización en la desintegración de uno o más trombos en un paciente que lo necesita.
- 15 6. Molécula quimérica según una de entre las reivindicaciones 3 ó 5, caracterizada porque una cantidad farmacéuticamente efectiva de la molécula quimérica que comprende ADAMTS13 e Ig oscila entre 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal.

Figura 1

Formación de microtrombos en ratones *Adamts13*^{-/-} después de superfusión con A23187

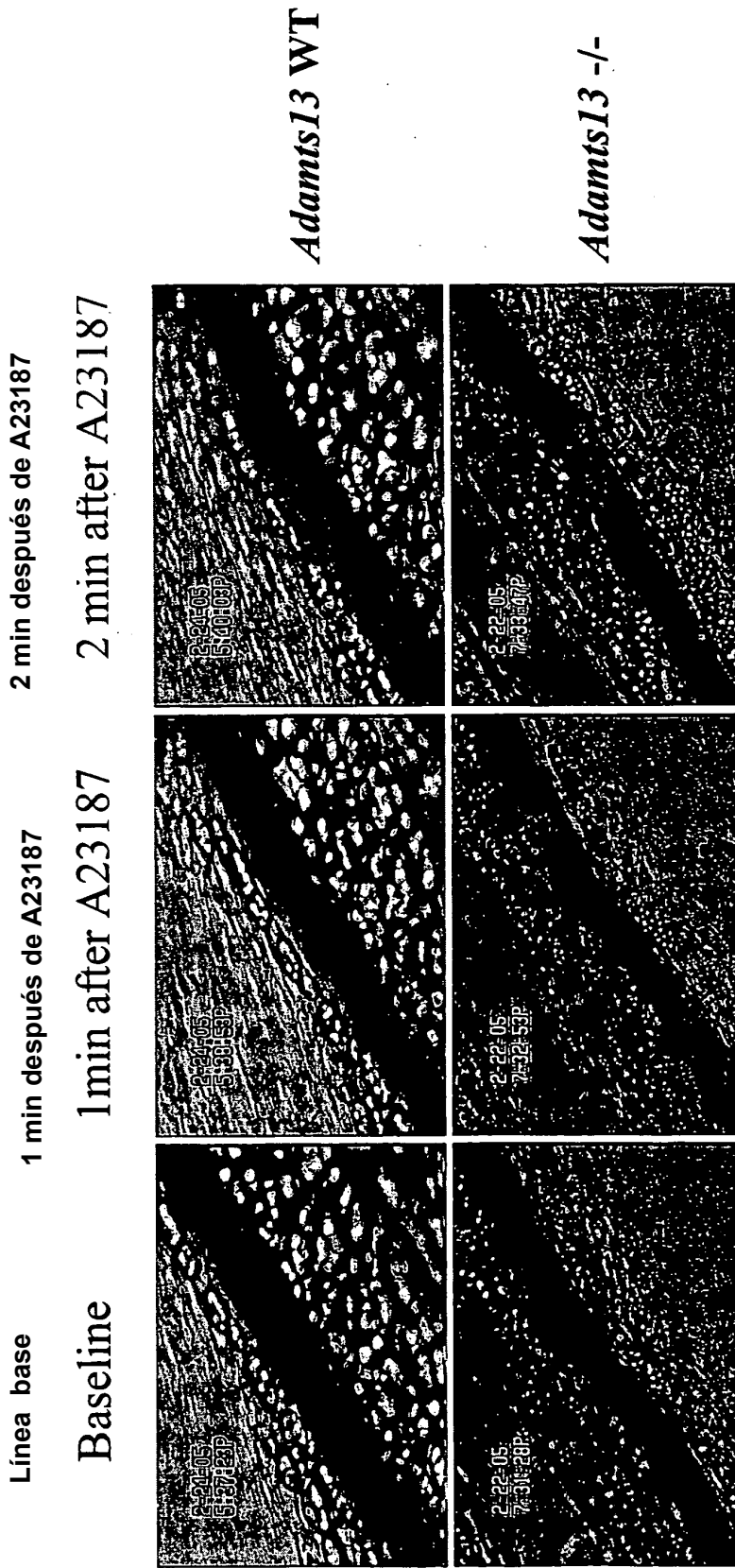
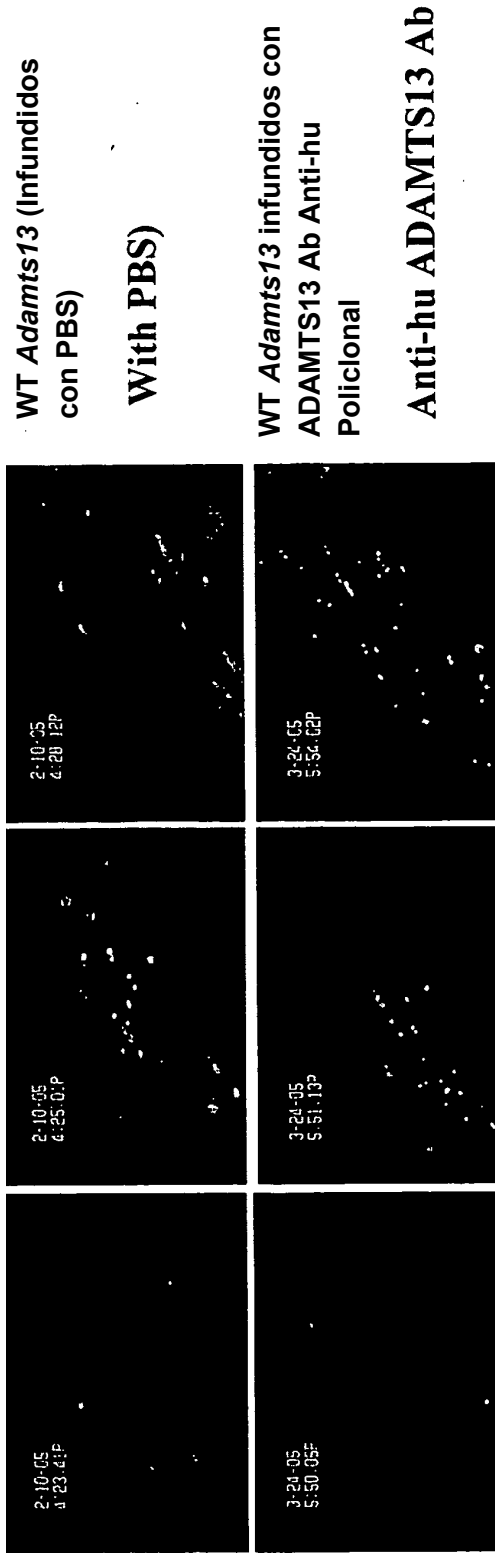


