

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 277**

51 Int. Cl.:

A61K 31/737 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2005 E 05765950 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1748781**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento de trastornos hemorrágicos utilizando polisacáridos sulfatados**

30 Prioridad:

27.05.2004 US 574845 P

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

27.03.2013

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US y
BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

JOHNSON, KIRK, W.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 399 277 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

Procedimientos de tratamiento de trastornos hemorrágicos utilizando polisacáridos sulfatados

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al tratamiento de trastornos hemorrágicos, incluyendo los trastornos de coagulación congénitos, los trastornos de coagulación adquiridos y los procesos hemorrágicos inducidos por traumatismos. En particular, la presente invención se refiere al uso de polisacáridos sulfatados no anticoagulantes (PSNA) para mejorar la coagulación y la hemostasia en procesos hemofílicos.

Antecedentes

10 La coagulación normal de la sangre es un proceso fisiológico y bioquímico complejo que implica la activación de una cascada de factores de coagulación que conduce a la formación de fibrina y a la agregación plaquetaria a la vez que se produce vasoconstricción local (revisado por Davie y col., Biochemistry 30: 10363, 1991). La cascada de coagulación está compuesta por una ruta "extrínseca" que se piensa que es el medio principal por el que se inicia la coagulación normal y una ruta "intrínseca" que contribuye a la respuesta de coagulación expandida. La respuesta normal a una lesión sangrante implica la activación de la ruta extrínseca. La activación de la ruta extrínseca se inicia cuando la sangre entra en contacto con el factor tisular (TF), un cofactor para el factor VII que se expone o expresa en los tejidos a continuación de la lesión. El TF forma un complejo con el FVII que facilita la producción de FVIIa. El FVIIa entonces se asocia con el TF para convertir el FX en la serín proteasa FXa, que es un componente crítico del complejo protrombinasa. La conversión de protrombina en trombina por el complejo FXa/FVa/calcio/fosfolípidos estimula la formación de fibrina y la activación de las plaquetas, todo lo cual es esencial para la coagulación normal de la sangre. La hemostasia normal se mejora además por los factores de la ruta intrínseca IXa y VIIIa, que también convierten el FX en FXa.

25 En los trastornos hemorrágicos la coagulación de la sangre es inadecuada, lo que puede estar causado por trastornos congénitos de la coagulación, trastornos adquiridos de la coagulación, o procesos hemorrágicos inducidos por un traumatismo. El sangrado es una de las manifestaciones más serias y significativas de enfermedad, y puede ocurrir en un sitio local o ser generalizado. El sangrado localizado puede asociarse con lesiones y puede complicarse adicionalmente por un defecto del mecanismo hemostático. Las deficiencias congénitas o adquiridas de cualquiera de los factores de coagulación se pueden asociar con una tendencia a la hemorragia. Los trastornos congénitos de la coagulación incluyen la hemofilia, un trastorno ligado al cromosoma X recesivo que implica una deficiencia del factor VIII de la coagulación (hemofilia A) o del factor IX (hemofilia B) y la enfermedad de von Willebrand, un trastorno hemorrágico raro que implica una severa deficiencia del factor de von Willebrand. Los trastornos de la coagulación adquiridos pueden aparecer en individuos sin una historia previa de sangrado como resultado del proceso de una enfermedad. Por ejemplo, los trastornos adquiridos de la coagulación pueden estar causados por inhibidores o autoinmunidad contra factores de coagulación de la sangre tales como el factor VIII, el factor de von Willebrand, los factores IX, V, XI, XII, y XIII; o por trastornos hemostáticos tales como los causados por enfermedades hepáticas, que pueden estar asociadas con el descenso de la síntesis de factores de coagulación. Las deficiencias de factores de coagulación se tratan típicamente por reemplazo de factores, lo que es caro, inconveniente (intravenoso) y no siempre eficaz. Hasta el 20% de los pacientes que reciben terapia crónica de reemplazo de factores puede generar anticuerpos que neutralizan los factores de reemplazo.

40 Por tanto, existe la necesidad de nuevas aproximaciones terapéuticas para tratar los trastornos hemorrágicos. Un único agente farmacéutico que sea seguro, conveniente y eficaz en un amplio número de trastornos de sangrado impactaría favorablemente en la práctica clínica.

Sumario de la invención

45 La presente invención proporciona procedimientos y composiciones para mejorar la coagulación de la sangre y la inhibición de la actividad del TFPI con el uso de polisacáridos sulfatados no anticoagulantes (PSNA) como procoagulantes. Los PSNA pueden administrarse como agentes únicos, o en combinación con otro o con otros agentes hemostáticos. En particular, se describe el uso de PSNA en el tratamiento de trastornos hemorrágicos, incluyendo trastornos congénitos de la coagulación, trastornos adquiridos de la coagulación, y procesos hemorrágicos inducidos por traumatismos. En un aspecto, la invención proporciona un uso de un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA) en la fabricación de una composición para tratar a un sujeto que necesite una mejora de la coagulación sanguínea, en el que dicho PSNA presenta una actividad anticoagulante en un ensayo de coagulación de tiempo de protrombina diluida (dPT) o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) que no es más de un tercio de la actividad anticoagulante molar de heparina no fraccionada, y además en el que el PSNA se selecciona del fucoidán o un fragmento del mismo, la N-acetil-heparina (NAH), heparina N-acetil-des-O-sulfatada (NA-de-os-SH), heparina des-N-sulfatada (De-NSH), heparina des-N-sulfatada-acetilada (De-NSAH), pentosano polisulfato (PPS), condroitín sulfato o dermatán sulfato.

55 En otras realizaciones, el PSNA puede estar coadministrado con uno o más PSNA diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos.

En ciertas realizaciones, un PSNA se administra a un sujeto para tratar un trastorno hemorrágico seleccionado del grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de contacto, tales como el Factor XI, el Factor XII, precalicreína, y quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), una deficiencia de uno o más factores asociados con sangrado clínicamente significativo, tales como el Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XIII, Factor II (hipoprotrombinemia), y factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, incluyendo la afibrinogenemia, hipofibrinogenemia, y disfibrinogenemia, una deficiencia de α_2 -antiplasmina, un excesivo sangrado tal como el causado por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismos, hipotermia, menstruación, y gestación.

En ciertas realizaciones, un PSNA se administra a un sujeto para tratar un trastorno congénito de la coagulación o un trastorno adquirido de la coagulación causados por una deficiencia de un factor sanguíneo. La deficiencia del factor sanguíneo puede estar causada por la deficiencia de uno o más factores, incluyendo, pero sin limitarse a estos, el factor V, el factor VII, el factor VIII, el factor IX, el factor XI, el factor XII, el factor XIII, y el factor de von Willebrand.

En ciertas realizaciones, al sujeto que tiene un trastorno hemorrágico se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un PSNA en combinación con otro agente terapéutico. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un PSNA y uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en el factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa, y factor de von Willebrand. El tratamiento puede además comprender la administración de un procoagulante tal como la trombina; un activador de la ruta intrínseca de la coagulación, incluyendo el factor Xa, el factor IXa, el factor XIa, el factor XIIa, y VIIIa, la precalicreína, y el quinínogeno de alto peso molecular; o un activador de la ruta extrínseca de la coagulación, incluyendo el factor tisular, el factor VIIa, el factor Va, y el factor Xa. Los agentes terapéuticos que se usan para tratar a un sujeto que tiene un trastorno hemorrágico pueden administrarse en la misma o en diferentes composiciones y a la vez, antes o después de la administración de un PSNA.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso anterior para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA). En ciertas realizaciones, el sujeto puede haber sido tratado con un anticoagulante incluyendo, pero si limitarse a estos, heparina, un derivado cumarínico, tal como la warfarina o el dicumarol, un inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), antitrombina III, anticoagulante lúpico, péptido anticoagulante de nematodo (NAPc2), factor VIIa bloqueado en el sitio activo (factor VIIai), inhibidores del factor IXa, inhibidores del factor Xa, incluyendo el fondaparinux, idraparinux, DX-9065a y razaxabán (DPC906), inhibidores de los factores Va y VIIa, incluyendo la proteína C activada (APC) y trombomodulina soluble, inhibidores de la trombina, incluyendo la hirudina, bivalirudina, argatrobán, y ximelagatrán. En ciertas realizaciones, el anticoagulante en el sujeto puede ser un anticuerpo que se une a un factor de coagulación, incluyendo pero sin limitarse a estos, un anticuerpo que se une al Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XIII, Factor II, Factor XI, Factor XII, factor de von Willebrand, precalicreína, o quinínogeno de alto peso molecular (QAPM).

En ciertas realizaciones, un PSNA puede coadministrarse con uno o más PSNA diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un PSNA y uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en el factor XI, factor XII, la precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, Factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa, y factor de von Willebrand. El tratamiento puede además comprender la administración de un procoagulante, tal como un activador de la ruta intrínseca de coagulación, incluyendo el factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa, precalicreína, y quinínogeno de alto peso molecular; o un activador de la ruta extrínseca de coagulación, incluyendo el factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa. Los agentes terapéuticos utilizados en combinación con un PSNA para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto pueden administrarse en la misma o en diferentes composiciones y a la vez, antes o después de la administración del PSNA.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso anterior para tratar a un sujeto que ha sufrido un procedimiento invasivo o quirúrgico en el que sería deseable mejorar la coagulación sanguínea, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA). En ciertas realizaciones, el PSNA puede coadministrarse con uno o más PSNA diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos al sujeto que se ha sometido a un procedimiento invasivo o quirúrgico. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa, y factor de von Willebrand. El tratamiento además puede comprender la administración de un procoagulante, tal como un activador de la ruta intrínseca de coagulación, incluyendo el factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa, precalicreína, y quinínogeno de alto peso molecular; o un activador de la ruta extrínseca de coagulación, incluyendo el factor

tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa. Los agentes terapéuticos que se usan para tratar a un sujeto que se somete a un procedimiento invasivo o quirúrgico, se pueden administrar en la misma o en diferentes composiciones y a la vez, antes, o después de la administración del PSNA.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* de inhibición de la actividad del TFPI en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento la combinación de la muestra biológica (por ejemplo, sangre o plasma) con una cantidad suficiente de un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA) para inhibir la actividad del TFPI.

10 En otro aspecto, la invención proporciona una composición inyectable para mejorar la coagulación de la sangre que comprende: un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA); en la que dicho PSNA muestra una actividad anticoagulante en un ensayo de coagulación de tiempo de protrombina diluida (dPT) o de tiempo de tromboplastina parcial activada que no es más de un tercio de la actividad anticoagulante molar de la heparina no fraccionada, y además en la que el PSNA se selecciona de fucoidán o un fragmento del mismo, N-acetil-heparina (NAH), heparina N-acetil-des-O-sulfatada (NA-de-os-SH), heparina des-N-sulfatada (De-NSH), heparina des-N-sulfatada-acetilada (De-NSAH), pentosano polisulfato (PPS), condroitín sulfato o dermatán sulfato; un excipiente farmacéuticamente aceptable; y uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, y factor de von Willebrand, factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa. En ciertas realizaciones, la composición puede comprender además uno o más PSNA diferentes, y/o uno o más agentes terapéuticos, y/o reactivos. Por ejemplo, la composición puede comprender además uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, y factor de von Willebrand, factor tisular, factor VIIa, factor Va, and factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa; y/o uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste en reactivo APTT, tromboplastina, fibrina, TFPI, veneno de víbora de Russell, partículas de sílice micronizada, ácido elálgico, sulfátidos, y caolín.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* de medición de la aceleración de la coagulación por el PSNA en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:

- a) la combinación de la muestra biológica con una composición que comprende el PSNA, como se define en la reivindicación 20;
- b) la medición del tiempo de coagulación de la muestra biológica,
- 30 c) la comparación del tiempo de coagulación de la muestra biológica con el tiempo de coagulación de una muestra biológica correspondiente que no se expone al PSNA, en la que un descenso del tiempo de coagulación de la muestra biológica expuesta al PSNA, si se observa, es indicativo de que el PSNA acelera la coagulación.