Figura 2

A. La infusión de ratones WT con ADAMTS13 Ab Anti-hu Policlonal imita el fenotipo *Adamts13* -/-



B. Las Hebras Plaquetarias se anclan al endotelio durante 10 segundos en WT infundidos con ADAMTS13 Ab Anti-hu Policlonal similar a los ratones *Adamts13* -/- Noqueados

Anti-hu ADAMTS13 Ab similar to *Adamts13* -/- KU mice



Figura 3
ADAMTS13 Anti-hu Policlonal induce los trombos en las microvénulas de ratones WT después de la infusión de A23187

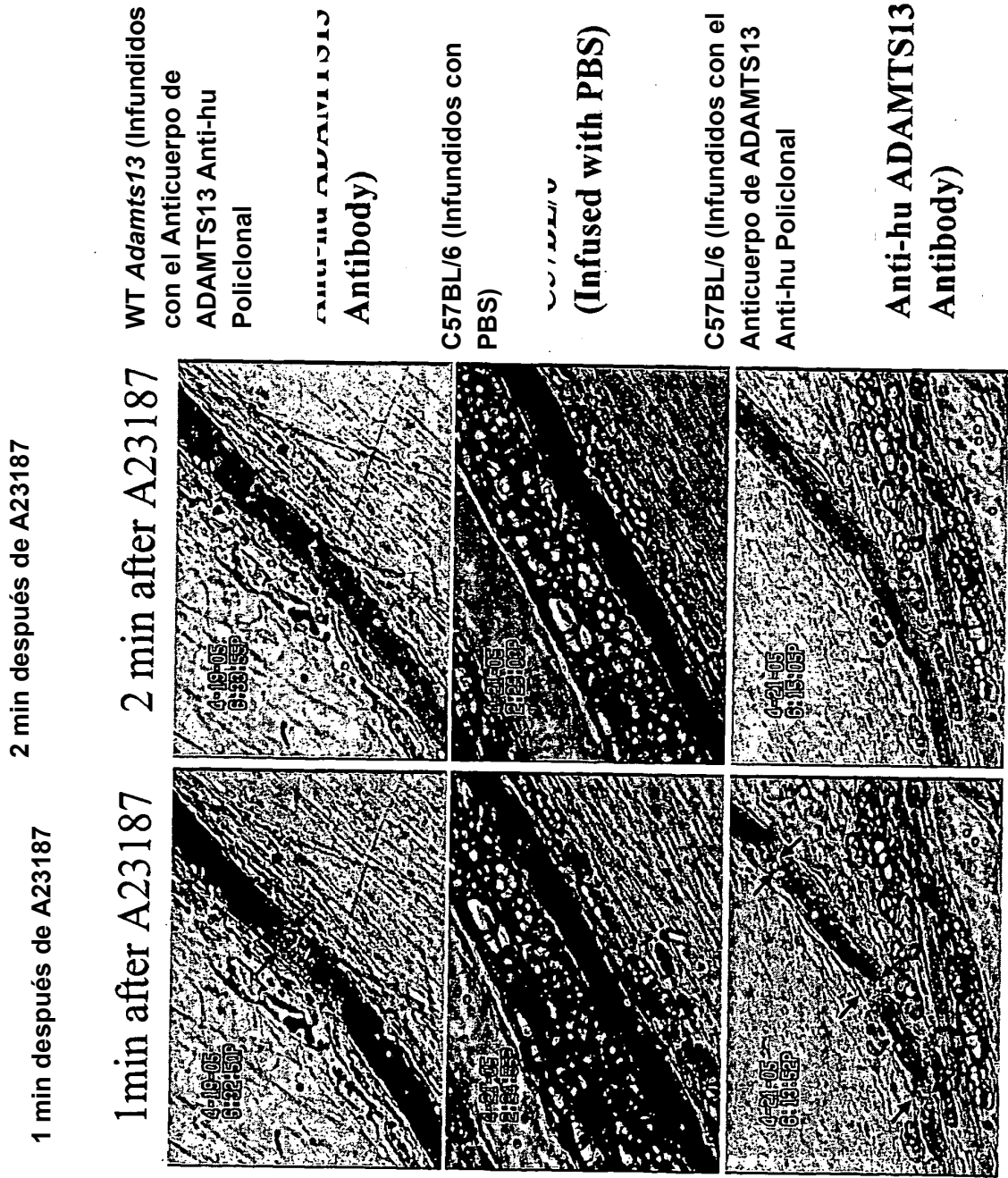


Figura 4

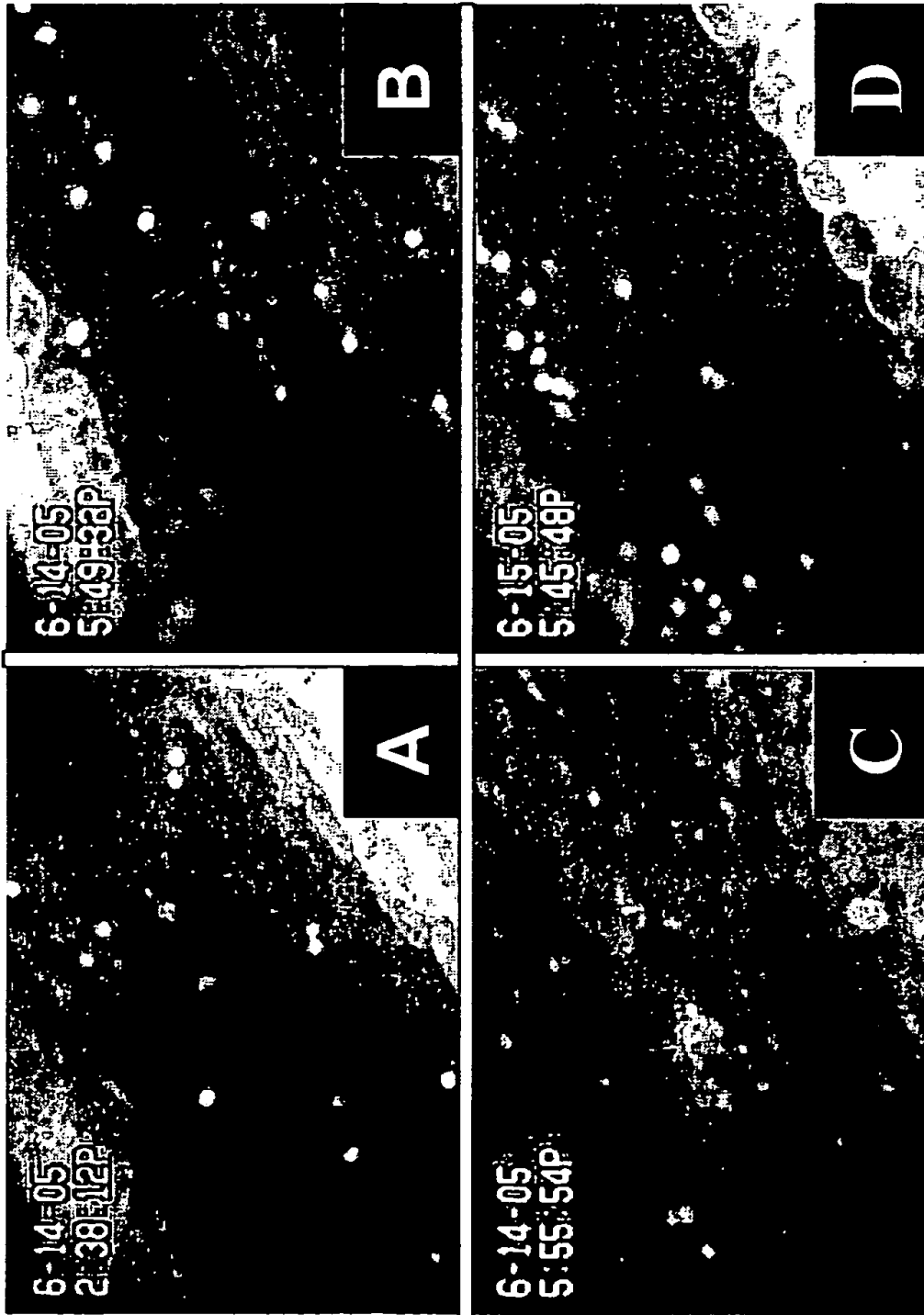


Figura 5