35 En ciertas realizaciones, se pueden añadir uno o más PSNA y/o agentes terapéuticos, y/o reactivos diferentes a la muestra biológica para las mediciones del tiempo de coagulación. Por ejemplo, se pueden añadir uno o más factores, incluyendo pero sin estar limitados a estos, factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, y factor de von Willebrand, factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa; y/o uno o más reactivos que incluyen, pero sin estar limitados a estos, reactivo APTT, tromboplastina, fibrina, TFPI, veneno de víbora de Russell, partículas de sílice micronizada, ácido elálgico, sulfátidos, y caolín.

A los expertos en la materia se les ocurrirán fácilmente estas y otras realizaciones de la invención objeto en vista de la divulgación del presente documento.

Breve descripción de las figuras

45 La figura 1 muestra el incremento en el tiempo de coagulación determinado por ensayo de dPT del plasma en hemofilia A (Hem-A) en presencia del inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI). Un gráfico del tiempo de coagulación (en segundos) frente a la concentración del TFPI ($\mu\text{g/ml}$) muestra que el tiempo de coagulación se incrementa linealmente con la dosis de TFPI.

50 La figura 2 compara las actividades anticoagulantes de PSNA potenciales, N-acetil-heparina (NAH), heparina N-acetil-des-O-sulfatada (NA-de-O-SH), heparina des-N-sulfatada (De-N-SH), heparina des-N-sulfatada-acetilada (De-N-SAH), pentosano polisulfato (PPS), fucoidán, y heparina. Los polisacáridos seleccionados se ensayaron a varias concentraciones en plasma Hem-A. La figura 2 muestra un gráfico del tiempo de coagulación (en segundos) frente a la concentración del PSNA (nM). Los puntos de datos que se muestran son los valores medios de las mediciones realizadas por duplicado.

55 La figura 3 compara los efectos de NAH, PPS, fucoidán, y heparina sobre el tiempo de coagulación del plasma Hem-A que contiene un 1,25% de FACT, determinado usando el ensayo de aPTT. La figura 3 muestra un gráfico del tiempo de coagulación (en segundos) frente a la concentración del PSNA (nM). Los puntos de datos que se muestran son los valores medios de mediciones realizadas por duplicado.

La figura 4 muestra que los PSNA, incluyendo NAH, PPS, y fucoidán aceleran la coagulación del plasma Hem-A que contiene TFPI recombinante. Los PSNA se preincubaron brevemente con TFPI antes de la adición al

plasma. Los tiempos de coagulación se determinaron con el uso del ensayo de dPT. Se muestra un gráfico del tiempo de coagulación (en segundos) frente a la concentración del PSNA (nM). Los puntos de los datos que se muestran son valores medios de mediciones realizadas por duplicado. La inhibición de la actividad del TFPI por el PSNA da como resultado tiempos reducidos de coagulación del plasma.

La figura 5 muestra que los PSNA, incluyendo NAH, PPS, y fucoidán aceleran la coagulación del plasma de hemofilia B (Hem-B) que contiene TFPI recombinante. Los PSNA se preincubaron brevemente con TFPI antes de la adición al plasma. Los tiempos de coagulación se determinaron usando el ensayo de dPT. Se muestra un gráfico del tiempo de coagulación (en segundos) frente a la concentración del PSNA (nM). Los puntos de datos que se muestran son valores medios de mediciones realizadas por duplicado. La inhibición de la actividad del TFPI por el PSNA da como resultado tiempos reducidos de coagulación del plasma.

La figura 6 muestra que el NAH, el PPS, y el fucoidán aceleran la coagulación del plasma Hem-A que contiene TFPI sin la preincubación de TPFPI con PSNA antes de la introducción del TFPI en el plasma. Se muestra un gráfico del tiempo de coagulación (en segundos) frente a la concentración del PSNA (nM). Los tiempos de coagulación se determinaron utilizando el ensayo de dPT. Los puntos de datos que se muestran son los valores medios de mediciones realizadas por duplicado.

La figura 7 muestra que el PPS y el fucoidán aceleran la coagulación del plasma Hem-A en ausencia de suplementación de TFPI exógeno. La respuesta con respecto a la dosis de PSNA se compara con un control positivo, el factor VIIa, para la amplificación de la activación de la ruta extrínseca. La figura 7 muestra un gráfico del tiempo de coagulación (en segundos) frente a la concentración de PSNA (nM). Los tiempos de coagulación se determinaron utilizando el ensayo de dPT. Los puntos de datos que se muestran son valores medios de mediciones realizadas por duplicado.

La figura 8 muestra que el fucoidán y PPS aceleran la coagulación del plasma deficiente de factor VII en ensayos de dPT. El tiempo de coagulación se midió a continuación de la preincubación del plasma deficiente de factor VII con varias concentraciones de fucoidán o PPS. La figura 8 muestra un gráfico de tiempo de coagulación (en segundos) frente a la concentración del PSNA (nM). Los puntos de datos que se muestran son valores medios de mediciones realizadas por duplicado.

Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, procedimientos convencionales de farmacología, química, bioquímica, coagulación, técnicas de ADN recombinante e inmunología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican totalmente en la literatura. Véase, por ejemplo, Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

I. Definiciones

En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica más adelante.

Se debe señalar que, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “uno”, “una”, “el” y “la” incluyen los referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a “un PSNA” incluye una mezcla de dos o más de estos agentes, y de forma similar.

Un “PSNA”, como se usa en el presente documento, se refiere a un polisacárido sulfatado que presenta una actividad anticoagulante en un ensayo de coagulación de tiempo de protrombina diluida (dPT) o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) que no es más de un tercio, y preferentemente menos de un décimo, de la actividad molar anticoagulante (aumento estadísticamente significativo en el tiempo de coagulación) de la heparina no fraccionada (intervalo de PM de 8.000 a 30.000; media 18.000 daltons). Los PSNA pueden purificarse y/o modificarse a partir de fuentes naturales (por ejemplo, algas pardas, corteza de árboles, tejidos animales) o puede sintetizarse *de novo* y puede variar en peso molecular de 100 daltons a 1.000.000 de daltons. Los PSNA pueden utilizarse en procedimientos de la invención para favorecer la hemostasia en el tratamiento de trastornos hemorrágicos, particularmente aquellos asociados con deficiencia de los factores de coagulación o para revertir los efectos de anticoagulantes. La capacidad de los PSNA para promover la coagulación y reducir el sangrado se determina fácilmente usando varios ensayos de coagulación *in vitro* (por ejemplo, ensayos de dPT y aPTT) y modelos hemorrágicos *in vivo* (por ejemplo, corte en la cola, corte transverso, tiempo de coagulación de sangre completa, o determinación del tiempo de sangrado de la cutícula en ratones o perros hemofílicos). Véase, por ejemplo, PDR Staff. Physicians' Desk Reference. 2004, Anderson y col. (1976) Thromb. Res. 9:575-580; Nordfang y col. (1991) Thromb Haemost. 66:464-467; Welsch y col. (1991) Thrombosis Research 64:213-222; Broze y col. (2001) Thromb Haemost 85:747-748; Scallan y col. (2003) Blood. 102:2031-2037; Pijnappels y col. (1986) Thromb. Haemost. 55:70-73; y Giles y col. (1982) Blood 60:727-730.

Un “procoagulante”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier factor o reactivo capaz de iniciar o acelerar la formación del coágulo. Un procoagulante de la invención incluye cualquier activador de las rutas intrínseca o extrínseca de la coagulación, tal como un factor coagulante seleccionado del grupo que consiste en

factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular, factor tisular, factor VIIa, y factor Va. Otros reactivos que promueven la coagulación incluyen la calicreína, el iniciador de la APTT (por ejemplo, un reactivo que contiene un fosfolípido y un activador de contacto), el veneno de la víbora de Russel (tiempo de RVV), y tromboplastina (para dPT). Los activadores de contacto que pueden usarse en los procedimientos de la invención como reactivos procoagulantes incluyen las partículas de sílice micronizada, el ácido eláxico, sulfátidos, caolín o similares conocidos por un experto en la materia. Los procoagulantes pueden provenir de un extracto natural en bruto, una muestra de sangre o plasma, o pueden ser un material aislado y sustancialmente purificado, sintético o recombinante. Los procoagulantes pueden incluir factores de coagulación naturales tal cual, o fragmentos, variantes o derivados modificados covalentemente de los mismos que retienen actividad biológica (es decir, promueven la coagulación). Las concentraciones óptimas del procoagulante pueden determinarse por un experto en la materia.

El término "polisacárido", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que comprende una pluralidad de (es decir, dos o más) restos de sacáridos ligados covalentemente. Los enlaces pueden ser naturales o no naturales. Los enlaces naturales incluyen, por ejemplo, los puentes glucosídicos, mientras que los enlaces no naturales pueden incluir, por ejemplo, restos de unión éster, amida u oxima. Los polisacáridos pueden tener cualquiera de una amplia variedad de valores de peso molecular (PM) medio, pero generalmente son de al menos aproximadamente 100 daltons. Por ejemplo, los polisacáridos pueden tener pesos moleculares de al menos aproximadamente 500, 1.000, 2.000, 4.000, 6.000, 8.000, 10.000, 20.000, 30.000, 50.000, 100.000, 500.000 daltons o incluso más altos. Los polisacáridos pueden tener una cadena lineal o estructuras ramificadas. Los polisacáridos pueden incluir fragmentos de polisacáridos generados por degradación (por ejemplo, hidrólisis) de polisacáridos más grandes. La degradación se puede producir por cualquiera de una variedad de medios conocidos por los expertos en la materia incluyendo el tratamiento de los polisacáridos con ácidos, bases, calor o enzimas que dan lugar a polisacáridos degradados. Los polisacáridos pueden alterarse químicamente y pueden tener modificaciones, incluyendo pero sin limitarse a estas, la sulfatación, polisulfatación, esterificación, y metilación.

La expresión "derivado de" se usa en el presente documento para identificar la fuente original de una molécula, pero se supone que no limita el procedimiento por el que se fabrica la molécula que puede ser, por ejemplo, por medio de síntesis química o medios recombinantes.

Los términos "variante", "análogo" y "muteína" se refieren a derivados biológicamente activos de la molécula de referencia, que retienen la actividad deseada, tal como la actividad coagulante en el tratamiento de un trastorno hemorrágico descrito en el presente documento. En general, los términos "variante" y "análogo" en referencia a un polipéptido (por ejemplo, un factor coagulante) se refieren a compuestos que tienen una secuencia y estructura polipeptídica nativa con adiciones, sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa) y/o deleciones de uno o más aminoácidos, con respecto a la molécula nativa, en tanto en cuanto las modificaciones no destruyan la actividad biológica, y que son "sustancialmente homólogos" a la molécula de referencia como se define más adelante. En general, las secuencias de aminoácidos de dichos análogos tendrán un alto grado de homología de secuencia con la secuencia de referencia, por ejemplo, una homología de secuencia de aminoácidos de más del 50%, generalmente más del 60%-70%, incluso más particularmente del 80%-85% o más, tal como al menos el 90%-95% o más, cuando las dos secuencias se alinean. A menudo, los análogos incluirán el mismo número de aminoácidos, pero incluirán sustituciones, como se explica en el presente documento. El término "muteína" además incluye polipéptidos que tienen uno o más moléculas similares a aminoácidos que incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, compuestos que comprenden moléculas solo con grupos amino y/o imino, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, moléculas tanto naturales como no naturales (por ejemplo, sintéticas), cicladas, ramificadas, y similares. El término también incluye moléculas que comprenden uno o más restos de glicina N-sustituída (un "peptide") y otros aminoácidos o péptidos sintéticos. (Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.831.005; 5.877.278; y 5.977.301; Nguyen y col., Chem Biol. (2000) 7:463-473; y Simon y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:9367-9371 para la descripción de peptoides). Preferentemente, el análogo o la muteína tienen al menos la misma actividad coagulante que la molécula nativa. Los procedimientos para fabricar análogos de polipéptidos y muteínas se conocen en la técnica y se describen con más detalle más adelante.

Como se explicó anteriormente, los análogos generalmente incluyen sustituciones que son de naturaleza conservativa, es decir, las sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Específicamente, los aminoácidos generalmente se dividen en cuatro familias: (1) ácidos - aspartato y glutamato; (2) básicos - lisina, arginina, histidina; (3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados - glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es predecible razonablemente que un remplazo aislado de leucina con isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un remplazo conservativo similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o incluso hasta aproximadamente 15-25 sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas o cualquier número entero entre 5-25, siempre que la función deseada de la molécula permanezca intacta. Un experto en la materia puede determinar fácilmente regiones de la molécula de interés que pueden tolerar cambios por referencia a los gráficos de Hopp/Woods y Kyte-Doolittle, bien

conocidos en la técnica.

Por "derivado" se pretende expresar cualquier modificación adecuada de la molécula de referencia de interés o de un análogo de la misma, tal como sulfatación, acetilación, glucosilación, fosforilación, conjugación con polímeros (tal como con polietilenglicol), u otra adición de restos extraños, siempre que se retenga la actividad biológica deseada (por ejemplo, actividad coagulante, inhibición de actividad de TFPI) de la molécula de referencia. Por ejemplo, los polisacáridos pueden modificarse con uno o más grupos orgánicos o inorgánicos. Los ejemplos incluyen polisacáridos sustituidos al menos en un grupo hidroxilo con otro resto (por ejemplo, un grupo sulfato, carboxilo, fosfato, amino, nitrilo, halo, sililo, amido, acilo, alifático, aromático, o un grupo sacárido), o donde un oxígeno del anillo se ha remplazado por azufre, nitrógeno, un grupo metileno, etc. Los polisacáridos pueden estar químicamente alterados, por ejemplo, para mejorar la función procoagulante. Tales modificaciones pueden incluir, pero sin limitarse a estas, sulfatación, polisulfatación, esterificación, y metilación. Los procedimientos para fabricar análogos y derivados están disponibles generalmente en la técnica.

Por "fragmento" se entiende una molécula que consiste en solo una parte de la secuencia y estructura de longitud total intactas. Un fragmento de un polisacárido puede generarse por degradación (por ejemplo, hidrólisis) de un polisacárido más grande. Los fragmentos activos de un polisacárido generalmente incluirán al menos aproximadamente 2-20 unidades de sacárido del polisacárido de longitud total, preferentemente al menos aproximadamente 5-10 unidades de sacárido de la molécula de longitud completa, o cualquier número entero entre 2 unidades de sacárido y la molécula de longitud total, siempre que el fragmento en cuestión retenga actividad biológica, tal como la actividad de coagulación y/o la capacidad para inhibir la actividad del TPII. Un fragmento de un polipéptido puede incluir una deleción C-terminal, una deleción N-terminal, y/o una deleción interna del polipéptido nativo. Los fragmentos activos de una proteína particular generalmente incluirán al menos aproximadamente 5-10 restos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud total, preferentemente al menos aproximadamente 15-25 restos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud total, y aún más preferentemente al menos aproximadamente 20-50 o más restos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud total, o cualquier número entero entre 5 aminoácidos y la secuencia de longitud total, siempre que el fragmento en cuestión retenga la actividad biológica, tal como actividad de coagulación, como se define en el presente documento.

"Sustancialmente purificado" generalmente se refiere al aislamiento de una sustancia (por ejemplo, un polisacárido sulfatado) de forma que la sustancia constituya el mayor porcentaje de la muestra en que reside. Típicamente, en una muestra sustancialmente purificada, el componente constituye el 50%, preferentemente el 80%-85%, más preferentemente el 90%-95% de la muestra. Las técnicas de purificación de polisacáridos, polinucleótidos, y polipéptidos de interés se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y sedimentación de acuerdo con la densidad.

Por "aislado" se entiende, cuando se refiere a un polisacárido o un polipéptido, que la molécula indicada está separada y aislada del organismo completo con el que la molécula se encuentra en la naturaleza o está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo.

"Homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o dos restos polipeptídicos. Dos ácidos nucleicos o dos secuencias polipeptídicas son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando la secuencia muestra al menos aproximadamente el 50%, preferentemente al menos aproximadamente el 75%, más preferentemente al menos aproximadamente el 80%-85%, preferentemente al menos aproximadamente el 90%, y más preferentemente al menos aproximadamente el 95%-98% de identidad de secuencia sobre una longitud definida de las moléculas. Como se utiliza en el presente documento, sustancialmente homólogo también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con la secuencia especificada.

En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias polipeptídicas, respectivamente. El porcentaje de identidad puede determinarse por una comparación directa de la información de la secuencia entre dos moléculas (la secuencia de referencia y una secuencia con un % de identidad desconocido con respecto a la secuencia de referencia) alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia de referencia, y multiplicando el resultado por 100. Se pueden utilizar programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3:353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Advances in Appl. Math. 2: 482-489, 1981 al análisis de péptidos. Los programas para determinar la identidad de secuencias de nucleótidos están disponibles en Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA, y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el Wisconsin Sequence Analysis Package referido anteriormente. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos particular con una secuencia de referencia puede determinarse usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de consulta con valores por defecto y una penalización por hueco en seis posiciones de nucleótidos.

Otro procedimiento para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es el uso del paquete de programas MPSRCH registrado por la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). De este grupo de paquetes, puede emplearse el algoritmo de Smith-Waterman donde se usan parámetros por defecto para la tabla de consulta (por ejemplo, penalización de hueco abierto de 12 huecos, penalización de extensión de huecos de uno, y un hueco de 6). A partir de los datos generados, los valores "coincidentes" reflejan la "identidad de secuencia". En la técnica se conocen generalmente otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, utilizado con parámetros por defecto. Por ejemplo, se pueden usar BLASTN y BLASTP utilizando los siguientes parámetros por defecto; código genético = estándar; filtro = ninguno; cadenas = ambas; límite = 60; expectativa = 10; matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificación por = HIGH SCORE; Base de datos = no redundante, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de SCD del GenBank + Proteína Swiss + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas están disponibles fácilmente.

Como alternativa, la homología se puede determinar por hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con una o más nucleasas específicas de cadena sencilla, y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas se pueden identificar en un experimento de hibridación Southern en, por ejemplo, condiciones rigurosas, definidas para este sistema particular. La definición de las condiciones apropiadas de hibridación está dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., *supra*; *ADN Cloning, supra*; *Nucleic Acid Hybridization, supra*.

"Recombinante", como se usa en el presente documento para describir una molécula de un ácido nucleico, significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, viral, semisintético, o sintético que, debido a su origen o manipulación no está asociado con todo o una porción del polinucleótido al que está asociado en la naturaleza. El término "recombinante", como se usa con respecto a una proteína o un polipéptido, significa un polipéptido producido por expresión de un polinucleótido recombinante. En general, el gen de interés se clona y después se expresa en organismos transformados, como se describe más adelante con más detalle. El organismo huésped expresa el gen extraño para producir la proteína en condiciones de expresión.

Por "sujeto vertebrado" se entiende cualquier miembro del subfilo *chordata*, incluyendo, sin limitación, seres humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como los chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como los ratones, ratas y cobayas; aves, incluyendo domésticas, salvajes y de caza, tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, ocas y similares. El término no denota una edad en particular. Así, se pretende incluir tanto adultos como individuos recién nacidos. La invención descrita en el presente documento se pretende para su uso en cualquiera de las especies de vertebrados anteriores.

El término "paciente" se refiere a un organismo vivo que sufre o está predispuesto a padecer una afección que puede prevenirse o tratarse por la administración de un PSNA de la invención, e incluye tanto seres humanos como animales.

Como se usa en el presente documento, una "muestra biológica" se refiere a una muestra de tejido o fluido aislada de un sujeto, incluyendo pero sin limitarse a estos, por ejemplo, sangre, plasma, suero, materia fecal, orina, médula ósea, bilis, fluido espinal, fluido linfático, muestras de piel, secreciones externas de la piel, tracto respiratorio, intestinal, y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias y también muestras *in vitro* de componentes de cultivo celular incluyendo, pero sin limitarse a medios acondicionados que resultan del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, por ejemplo, células recombinantes, y componentes celulares.

Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" de un PSNA, factor sanguíneo, u otro agente terapéutico se entiende una cantidad que, cuando se administra como se describe en el presente documento, produce aproximadamente una respuesta terapéutica positiva, tal como un sangrado reducido o tiempos de coagulación más cortos.

La expresión "trastorno hemorrágico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier trastorno asociado con un sangrado excesivo, tales como un trastorno congénito de la coagulación, un trastorno adquirido de la coagulación, o una enfermedad hemorrágica inducida por un traumatismo. Tales trastornos hemorrágicos incluyen, pero no están limitados a estos, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de contacto tales como Factor XI, Factor XII, precalicreína, y quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), una deficiencia de uno o más factores asociados con sangrado clínicamente significativo, tales como Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XIII, Factor II (hipoprotrombinemia), y factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, incluyendo afibrinogenemia, hipofibrinogenemia, y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa₂-antiplasmina, y sangrado excesivo tal como el causado por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación, y gestación.

II. Modos de realización de la invención

Antes de describir la presente invención en detalle, se tiene que entender que la presente invención no está limitada a formulaciones o parámetros de procesos particulares que pueden, por supuesto, variar. También se tiene que entender que la terminología utilizada en el presente documento es con el único propósito de describir realizaciones particulares de la invención, y no se pretende que sea limitante.

Aunque en la práctica de la presente invención se pueden usar varios procedimientos y materiales similar o equivalente a los que se describen en el presente documento, los materiales y procedimientos preferidos se describen en el presente documento.

A. Visión general

Los trastornos de la coagulación sanguínea que incluyen hemofilia (Hem) A y Hem B, enfermedad severa de von Willebrand (svWD), y deficiencia severa del factor VII (FVII) se han tratado típicamente por remplazo de factores, por ejemplo, factor VIII para Hem-A y svWD, factor IX para Hem-B, y factor VII(a) para deficiencia de FVII y otros (recientemente revisado en Bishop y col. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.* 3:684-694; Carcao y col. (2004) *Blood Rev.* 18:101-113; Roberts y col. (2004) *Anesthesiology* 100:722-730; y Lee (2004) *Int. Anesthesiol. Clin.* 42:59-76). Aunque tales terapias son a menudo eficaces, las características que limitan su utilidad incluyen alto coste, inconveniencia (es decir, administración intravenosa), y generación de anticuerpos neutralizantes (Bishop y col., *supra*; Carcao y col., *supra*; Roberts y col., *supra*; Lee, *supra*; y Bohn y col. (2004) *Haemophilia* 10 Suppl. 1:2-8). Aunque el FVIIa se utiliza cada vez más en varios trastornos hemorrágicos (Roberts y col., *supra*), serían interesantes terapias procoagulantes alternativas con compuestos únicos que no tengan los inconvenientes antes mencionados y con una aplicación amplia.