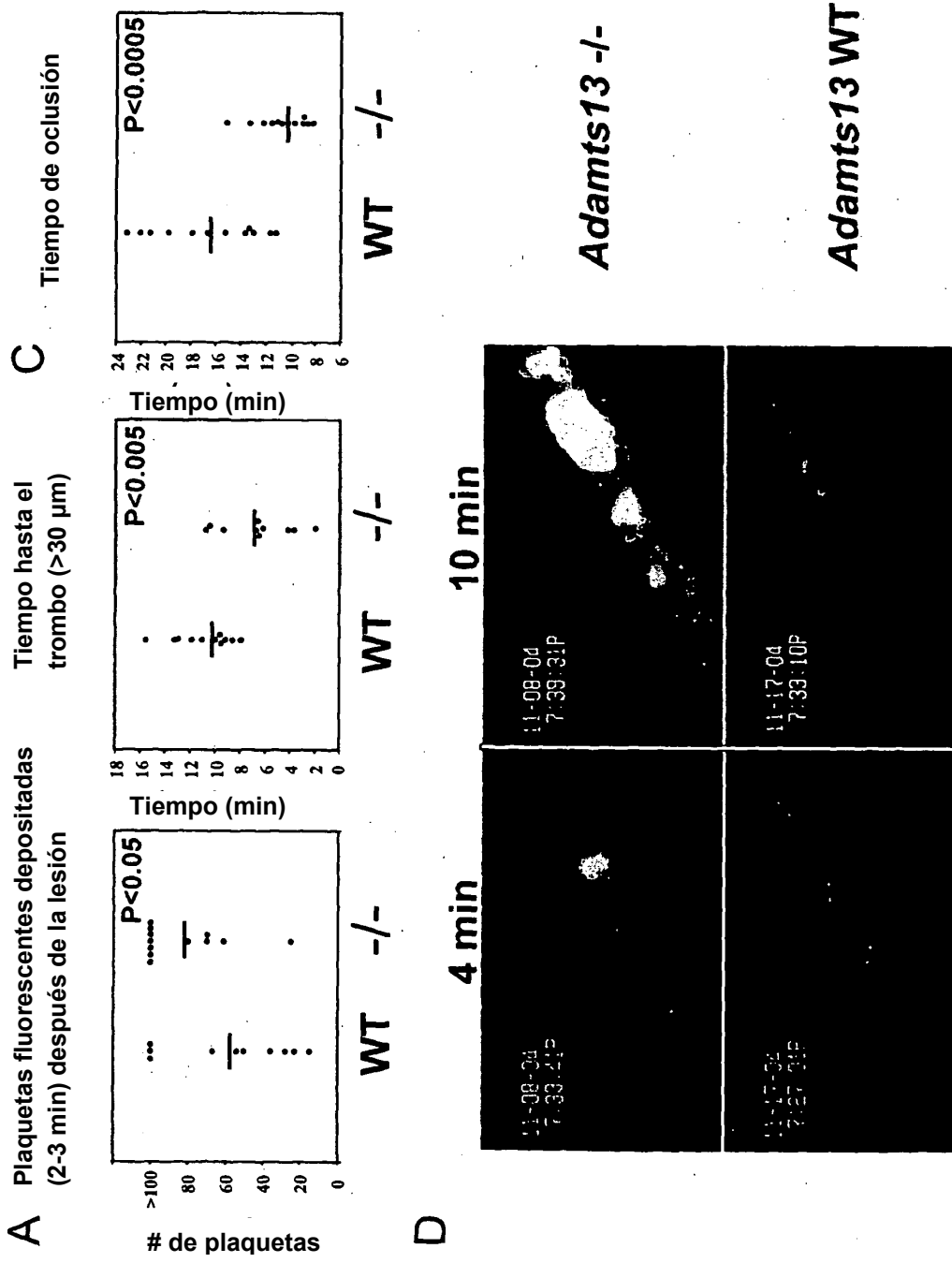


Figura 6

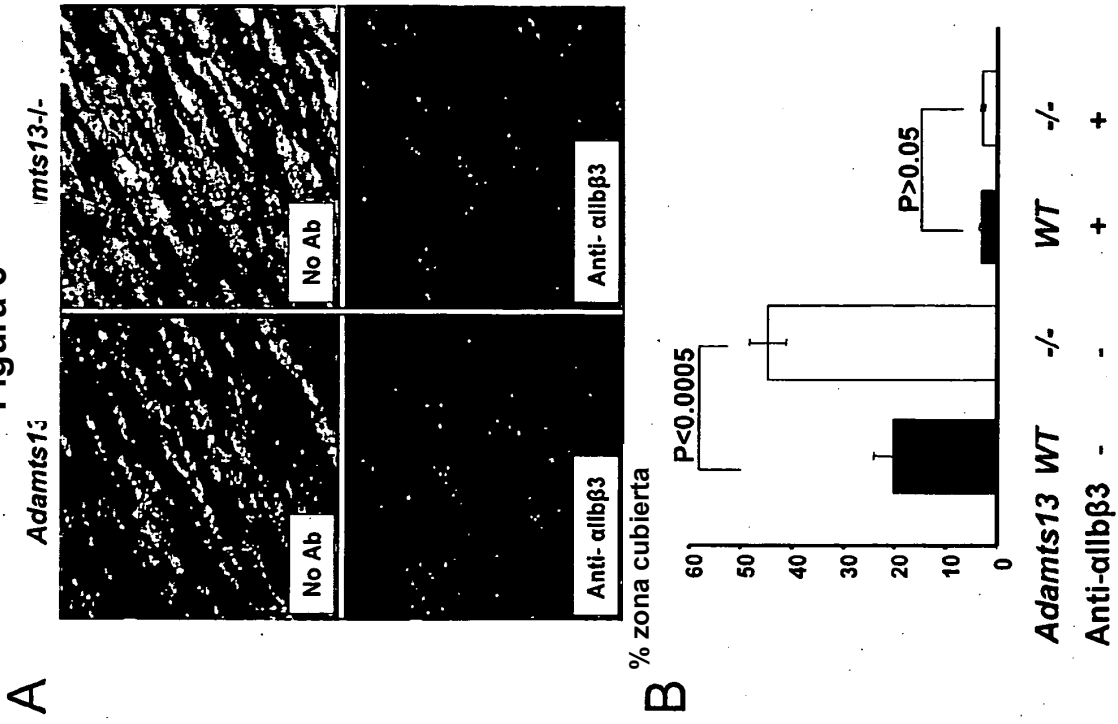


Figura 7

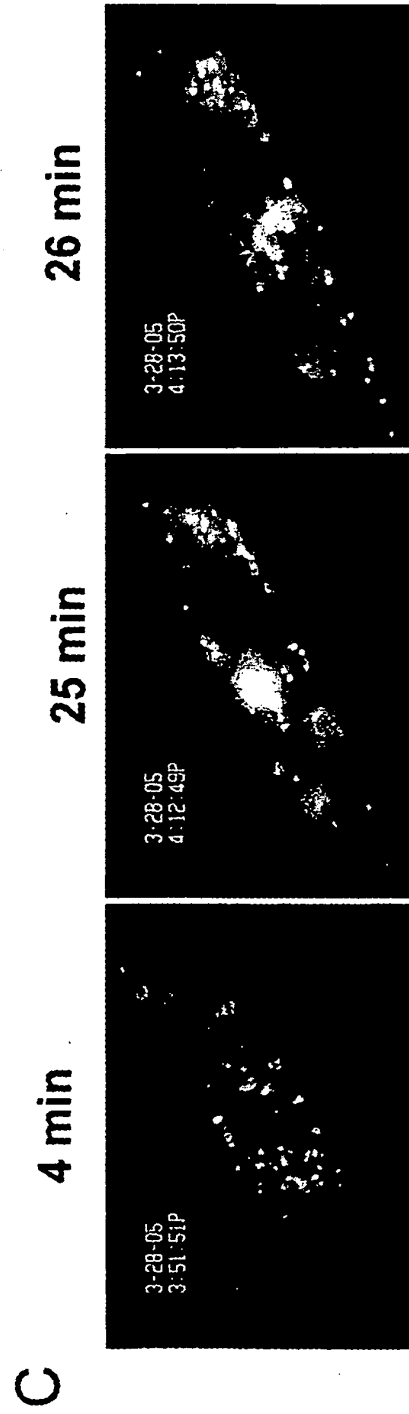
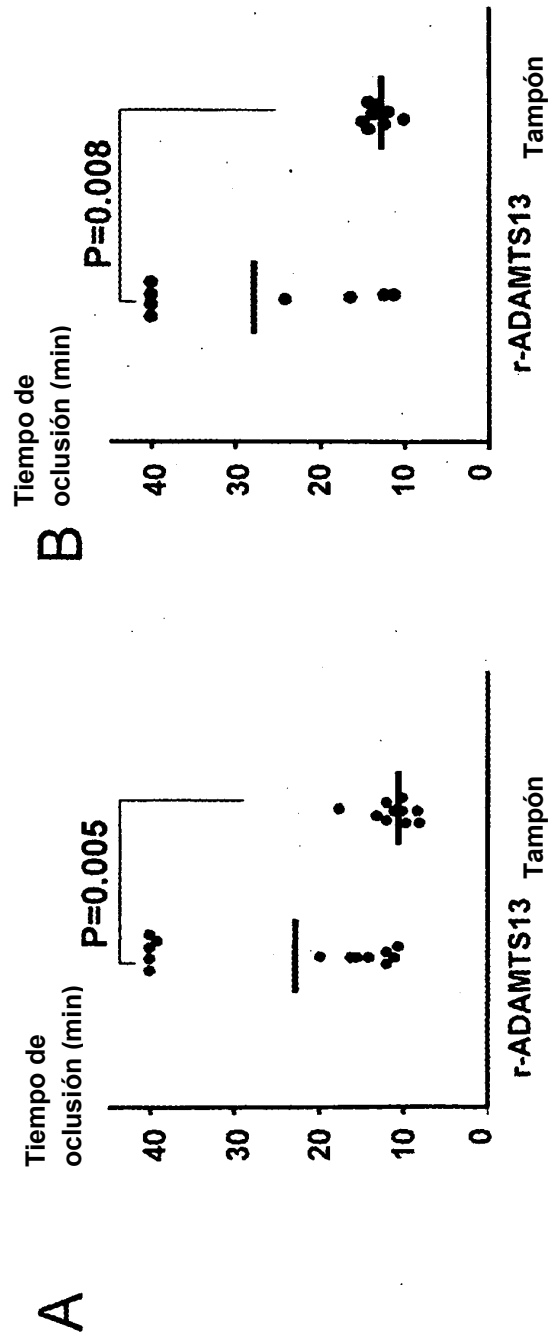
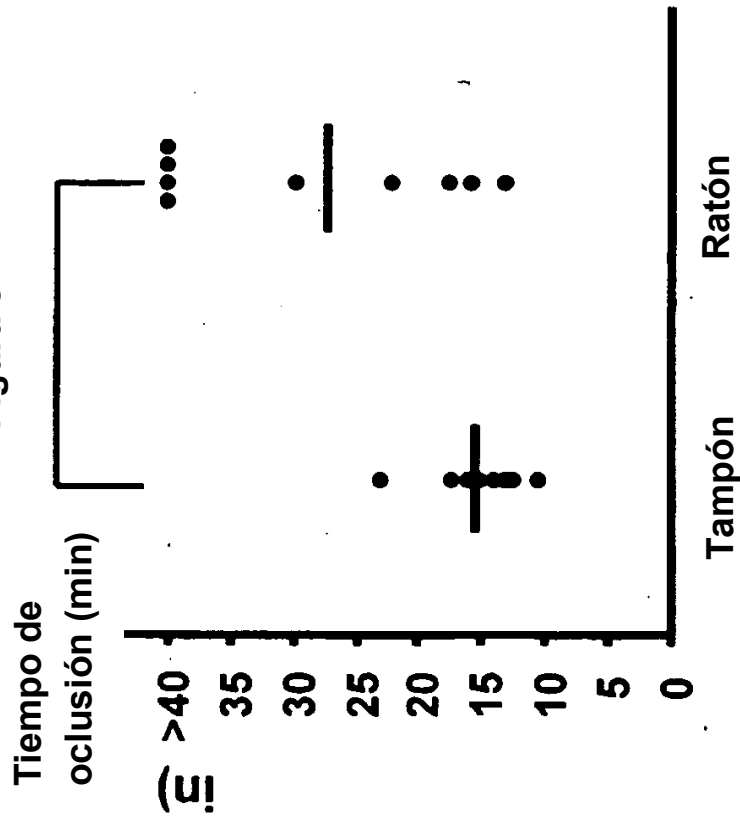


Figura 8



r-ADAMTS13

Figura 9

Tabla 1. Características hemodinámicas de vénulas activadas por A23187

Genotipo	Diámetro Vénula (μm)	Velocidad en la línea central (mm/s)	Velocidad de corte (s^{-1})
<i>Adamts13</i> WT (n=5)	31.51 \pm 1.79	1.43 \pm 0.07	213 \pm 14.10
<i>Adamts13</i> -/- (n=5)	26.36 \pm 1.95	1.28 \pm 0.13	244 \pm 28.29

Tabla 2. Características hemodinámicas de arteriolas lesionadas con FeCl_3

Genotipo	Diámetro Arteriola (μm)	Velocidad en la línea central (mm/s)	Velocidad de corte (s^{-1})
<i>Adamts13</i> WT (n=12)	103.91 \pm 9.29	33.33 \pm 1.72	1688.16 \pm 143.32
<i>Adamts13</i> -/- (n=12)	93.26 \pm 10.48	28.05 \pm 2.10	1646.83 \pm 157.16