Una aproximación general para mejorar la hemostasia en individuos con trastornos hemorrágicos es mejorar el inicio de la coagulación por regulación positiva de la ruta extrínseca de la coagulación de la sangre. Aunque las rutas intrínsecas y extrínsecas de la coagulación contribuyen a la generación de trombina y a la formación del coágulo de fibrina (Davie y col. (1991) *Biochemistry* 30:10363-10370), la ruta extrínseca - o mediada por el factor tisular (TF) - es crítica para la iniciación, y contribuye a la propagación de la coagulación *in vivo* (Mann (2003) *Chest* 124(3 Suppl):1S-3S; Rapaport y col. (1995) *Thromb. Haemost.* 74:7-17). Un mecanismo potencial de regulación positiva de la actividad de la ruta extrínseca es la atenuación del Inhibidor de la Ruta del Factor Tisular (TFPI). El TFPI es un inhibidor de la proteinasa tipo Kunitz del FVIIa/TF que proporciona regulación negativa tónica de la activación de la ruta extrínseca (véase Broze (1992) *Semin. Hematol.* 29:159-169; Broze (2003) *J. Thromb. Haemost.* 1:1671-1675; y Johnson y col. (1998) *Coron. Artery Dis.* 9(2-3):83-87 para revisión). Además, la deficiencia de TFPI heterocigota en ratones puede dar como resultado la exacerbación de la formación de trombos (Westrick y col. (2001) *Circulation* 103:3044-3046), y la mutación del gen TFPI es un factor de riesgo para la trombosis en seres humanos (Kleesiek y col. (1999) *Thromb. Haemost.* 82:1-5). La regulación de la coagulación en la hemofilia mediante la dirección de TFPI la describieron Nordfang y col. y Wun y col., que mostraron que los anticuerpos anti-TFPI podrían acortar el tiempo de coagulación del plasma hemofílico (Nordfang y col. (1991) *Thromb. Haemost.* 66:464-467; Welsch y col. (1991) *Thromb. Res.* 64:213-222) y que la IgG anti-TFPI mejoraba el tiempo de sangrado de conejos que eran deficientes de factor VIII (Erhardtson y col. (1995) *Blood Coagul. Fibrinolysis* 6:388-394).

Como clase, los polisacáridos sulfatados se caracterizan por una plétora de actividades biológicas con perfiles de tolerancia a menudo favorables en animales y seres humanos. Estas moléculas polianiónicas derivan a menudo de plantas y tejidos animales y engloban un intervalo amplio de subclases que incluyen las heparinas, glucosaminoglucanos, fucoidanos, carragenanos, pentosano polisulfatos, y dermatán o dextrán sulfatos (Toida y col. (2003) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 15:29-46). Se han presentado polisacáridos sulfatados sintetizados químicamente, menos heterogéneos y de bajo peso molecular y han alcanzado varios estadios de desarrollo de fármacos (Sinay (1999) *Nature* 398:377-378; Bates y col. (1998) *Coron. Artery Dis.* 9:65-74; Orgueira y col. (2003) *Chemistry* 9:140-169; McAuliffe (1997) *Chemical Industry Magazine* 3:170-174; Williams y col. (1998) *Gen. Pharmacol.* 30:337-341). Los polisacáridos sulfatados similares a la heparina muestran actividad anticoagulante diferencial mediada a través de interacciones de antitrombina III y/o cofactor II heparina (Toida y col., *supra*). En particular, ciertos compuestos, de origen natural o modificados químicamente, muestran otras actividades biológicas a concentraciones (o dosis) a las que la actividad anticoagulante no es sustancial (Williams y col. 1998) *Gen. Pharmacol.* 30:337-341; Wan y col. (2002) *Inflamm. Res.* 51:435-443; Bourin y col. (1993) *Biochem. J.* 289 (Pt 2):313-330; McCaffrey y col. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184:773-781; Luyt y col. (2003) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305:24-30). Además, se ha demostrado que el sulfato de heparina muestra fuertes interacciones con el TFPI (Broze (1992) *Semin. Hematol.* 29:159-169; Broze (2003) *J. Thromb. Haemost.* 1:1671-1675; Johnson y col. (1998) *Coron. Artery Dis.* 9:83-87; Novotny y col. (1991) *Blood*; 78(2):394-400).

Como se describe en el presente documento, ciertos polisacáridos sulfatados interactúan con el TFPI e inhiben su actividad a concentraciones más bajas que aquellas asociadas con anticoagulación. Tales moléculas pueden usarse en situaciones donde la formación del coágulo está comprometida.

B. PSNA como Promotores de la Coagulación

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los polisacáridos sulfatados no anticoagulantes (PSNA) se pueden utilizar como procoagulantes en el tratamiento de pacientes con trastornos hemorrágicos. Los inventores del presente documento han descubierto una nueva aproximación para regular la hemostasia que, paradójicamente, utiliza polisacáridos sulfatados, tales como polisacáridos sulfatados similares a la heparina para promover la coagulación. Los polisacáridos sulfatados seleccionados descritos en el presente documento están desprovistos en gran medida de actividad anticoagulante, o muestran actividad que promueve la coagulación a concentraciones significativamente más bajas que la concentración a la que muestran actividad anticoagulante, y por tanto se señalan como "polisacáridos sulfatados no anticoagulantes".

Como se muestra en los ejemplos 4-6, los PSNA promueven la coagulación del plasma de sujetos que tienen hemofilia A (Hem-A) o hemofilia B (Hem-B) de acuerdo con los ensayos de coagulación de tiempo de protrombina diluida (dPT) y tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). Además, los PSNA reducen el tiempo de sangrado en modelos de ratón de hemofilia A y B tras una lesión (Ejemplo 7). En los experimentos desvelados en el presente documento, se muestran ciertos candidatos a PSNA en ensayos de coagulación que demuestran una actividad anticoagulante al menos diez veces menor cuando se comparan con la heparina. Además, un subgrupo de PSNA, incluyendo el pentosano polisulfato (PPS) y el fucoidán, inhibía el Inhibidor de la Ruta del Factor Tisular (TFPI) y mejoraba (es decir, aceleraba) el tiempo de coagulación de plasmas de hemofilia A y hemofilia B o del plasma con niveles reducidos de FVII cuando se ensayaban a concentraciones que variaban de 4-500 nM en ensayos de tiempo de protrombina diluida (dPT). Se observó una mejora de la hemostasia *in vivo* en ratones con hemofilia A o B después de la administración subcutánea de bajas dosis de PPS o fucoidán, o una combinación de PSNA y suplemento de factor. También se observó el aumento de la supervivencia de los ratones deficientes del factor, después de un reto de sangrado. Estos resultados indican que la administración sistémica de PSNA seleccionados puede representar una aproximación única para la regulación de la hemostasia en trastornos hemorrágicos.

Por tanto, la invención se refiere al uso de PSNA para el control de la hemostasia en sujetos con trastornos hemorrágicos, incluyendo trastornos congénitos de la coagulación, trastornos de la coagulación adquiridos y enfermedades hemorrágicas inducidas por traumatismos.

C. PSNA

Los PSNA para su uso en los procedimientos de la invención son polisacáridos sulfatados que tienen actividad procoagulante. Las propiedades no coagulantes de los PSNA potenciales se determinan utilizando ensayos de coagulación como el tiempo de protrombina diluida (dPT) o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). Los polisacáridos sulfatados no coagulantes muestran no más de un tercio, y preferentemente menos de un décimo de la actividad anticoagulante (medida por incremento estadísticamente significativo del tiempo de coagulación) de la heparina no fraccionada (intervalo de PM 8.000 a 30.000; media 18.000 daltons).

Los polisacáridos sulfatados con actividad potencial PSNA incluyen, sin estar limitados a estos, glucosaminoglucanos (GAG), moléculas similares a la heparina incluyendo la N-acetil heparina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y la heparina N-desulfatada (Sigma-Aldrich), sulfatoides, oligosacáridos polisulfatados (Karst y col. (2003) *Curr. Med. Chem.* 10:1993-2031; Kuszmann y col. (2004) *Pharmazie.* 59:344-348), condroitín sulfato (Sigma-Aldrich), dermatán sulfato (Celsus Laboratories Cincinnati, OH), fucoidán (Sigma-Aldrich), pentosano polisulfato (PPS) (Ortho-McNeil Pharmaceuticals, Raritan, NJ), fucopiranon sulfatos (Katzman y col. (1973) *J. Biol. Chem.* 248:50-55), y nuevos sulfatoides tales como el GM1474 (Williams y col. (1998) *General Pharmacology* 30:337) y SR 80258A (Burg y col. (1997) *Laboratory Investigation* 76:505), y nuevos heparinoides y sus análogos. Los PSNA pueden purificarse y/o modificarse a partir de fuentes naturales (por ejemplo, algas pardas, corteza de árboles, tejidos animales) o pueden sintetizarse *de novo* y pueden variar en peso molecular de 100 daltons a 1.000.000 daltons. Otros compuestos con actividad potencial PSNA incluyen la heparina peryodada-oxidada (POH) (Neoparin, Inc., San Leandro, CA), laminarina químicamente sulfatada (CSL) (Sigma-Aldrich), ácido alginico químicamente sulfatado (CSAA) (Sigma-Aldrich), pectina químicamente sulfatada (CSP) (Sigma-Aldrich), dextrán sulfato (DXS) (Sigma-Aldrich), oligosacáridos derivados de la heparina (HDO) (Neoparin, Inc., San Leandro, CA).

En principio, cualquier grupo hidroxilo libre en un componente monosacárido de un glucoconjugado se puede modificar por sulfatación para producir un glucoconjugado sulfatado para su uso potencial como un PSNA en la práctica de la invención. Por ejemplo, tales glucoconjugados sulfatados pueden incluir sin limitación mucopolisacáridos sulfatados (restos de D-glucosamina y del ácido D-glucurónico), curdlan (carboximetil éter, hidrogenosulfato, curdlan carboximetilado) (Sigma-Aldrich), esquizofilano sulfatado (Itoh y col. (1990) *Int. J. Immunopharmacol.* 12:225-223; Hirata y col. (1994) *Pharm. Bull.* 17: 739-741), glucosaminoglucanos sulfatados, complejo peptidoglucano-polisacárido sulfatado, alquil malto-oligosacárido sulfatado (Katsuraya y col. (1994) *Carbohydr Res.* 260:51-61), sulfato de amilopectina, N-acetil heparina (NAH) (Sigma-Aldrich), heparina N-acetil-des-O-sulfatada (NA-de-o-SH) (Sigma-Aldrich), heparina des-N-sulfatada (De-NSH) (Sigma-Aldrich), y heparina Des-N-sulfatada acetilada (De-NSAH) (Sigma-Aldrich).

La capacidad de PSNA para promover la coagulación y reducir el sangrado se determina fácilmente usando varios ensayos de coagulación *in vitro* (por ejemplo, ensayos de dPT y aPTT) y modelos de sangrado *in vivo* (por ejemplo,

corte en la cola o determinación del tiempo de sangrado de la cutícula en perros o ratones hemofílicos). Véase, por ejemplo, PDR Staff. Physicians' Desk Reference. 2004, Anderson y col. (1976) *Thromb. Res.* 9:575-580; Nordfang y col. (1991) *Thromb Haemost.* 66:464-467; Welsch y col. (1991) *Thrombosis Research* 64: 213-222; Broze y col. (2001) *Thromb Haemost* 85:747-748; Scallan y col. (2003) *Blood.* 102:2031-2037; Pijnappels y col. (1986) *Thromb. Haemost.* 55:70-73; y Giles y col. (1982) *Blood* 60:727-730. Los ensayos de coagulación pueden llevarse a cabo en presencia de PSNA y uno o más factores de la sangre, procoagulantes, u otros reactivos. Por ejemplo, se pueden añadir uno o más factores, incluyendo pero sin estar limitado a factor XI, factor XII, precalicreína, quininógeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, y factor de von Willebrand, factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa; y/o uno o más reactivos, incluyendo pero sin imitarse a estos, reactivo APTT, tromboplastina, fibrina, TFPI, veneno de víbora de Russell, partículas de sílice micronizada, ácido elálgico, sulfátidos, y caolín.

Los ejemplos 3-4 y las figuras 2-3 confirman que los agentes a los que se hace referencia en el presente documento como PSNA son verdaderamente "no coagulantes", es decir, no incrementan significativamente los tiempos de coagulación por encima del intervalo de concentraciones estudiadas. Tales compuestos se pueden usar en los procedimientos y composiciones de la presente invención siempre que cualquier actividad anticoagulante que puedan mostrar solo aparezca a concentraciones significativamente por encima de la concentración a la que muestran actividad procoagulante. La relación entre las concentraciones a las que se pueden producir las propiedades anticoagulantes no deseadas y la concentración a la que se producen las actividades procoagulantes deseadas se denomina índice terapéutico del PSNA en cuestión. El índice terapéutico para los PSNA de la presente invención puede ser de 5, 10, 30, 100, 300, 1000 o más.

D. Composiciones farmacéuticas

Opcionalmente, las composiciones de PSNA de la invención pueden además comprender uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para proporcionar una composición farmacéutica. Los excipientes ejemplares incluyen, sin limitación, carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases, y combinaciones de los mismos. Los excipientes adecuados para composiciones inyectables incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina, aceites vegetales, fosfolípidos, y tensioactivos. Como excipiente puede estar presente un carbohidrato tal como un azúcar, un azúcar modificado tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado, y/o un polímero de azúcar. Los excipientes carbohidratos específicos incluyen, por ejemplo: monosacáridos, tales como la fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como la lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como la rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como el manitol, xilitol, maltitol, lactitol, sorbitol (glucitol), piranosil sorbitol, mioinositol, y similares. El excipiente también puede incluir una sal inorgánica o tampón tal como el ácido cítrico, el cloruro sódico, el cloruro potásico, el sulfato sódico, el nitrato potásico, el fosfato sódico monobásico, el fosfato sódico dibásico y combinaciones de los mismos.

Una composición de la invención puede incluir también un agente antimicrobiano para prevenir o impedir el crecimiento microbiano. Los ejemplos no limitantes de agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, timersol, y combinaciones de los mismos.

También puede estar presente en la composición un antioxidante. Los antioxidantes se usan para prevenir la oxidación, y por tanto para prevenir el deterioro del PSNA u otros componentes de la preparación. Los antioxidantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, el palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito sódico, formaldehído sufoxilato sódico, metabisulfito sódico, y combinaciones de los mismos.

Como excipiente puede estar presente un tensioactivo. Los tensioactivos ejemplares incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80", y pluronics tales como F68 y F88 (BASF, Mount Olive, New Jersey); ésteres de sorbitán; lípidos, tales como fosfolípidos tales como la lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferentemente no en forma de liposomas), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, tales como el colesterol; agentes quelantes, tales como el EDTA; y cinc y otros cationes adecuados.

En la composición pueden estar presentes como excipientes ácidos o bases. Los ejemplos no limitantes de ácidos que pueden usarse incluyen los ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen, sin limitación, bases seleccionadas del grupo que consiste en hidróxido sódico, acetato sódico, hidróxido amónico, hidróxido potásico, acetato amónico, acetato potásico, fosfato sódico, fosfato potásico, citrato sódico, formiato sódico, sulfato sódico, sulfato potásico, fumarato potásico, y combinaciones de los mismos.

La cantidad de PSNA (por ejemplo, cuando está contenida en un sistema de liberación de fármaco) en la composición variará dependiendo de varios factores, pero será óptimamente una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición está en una forma de dosificación unitaria o un recipiente (por ejemplo, un vial). Una dosis terapéuticamente eficaz puede determinarse experimentalmente por administración repetida de cantidades

crecientes de la composición para determinar qué cantidad produce un resultado clínicamente deseado.

La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición variará dependiendo de la naturaleza y función del excipiente y las necesidades particulares de la composición. Típicamente, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina por la experimentación rutinaria, es decir, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que varían de menos a más), examinando la estabilidad y otros parámetros, y después determinando el intervalo al que se alcanza el funcionamiento óptimo sin efectos adversos significativos. Generalmente, sin embargo, el excipiente o excipientes estarán presentes en la composición en una cantidad de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 99% en peso, preferentemente de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 98% en peso, más preferentemente de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 95% en peso del excipiente, siendo las más preferidas las concentraciones de menos del 30% en peso. Estos excipientes farmacéuticos mencionados anteriormente junto con otros excipientes están descritos en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19 ed., Williams & Williams, (1995), the "Physician's Desk Reference", 52 ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), y Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª Edición, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

Las composiciones engloban todos los tipos de formulaciones y, en particular, aquellas que son adecuadas para inyección, por ejemplo, polvos o liofilizados que pueden reconstituirse con un disolvente antes del uso, así como soluciones o suspensiones preparadas para inyección, composiciones secas insolubles para su combinación con un vehículo antes de su uso, y emulsiones y concentrados líquidos para dilución antes de su administración. Los ejemplos de diluyentes adecuados para reconstituir composiciones sólidas antes de la inyección incluyen agua bacteriostática para inyección, dextrosa al 5% en agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada, y combinaciones de los mismos. Con respecto a las composiciones farmacéuticas líquidas, se conciben soluciones y suspensiones. Otras composiciones adicionales preferidas incluyen las de administración oral, ocular o local.

Las preparaciones farmacéuticas del presente documento también pueden alojarse en una jeringa, un dispositivo de implantación, o similares, dependiendo del modo deseado de suministro y uso. Preferentemente, las composiciones de PSNA descritas en el presente documento están en forma de dosificación unitaria, lo que significa una cantidad de un conjugado o composición de la invención apropiada para una dosis única, en una forma medida o envasada previamente.

Las composiciones de PSNA del presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más agentes adicionales, tales como agentes hemostáticos, factores sanguíneos, u otras medicaciones usadas para tratar en un sujeto una enfermedad o una afección. Son particularmente preferidas las preparaciones compuestas que incluyen uno o más factores sanguíneos tales como factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa, y factor de von Willebrand. Las composiciones de PSNA pueden incluir también otros procoagulantes tales como un activador de la ruta intrínseca de la coagulación, incluyendo pero sin limitarse a estos, el factor Xa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa, precalicreína, y quinínogeno de alto peso molecular; o un activador de la ruta extrínseca de la coagulación, incluyendo pero sin limitarse a estos, factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa. Las composiciones de PSNA pueden incluir factores de coagulación naturales, sintéticos o recombinantes o fragmentos, variantes o derivados modificados covalentemente de los mismos que retienen la actividad biológica (es decir, promueven la coagulación). Como alternativa, tales agentes pueden estar contenidos en una composición separada del PSNA y administrarse a la vez, antes o después de la composición de PSNA de la invención.

E. Administración

Se administrará a un sujeto al menos un ciclo de tratamiento terapéuticamente eficaz con un PSNA. Por "ciclo de tratamiento terapéuticamente eficaz" se entiende un ciclo de tratamiento que cuando se administra, produce una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un trastorno hemorrágico en un individuo. Es de particular interés un ciclo de tratamiento con un PSNA que mejore la hemostasia. Por "respuesta terapéutica positiva" se entiende que el tratamiento al que se somete el individuo muestra una mejoría en uno o más síntomas de un trastorno hemorrágico, incluyendo mejorías tales como el acortamiento de los tiempos de coagulación sanguínea y el sangrado reducido y/o la reducción de la necesidad de terapia de remplazo con factores.

En ciertas realizaciones, se administrarán múltiples dosis terapéuticamente eficaces de composiciones que comprenden uno o más PSNA y/u otros agentes terapéuticos, tales como agentes hemostáticos, factores sanguíneos, u otras medicaciones. Las composiciones de la presente invención se administran típicamente, aunque no necesariamente, por vía oral, por inyección (subcutánea, intravenosa o intramuscular), por infusión o localmente. La preparación farmacéutica puede estar en forma de una suspensión o solución líquida, inmediatamente antes de la administración, pero también puede tomar otra forma tal como un jarabe, crema, pomada, comprimido, cápsula, polvo, gel, matriz, supositorio, o similares. También se contemplan otros modos adicionales de administración, tales como pulmonar, rectal, transdérmica, transmucosa, intratecal, pericárdica, intraarterial, intracerebral, intraocular, intraperitoneal, y similares. Las composiciones farmacéuticas que comprenden PSNA y otros agentes se pueden administrar usando la misma o diferentes rutas de administración de acuerdo con cualquier procedimiento médicamente aceptable conocido en la técnica.

En una realización particular, una composición de la invención se usa para el suministro localizado de un PSNA, por ejemplo, para el tratamiento del sangrado como resultado de una lesión, daño, o cirugía. Las preparaciones de acuerdo con la invención también son adecuadas para tratamiento local. Por ejemplo, un PSNA se puede administrar por inyección en el sitio de sangrado o en forma de un sólido, líquido, o pomada, preferentemente por medio de una cinta adhesiva o una venda. Pueden usarse también supositorios, cápsulas, en particular las cápsulas resistentes a los jugos gástricos, gotas o pulverizadores. La preparación particular y el procedimiento apropiado de administración se eligen para dirigirse al sitio de sangrado.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden PSNA y/u otros agentes se administran profilácticamente, por ejemplo, antes de la cirugía planeada. Tales usos profilácticos serán de valor particular para los sujetos con trastornos conocidos de coagulación preexistentes.

En otra realización de la invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden PSNA y/u otros agentes están en una formulación de liberación sostenida, o una formulación que se administra usando un dispositivo de liberación sostenida. Tales dispositivos se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, los parches transdérmicos, y las minibombas implantables que pueden proporcionar el suministro del fármaco durante un tiempo de una forma continua, constante a una variedad de dosis para alcanzar un efecto de liberación sostenida con una composición farmacéutica de liberación no sostenida.

La invención también permite administrar un conjugado que comprende un PSNA como se proporciona en el presente documento a un paciente que sufre una afección que responde al tratamiento con un PSNA contenido en el conjugado o composición. Esto comprende administrar, mediante cualquiera de los modos descritos en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado o el sistema de suministro de fármaco, preferentemente proporcionado como parte de una composición farmacéutica. El procedimiento de administración puede usarse para tratar cualquier afección que responda al tratamiento con un PSNA. Más específicamente, las composiciones del presente documento son eficaces en el tratamiento de trastornos hemorrágicos, incluyendo la hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de contacto, tales como el Factor XI, Factor XII, precalicreína, y quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), una deficiencia de uno o más factores asociados con sangrado clínicamente significativo, tales como Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XIII, Factor II (hipoprotrombinemia), y factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, incluyendo afibrinogenemia, hipofibrinogenemia, y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa₂-antiplasmina y sangrado excesivo tal como el causado por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación, y gestación.

Los expertos habituales en la materia apreciarán qué afecciones se pueden tratar eficazmente con un PSNA específico. La dosis real a administrar variará dependiendo de la edad, el peso y el estado general del sujeto así como la severidad de la afección a tratar, el juicio del profesional de la salud, y el conjugado a administrar. Las cantidades terapéuticamente eficaces pueden determinarse por un experto en la materia, y se ajustarán a las necesidades de cada caso en particular.

Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz variará de aproximadamente 0,01 mg/kg a 200 mg/kg de un PSNA diariamente, más preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a 20 mg/kg diariamente, incluso más preferentemente de aproximadamente 0,02 mg/kg a 2 mg/kg diariamente. Preferentemente, tales dosis están en el intervalo de 0,01-50 mg/kg cuatro veces al día (QID), 0,01-10 mg/kg QID, 0,01-2 mg/kg QID, 0,01-0,2 mg/kg QID, 0,01-50 mg/kg tres veces al día (TID), 0,01-10 mg/kg TID, 0,01-2 mg/kg TID, 0,01-0,2 mg/kg TID, 0,01-100 mg/kg dos veces al día (BID), 0,01-10 mg/kg BID, 0,01-2 mg/kg BID, o 0,01-0,2 mg/kg BID. La cantidad de compuesto administrado dependerá de la potencia del PSNA específico y la magnitud o efecto procoagulante deseado y la vía de administración.

Un PSNA (de nuevo, preferentemente proporcionado como parte de una preparación farmacéutica) se puede administrar solo o en combinación con otros PSNA o agentes terapéuticos, tales como agentes hemostáticos, factores sanguíneos, u otras medicaciones usadas para tratar una afección o enfermedad particular de acuerdo con una variedad de calendarios de dosificación dependiendo del juicio del médico, las necesidades del paciente, etc. El calendario específico de dosificación será conocido por los expertos habituales en la materia o puede determinarse experimentalmente usando procedimientos rutinarios. Los calendarios de dosificación ejemplares incluyen, sin limitación, la administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquier combinación de los mismos. Son composiciones preferidas las que requieren dosificaciones no más de una vez al día.

Un PSNA se puede administrar antes, concurrentemente o después de otros agentes. Si se proporciona al mismo tiempo que otros agentes, el PSNA se puede proporcionar en la misma composición o en una composición diferente. Por lo tanto, los PSNA y otros agentes se pueden presentar al individuo por medio de una terapia concurrente. Por "terapia concurrente" se entiende la administración a un sujeto de forma que en el sujeto sometido a la terapia se cause el efecto terapéutico de la combinación de las sustancias. Por ejemplo, la terapia concurrente puede conseguirse por la administración de una dosis de una composición farmacéutica que comprende un PSNA y una

dosis de una composición farmacéutica que comprende al menos otro agente, tal como un agente hemostático o un factor de coagulación (por ejemplo FVIII o FIX), que en combinación comprende una dosis terapéuticamente eficaz, de acuerdo con un régimen particular de dosificación. Similarmente, se pueden administrar uno o más PSNA y agentes terapéuticos en al menos una dosis terapéutica. La administración de las composiciones farmacéuticas separadas se puede hacer simultáneamente o en tiempos diferentes (es decir, secuencialmente, en cualquier orden, en el mismo día, o en distintos días), siempre que en el sujeto sometido a la terapia se produzca el efecto terapéutico de la combinación de estas sustancias.

F. Aplicaciones

En un aspecto, los PSNA se pueden usar en la invención para mejorar la coagulación sanguínea, en particular para mejorar la hemostasia en el tratamiento de trastornos hemorrágicos, particularmente aquellos asociados con deficiencia de factores de coagulación o para revertir los efectos de anticoagulantes en un sujeto. Los PSNA se pueden administrar a un sujeto para tratar trastornos hemorrágicos, incluyendo trastornos congénitos de la coagulación, trastornos adquiridos de la coagulación, y afecciones hemorrágicas inducidas por traumatismo. Los ejemplos de trastornos hemorrágicos que pueden tratarse con el PSNA incluyen, pero sin estar limitados a estos, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de contacto, tales como Factor X, Factor XII, precalicreína, y quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), una deficiencia de uno o más factores asociados con sangrado clínicamente significativo, tales como Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Factor II (hipoprotrombinemia), factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, incluyendo la afibrinogenemia, hipofibrinogenemia, y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa₂-antiplasmina, y sangrado excesivo tal como el causado por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y gestación. En ciertas realizaciones, los PSNA se utilizan para tratar trastornos congénitos de la coagulación incluyendo hemofilia A, hemofilia B, y enfermedad de von Willebrand. En otras realizaciones, los PSNA se usan para tratar trastornos adquiridos de la coagulación, incluyendo deficiencias del factor VIII, factor de von Willebrand, factor IX, factor V, factor X, factor XII and factor XIII, particularmente trastornos causados por inhibidores o autoinmunidad contra los factores de coagulación sanguínea, o trastornos hemostáticos causados por una enfermedad o afección que da como resultado una reducción de la síntesis de factores de coagulación.

Las necesidades del paciente dependerán del trastorno hemorrágico en particular a tratar. Por ejemplo, un PSNA puede administrarse para tratar una afección crónica (por ejemplo, una deficiencia congénita o adquirida de un factor de coagulación) en múltiples dosis durante un periodo largo. Como alternativa, un PSNA se puede administrar para tratar una afección aguda (por ejemplo, una hemorragia causada por cirugía o traumatismo, o episodios de inhibición de un factor de coagulación/autoinmunes en sujetos que reciben terapia de coagulación de remplazo) en dosis únicas o múltiples durante un periodo de tiempo relativamente corto, por ejemplo una o dos semanas. Además, la terapia con PSNA se puede usar en combinación con otros agentes hemostáticos, factores sanguíneos y medicaciones. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (QAPM) factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa, y factor de von Willebrand. El tratamiento puede además comprender la administración de un procoagulante, tal como un activador de la ruta intrínseca de la coagulación, incluyendo el factor Xa, factor IXa, factor Xa, factor XIIa, and VIIIa, precalicreína, y quinínogeno de alto peso molecular; o un activador de la ruta extrínseca de la coagulación incluyendo factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa. Además, puede ser necesaria la transfusión de productos de la sangre para reemplazar la pérdida de sangre en sujetos que experimentan un sangrado excesivo, y en el caso de heridas, puede ser apropiada la reparación quirúrgica para detener el sangrado.

La invención también permite revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un PSNA. En ciertas realizaciones, el sujeto puede haber sido tratado con un anticoagulante incluyendo, pero sin limitarse a estos, heparina, un derivado de cumarina, tal como la warfarina o el dicumarol, TFPI, AT III, anticoagulante lúpico, péptido anticoagulante de nematodo (NAPc2), factor VIIa bloqueado en el sitio activo (factor VIIai), inhibidores del factor IXa, inhibidores del factor Xa, incluyendo el fondaparinux, idraparinux, DX-9065a, y razaxabán (DPC906), inhibidores de los factores Va y VIIIa, incluyendo la proteína C activada (APC) y trombomodulina soluble, inhibidores de la trombina, incluyendo la hirudina, bivalirudina, argatrobán, y ximelagatrán. En ciertas realizaciones, el anticoagulante en el sujeto puede ser un anticuerpo que se une a un factor de coagulación, incluyendo pero sin limitarse a los mismos, un anticuerpo que se une al Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XIII, Factor II, Factor XI, Factor XII, factor de von Willebrand, precalicreína, o quinínogeno de alto peso molecular (QAPM).

En ciertas realizaciones, un PSNA se puede administrar solo o coadministrarse con uno o más PSNA diferentes y/o en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos para revertir los efectos de un anticoagulante en el sujeto. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un PSNA y uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa, y factor de von Willebrand. El tratamiento puede además comprender la administración de

un procoagulante, tal como un activador de la ruta intrínseca de la coagulación, incluyendo el factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa, precalicreína, y quininógeno de alto peso molecular; o un activador de la ruta extrínseca de la coagulación, incluyendo el factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa.

5 En otro aspecto, la invención permite mejorar la coagulación en un sujeto sometido a una cirugía o un procedimiento invasivo, comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA). En ciertas realizaciones, el PSNA se puede administrar al sujeto sometido a una cirugía o procedimiento invasivo solo o coadministrado con uno o más PSNA diferentes y/o en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más factores seleccionados del grupo que
10 consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quininógeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa, y factor de von Willebrand. El tratamiento puede además comprender la administración de un procoagulante, tal como un activador de la ruta intrínseca de la coagulación, incluyendo el factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa, precalicreína, y quininógeno de alto peso molecular; o un activador de la ruta extrínseca de la coagulación, incluyendo el factor tisular, factor VIIa, factor Va, y
15 factor Xa. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* de inhibición de la actividad del TFPI en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento la combinación de la muestra biológica (por ejemplo, sangre o plasma) con una cantidad suficiente de un PSNA para inhibir la actividad del TFPI.

III. Experimentación

20 A continuación se proporcionan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solo para propósitos ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se deberían admitir algunos errores experimentales y desviaciones.

Ejemplo 1

25 Material y procedimientos

A. Reactivos

La heparina y las heparinas modificadas, y el fucoidán se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO). La fuente de pentosán polisulfato sódico (PPS) fue el fármaco de prescripción Elmiron, obtenido de Ortho-McNeil Pharmaceuticals (Raritan, NJ). Los plasmas humanos se obtuvieron de George King Biomedical (Overland Park, KS). Los Factores VIIa y el TFPI recombinante humano se obtuvieron de American Diagnostica (Stamford, CT) y el Factor VIII fue la prescripción ReFactor^R obtenida de Wyeth Pharmaceuticals (Madison, NJ). El SIMPLASTIN EXCEL y el reactivo APTT se obtuvieron de bioMerieux (Durham, NC) u Organon Teknika (Roseland, New Jersey).

B. Animales

35 Los ratones Hem-A (homocigotos para el alelo FVII KO del exón 16) se aportaron con licencia por la Universidad John Hopkins, y los ratones Hem-B (homocigotos para el FIX KO del exón 1-3) se aportaron con licencia por la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" (National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D. C.: National Academy Press; 1996) y todos los procedimientos fueron revisados y aprobados por un comité institucional de cuidado y uso de animales.

40 C. Ensayos de coagulación

Ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT)

El ensayo de aPTT se llevó a cabo como se describió previamente con modificaciones (PDR Staff. Physicians' Desk Reference. 2004, Anderson Lo, Barrowcliffe, T. W., Holmer, E., Johnson, E. A., Sims, G. E. C. Thromb. Res. 1976; 9: 575-580). Se precalentó a 37 °C CaCl₂ 25 mM y cubetas de fibrina (Fisher). Se añadieron 0,1 ml de plasma humano descongelado (normal o hemofílico) a los tubos de ensayo calentados. Se incubaron 5 µl de solución salina o 5 µl del agente de ensayo (por ejemplo, PSNA) disuelto en solución salina con 95 µl de plasma durante 30 minutos a temperatura ambiente. El reactivo APTT (por ejemplo, Organon Teknika) se reconstituyó en 3 ml de agua destilada y se añadieron 0,1 ml de la solución reconstituida que contenía el reactivo APTT a cada tubo de ensayo. Se transfirieron 0,2 ml de plasma que contenía el agente de ensayo o el control de solución salina y el reactivo aPTT
50 desde los tubos de ensayo a las cubetas de fibrina precalentadas y se incubaron durante 2-3 minutos. Se añadieron 0,1 ml de CaCl₂ 25 mM precalentados para iniciar la coagulación, y se midió el tiempo de coagulación del plasma con un fibrómetro BBL FIBROSISTEM.

Ensayo de tiempo de protrombina diluida (dPT)

El ensayo de dPT utilizado fue un ensayo clínico PT de referencia modificado (Nordfang y col. (1991) *Thromb Haemost* 66: 464-467; Welsch y col. (1991) *Thrombosis Research* 64: 213-222). Se reconstituyó el reactivo de tromboplastina SIMPLASTIN EXCEL (Organon Teknika) con el diluyente del fabricante y después se diluyó 1:100 en solución salina al 0,9%. El reactivo de tromboplastina, CaCl₂ 25 mM, y las muestras de plasma se precalentaron a 37 °C antes de iniciar el ensayo. Se dividieron en alícuotas 100 µl de plasma descongelado en tubos de microcentrífuga. Para las mediciones de la inhibición de la actividad del TFPI, se añadieron 5 µl de solución salina (por ejemplo, Sigma) o 5 µl del agente de ensayo (por ejemplo, polisacárido sulfatado) a 95 µl de plasma y se incubaron durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de reactivo de tromboplastina diluido y 100 µl de CaCl₂ 25 mM a las cubetas de fibrina (Fisher) precalentadas a 37 °C. Se añadieron 100 µl de plasma (normal o hemofílico) que contenía el agente de ensayo o solución salina control a las cubetas de fibrina que contenían el reactivo tromboplastina y el CaCl₂ para iniciar la coagulación. El tiempo de coagulación del plasma se midió con el fibrómetro BBL FIBROSYSTEM.

Ensayos de tiempo de sangrado en animales

El ensayo de tiempo de sangrado se puede usar para medir los cambios en la función hemostática en roedores normales o hemofílicos (deficiencia de FVII o FIX o FvW) después de la administración de un agente de ensayo (por ejemplo, control con vehículo o PSNA). Se administra un agente de ensayo (por ejemplo un control con vehículo o un PSNA) a un roedor una o dos veces al día por vía oral, parenteral, o por infusión continua. Por ejemplo, pueden administrarse 0,1 ml/10 g de peso corporal (subcapsular) de un agente de ensayo a una dosis que varía de 0,1 a 10 mg/kg con agujas de pequeño calibre dos veces al día durante al menos un día y preferentemente más de 3 días. El día que se ensaya el tiempo de sangrado, los roedores se anestesian con ketamina/xilacina (o isoflurano). Los roedores se alinean sobre una almohadilla estéril con una placa de Petri con solución salina para la inmersión de la cola. Se aplica crema EMLA en la cola de los roedores en el sitio donde se pretende cortar. En el caso de los ratones, se corta la punta de la cola, y la cola se coloca en la placa con solución salina y se pone en marcha un temporizador. En el caso de las ratas, se hace una incisión de 8 mm de longitud y 1 mm de profundidad sobre la parte dorsal de la cola de la rata, y después se transfiere a solución salina. Se registra el tiempo de cese del sangrado visible en la solución salina. Para los roedores, los tiempos de sangrado son aproximadamente de 10 minutos para los ratones normales de control y 6 minutos para las ratas normales de control. Después de completar el ensayo del tiempo de sangrado, la cola del roedor se seca con una gasa estéril, se verifica la hemostasia, y el roedor se devuelve a la jaula. Se puede aplicar nitrato de plata en el corte, si fuera necesario.

Como alternativa, los tiempos de sangrado se pueden medir en ratones (Broze y col. (2001) *Thromb. Haemost.* 85:747-748) o en perros (Scallan y col. (2003) *Blood* 102:2031-2037; Pijnappels y col. (1986) *Thromb. Haemost.* 55:70-73) por otros procedimientos. Unos criterios de valoración farmacodinámicos alternativos o adicionales pueden incluir el muestreo de sangre de sujetos tratados con PSNA para el análisis directo o aislamiento del plasma, y la medición de los tiempos de coagulación *ex vivo* (por ejemplo, Tiempo de Coagulación en Sangre Completa y/o PT y/o APTT) o niveles de factores de coagulación.

Ensayo de Tiempo de Coagulación de Sangre Completa (WBCT)

El ensayo WBCT se realizó como sigue. Los ratones se anestesiaron brevemente en una cámara de isoflurano. Después se extrajo sangre a los ratones (por ejemplo, 150 µl) del plexo retroorbital en tubos de plástico de recolección de sangre. Los tubos se colocaron en un baño de agua a 37 °C y se usó un temporizador para medir el tiempo de coagulación. Durante este periodo, los tubos se invirtieron a intervalos de 1 minuto. Se midió el tiempo necesario para la coagulación de la sangre (coágulo total/no parcial).

Analizadores estadísticos

Para los ensayos de coagulación, se utilizó el ensayo t de Student para analizar la significación entre las muestras tratadas con PSNA y los controles con vehículo. Los datos de los ensayos de sangrado de ratón se estudiaron con respecto a la significación con respecto a los controles con vehículo (u otros grupos como se indica en las tablas más adelante) por análisis Chi cuadrado de una vía. Se obtuvieron resultados casi idénticos con el ensayo exacto de Fisher.

Ejemplo 2**50 El TFPI incrementa el tiempo de coagulación en el ensayo de dPT**

Los siguientes experimentos se realizaron para demostrar que el TFPI incrementa el tiempo de coagulación en el ensayo de dPT y para determinar una concentración de TFPI para su uso en experimentos PSNA posteriores. Se diluyó secuencialmente una solución de reserva de 100 µl/ml de TFPI (American Diagnostica, Stamford, CT) en solución salina para generar soluciones de TFPI con las siguientes concentraciones: 20, 15, 10, 6, y 2 µl/ml. Se mezclaron 5 µl de esas diluciones de TFPI con 95 µl de plasma deficiente en FVIII y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los ensayos de dPT se llevaron a cabo como sigue: se diluyó tromboplastina

SIMPLASTIN 1:100 en solución salina y se precalentó a 37 °C. Se precalentaron a 37 °C CaCl₂ 25 mM y 100 µl de plasma de ensayo que contenía TFPI. Se mezclaron 100 µl de tromboplastina SIMPLASTIN y 100 µl de CaCl₂ y se midió el tiempo de coagulación usando un fibrómetro BBL. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

Tiempos de Coagulación en Presencia de TFPI	
Concentración de TFPI en el plasma (µl/ml)	Tiempo de coagulación (segundos)
1	>200
0,75	173
0,5	98
0,3	94
0,1	60

5 El TFPI incrementaba el tiempo de coagulación en plasma Hem-A con una respuesta lineal con la dosis (véase la Figura 1). Basándose en estos datos, se eligió una concentración de 0,5 µl/ml de TFPI para los ensayos de la función procoagulante de PSNA.

Ejemplo 3

Detección de PSNA

10 Se ensayaron compuestos polisacáridos sulfatados, incluyendo heparinas modificadas, pentosano polisulfato, y fucoidán con respecto a la actividad anticoagulante y se compararon con la heparina para determinar si se calificaban como "no anticoagulantes". Los compuestos ensayados se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

PSNA ensayados con respecto a la actividad anti-coagulante		
PSNA	Compañía/nº de catálogo	PM (kd)
N-acetil-heparina (NAH)	Sigma Chem. Co. A8036	18
Heparina N-acetil-des-O-sulfatada (Na-de-o-SH)	Sigma Chem. Co. A6039	18
Heparina des-N-sulfatada (De-NSH)	Sigma Chem. Co. D4776	18
Heparina des-N-sulfatada acetilada (De-NSAH)	Sigma Chem. Co. D9808	18
Pentosán polisulfato sódico (PPS)	Ivax Pharmaceuticals, Inc. NDC 17314-9300-1	5
Fucoidán	Sigma Chem. Co. F5631	100
Heparina sódica	Sigma Chem. Co. H4784	18

15 Los compuestos de ensayo se diluyeron a 100 µM, 10 µM, 2 µM y 200 nM. Para cada compuesto de ensayo, se añadieron 12,5 µl de una solución diluida que contenía el compuesto de ensayo a 237,5 µl de plasma Hem-A y se incubaron a temperatura ambiente. Se retiraron 100 µl de plasma que contenía el compuesto de ensayo para los ensayos de dPT de tiempo de coagulación del plasma como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se resumen en la Tabla 3 a continuación.

TABLA 3

Efecto de los PSNA en el Tiempo de coagulación de acuerdo con el ensayo de dPT							
Concentración de PSNA (nM)	NAH	NA-de-O-SH	De-N-SH	De-N-S-AH	PPS	Heparina	Fucoidán
10	38	40	40	39	39	40	39
100	37	40	38	37	37	92	38
500	36	40	38	40	40	400	60
5000	38	40	41	55	70		

* Los valores que se muestran son tiempos de coagulación (segundos) para los polisacáridos seleccionados. El tiempo de coagulación del plasma Hem-A en ausencia de PSNA es de 41,5 segundos.

20 Como se muestra en la Tabla 3 y en la Figura 2, la heparina a concentraciones que exceden los 10 nM fue marcadamente anticoagulante mientras que la N-acetil heparina (NAH), la heparina N-acetil-des-O-sulfatada (Na-de-O-SH) y la heparina des-N-sulfatada (De-N-SH) muestran poca o ninguna prolongación del tiempo de coagulación a concentraciones >5000 nM. De forma similar, el fucoidán y el PPS fueron solo anticoagulantes débiles, mostrando un 50% de prolongación del tiempo de coagulación a concentraciones aproximadamente 10 a 100 veces mayores,

respectivamente, que la heparina y por tanto se definen como “no anticoagulantes”. Se observó un perfil casi idéntico en plasma humano normal (datos no mostrados).

Ejemplo 4

Efecto de los PSNA sobre la coagulación de plasma humano de acuerdo con el ensayo de aPTT

- 5 El efecto de los PSNA en el tiempo de coagulación del plasma se midió también usando un ensayo de aPTT para determinar si se califican como “no anticoagulantes”. Se hicieron diluciones de FACT; un plasma “normal” humano de referencia (George King Biomedical) en plasma Hem-A humano para generar plasma con concentraciones de plasma normal de 0,31-100%. El ensayo de aPTT se realizó como sigue: se mezclaron 100 μ l de una mezcla de plasma FACT-Hem-A y 100 μ l de reactivo aPTT y se incubaron a 37 °C durante 3 minutos. Se añadieron 100 μ l de CaCl₂, y se midió el tiempo transcurrido hasta la coagulación del plasma usando un fibrómetro BBL. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Efecto de la concentración de FACT sobre el tiempo de coagulación	
Conc. de FACT en plasma Hem-A (%)	Tiempo de aPTT (segundos)
100	40
50	40
25	42
10	50
5	54
2,5	60
1,25	64
0,63	69
0,31	76
0	96

- 15 Basándose en estos datos, se eligió una concentración de FACT del 1,25% para los ensayos de detección de PSNA para comprobar su actividad procoagulante. El efecto de los PSNA sobre el tiempo de coagulación del plasma se determinó como sigue: se añadieron 5 μ l de un PSNA a 95 μ l de FACT diluido en plasma humano Hem-A al 1,25% y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los ensayos de aPTT se realizaron para determinar el tiempo de coagulación del plasma como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Efecto de los PSNA sobre el tiempo de coagulación del plasma de acuerdo con el ensayo de aPTT				
Concentración de PSNA (nM)	Tiempo de coagulación con NAH (seg)	Tiempo de coagulación con PPS (seg)	Tiempo de coagulación con Fucoidán (seg)	Tiempo de coagulación con Heparina (seg)
0,16			71	
0,8	70	70	70	70
4	69	71	71	70
20	67	72	75	200
100	74	80	119	No coagulado
500	85	113		No coagulado

- 20 Se demostró la validación adicional de la actividad de “PSNA” por evaluación de tres compuestos en un ensayo de coagulación APTT con plasma Hem-A. Las concentraciones que producían aproximadamente el 50% de prolongación en el tiempo de coagulación fueron 10 o 100 o >500 veces mayores para el fucoidán, PPS, y NAH, respectivamente, que para la heparina (véase la Figura 3).

Ejemplo 5

A. Preincubación de TFPI con los PSNA antes de la adición al plasma

- 25 La inhibición de la actividad TFPI por PSNA se evaluó en ensayos de coagulación de dPT con plasma normal o hemofílico y TFPI recombinante añadido. Se preincubó TFPI recombinante diluido con PSNA durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de que se añadiera el plasma. Tras la adición del plasma, la mezcla se incubó 25

minutos adicionales seguido del inicio de dPT. Los resultados para los ensayos realizados en plasma Hem-A se muestran en la Tabla 6 y en la Figura 4.

TABLA 6

Inhibición de actividad de TFPI por PSNA en plasma Hem-A			
Concentración de PSNA (nM)	Tiempo de coagulación con Fucoidán (seg)	Tiempo de coagulación con PPS (seg)	Tiempo de coagulación con NAH (seg)
500	75	74	84
100	46	57	99
20	54	55	141
4	72	91	160
0,8	108	111	158
0,16	130	158	144

El tiempo de coagulación de plasma Hem-A solo es de 44 segundos.
El tiempo de coagulación de plasma Hem-A + TFPI es de 151 segundos

5 El TFPI a una concentración final de aproximadamente 0,5 µg/ml prolongó el tiempo de coagulación del plasma de aproximadamente 40 segundos a 100-200 segundos dependiendo del experimento y la fuente de plasma humano. Si la actividad del TFPI se inhibiera por los polisacáridos sulfatados, se observaría un acortamiento del tiempo de coagulación en presencia de PSNA (véase Nordfang y col. (1991) Thromb. Haemost. 66(4): 464-467). Como se muestra en la Figura 4, la adición de fucoidán y PPS a concentraciones mayores de 1 nM aceleró significativamente la coagulación del plasma Hem-A que contenía TFPI. Por el contrario, las concentraciones requeridas de NAH de aproximadamente 100 nM para acortar el tiempo de coagulación, y la heparina (no mostrada) solamente prolongaron los tiempos de coagulación. Más importante, a concentraciones óptimas de PPS o fucoidán, el tiempo de coagulación se acortó hasta los niveles sin TFPI o de control con vehículo, o ligeramente por debajo de estos valores, y la amplitud de la neutralización del efecto de TFPI abarcó al menos un intervalo de 100 veces (por ejemplo, 5 a 500 nM).

15 La aceleración de la coagulación del plasma por los PSNA en presencia de TFPI también se ensayó en plasma Hem-B y normal. Los resultados de los ensayos realizados en plasma Hem-B se muestran en la Tabla 7 y la Figura 5.

TABLA 7

Inhibición de la actividad de TFPI por los PSNA en plasma Hem-B			
Concentración de PSNA (nM)	Tiempo de coagulación con Fucoidán (seg)	Tiempo de coagulación con PPS (seg)	Tiempo de coagulación con NAH (seg)
500	60	56	68
100	50	52	94
20	54	65	106
4	80	82	106
0,8	95	90	101
0,16	108	106	102

Tiempo de coagulación de Hem-B solo, sin TFPI: 46 segundos.
Tiempo de coagulación de Hem-B + TFPI: 101 segundos

20 La aceleración de la coagulación del plasma por los PSNA, presumiblemente por la inhibición de la actividad del TFPI, se demostró similarmente en plasma Hem-B (Tabla 7 y Figura 5) y plasma humano normal (datos no mostrados). El orden de clasificación de la potencia entre los PSNA fue idéntico a los estudios con plasma Hem-A y el perfil de concentración-respuesta fue casi idéntico.

B. Inhibición de la actividad del TFPI sin preincubación del TFPI con PSNA

Los experimentos se repitieron sin la preincubación de los polisacáridos sulfatados con TFPI antes de la exposición al plasma. Para aumentar el rigor del ensayo de inhibición de la actividad del TFPI por los PSNA, el TFPI se añadió al plasma antes de que se añadiera el PSNA. Los resultados se muestran en la Tabla 8 y la Figura 6.

25

TABLA 8

Inhibición del TFPI por NAH y PPS en plasma Hem-A sin preincubación			
Concentración de PSNA (nM)	Tiempo de coagulación con NAH (seg)	Tiempo de coagulación con PPS (seg)	Tiempo de coagulación con Fucoidán (seg)
500	89	73	90
100	125	76	54
20	184	81	59
4	180	156	78
0,8	165	192	210
HemA + TFPI: 183 segundos Hem-A solo, sin TFPI: 45 segundos			

5 Como se representa en la Figura 6, los PSNA demostraron claramente la misma propiedad de aceleración del tiempo de coagulación en el plasma Hem-A con perfiles casi idénticos de dosis-respuesta que en los estudios de preincubación (Figura 4). Es interesante que el fucoidán fue el más potente y la ventana de concentración para la aceleración de la coagulación significativa fue mayor de 100 veces. Los estudios establecieron por tanto que ciertos PSNA tales como PPS y fucoidán podrían mostrar la actividad neutralizante de TFPI, y que tal eficacia se demostró en un intervalo muy amplio de concentraciones en las que no se observó la anticoagulación neta.

Ejemplo 6

Mejora de la coagulación de plasma hemofílico por los PSNA en ausencia de suplementación con TFPI

10 La capacidad de los PSNA para acelerar la coagulación del plasma deficiente de factores en ausencia de suplementación de TFPI también se ensayó en ensayos de dPT. Una respuesta procoagulante, si se observa, puede relacionarse con la neutralización de la actividad endógena de TFPI, que está presente en el plasma humano a aproximadamente 100 ng/ml (Nordfang y col., *supra*), asociado en gran medida con lipoproteínas o plaquetas (Broze y col. (1992) *Semin. Hematol.* 29: 159-169; Broze y col. (2003) *J. Thromb. Haemost.* 1:1671-1675).

15 A. Aceleración de la coagulación en plasma Hem-A en ausencia de TFPI exógeno

Se ensayó la capacidad de los PSNA para acelerar la coagulación del plasma Hem-A en ausencia de TFPI exógeno. El fucoidán o el PPS se titularon en el plasma Hem-A y se llevaron a cabo los ensayos de dPT. Adicionalmente, se analizó la dosis-respuesta al factor VIIa como control positivo para amplificar la activación de la ruta extrínseca. Los resultados se muestran en la Figura 7 y en la Tabla 9.

TABLA 9

Aceleración de coagulación del plasma Hem-A en ausencia de TFPI exógeno			
Concentración de PSNA (nM)	Tiempo de coagulación con Fucoidán (seg)	Tiempo de coagulación con PPS (seg)	Tiempo de coagulación con FVIIa (seg)
100	56	60	
20	55	62	49
4	63	66	56
0,8	68	68	62
0,16	70	69	68
Tiempo de coagulación de Hem-A solo, sin PSNA: 69 segundos			

20 Tanto el fucoidán como el PPS aceleraron significativamente el tiempo de coagulación de una forma dependiente de la dosis, mostrando el fucoidán la mejor potencia y la máxima eficacia. Como en otros estudios, había una ventana de efecto procoagulante que, en el caso del fucoidán, variaba de aproximadamente 5 nM a >100 nM. Se señala en la Figura 7 que mientras la curva de respuesta empieza a desviarse hacia arriba a concentraciones de fucoidán >100 nM, la coagulación aún se acelera con respecto al control con vehículo, y el fucoidán es por tanto procoagulante.

25 Aunque el acortamiento del tiempo de coagulación de aproximadamente 70 segundos a 55 segundos con fucoidán 20 nM no es un margen grande, la NAH no tenía actividad. Dicha aceleración se ha observado previamente con factores procoagulantes tales como el FVIIa y la trombina. De acuerdo con esto, la adición de FVIIa a 20 nM aceleró los tiempos de coagulación aproximadamente 20 segundos, que fue mayor que la de fucoidán (Figura 7). Sin embargo, es interesante señalar que el fucoidán 20 nM actuaba comparablemente a una concentración

farmacológica de 5 nM de FVIIa.

B. Aceleración de la coagulación en plasma Hem-B y plasma deficiente en FVII en ausencia de TFPI exógeno

La evaluación de la actividad procoagulante aparente de los PSNA se extendió a otros trastornos hemorrágicos humanos por el ensayo de la actividad de los PSNA en plasma Hem-B y plasma deficiente en FVII. Se observaron similares resultados a los que se mostraron para el plasma Hem-A en el plasma Hem-B (datos no mostrados).

La regulación de coagulación en el plasma deficiente de Factor VII se evaluó también por ensayos de dPT. Como se esperaba, el plasma deficiente de FVII no se coagulaba a los 300 segundos sin reconstitución de FVIIa. La adición de FVIIa a aproximadamente 0,1 nM restauró el tiempo de coagulación a aproximadamente 150 segundos (datos no mostrados). Esta variación en el tiempo de coagulación mostrada en el ensayo de dPT imita algunas formas de deficiencia del factor VII humano. La titulación de fucoidán y PPS en el plasma deficiente de FVII aceleró los tiempos de coagulación. Los resultados se muestran en la Figura 8 y la Tabla 10.

TABLA 10

Aceleración de la coagulación del plasma deficiente de Factor VII en ausencia de TFPI exógeno		
Concentración de PSNA (nM)	Tiempo de coagulación con Fucoidán (seg)	Tiempo de coagulación con PPS (seg)
500	111	113
100	74	142
20	120	159
4	147	181
0,8	168	198
Tiempo de coagulación sin PSNA, sin FVIIa: >300 segundos		
Tiempo de coagulación sin PSNA, +0,1 nM de FVIIa: 173 segundos		

Como se muestra en la Figura 8, la titulación de fucoidán y PPS aceleraron la coagulación del plasma deficiente de FVII y, como se observaba en el plasma Hem-A, el fucoidán fue significativamente más potente y eficaz que el PPS. Una vez más, la ventana terapéutica fue amplia; en el caso del fucoidán, se observó una aceleración de la coagulación con intervalos de concentraciones de 10 nM a 500 nM.

Ejemplo 7

Mejoría de la hemostasia en ratones tratados con PSNA

Se trataron ratones Hem-A o Hem-B con PPS y fucoidán para evaluar la mejoría potencial de la hemostasia *in vivo*. Los PSNA se inyectaron por vía subcutánea ya que la dosificación frecuente se tolera razonablemente bien en ratones hemofílicos y se ha establecido previamente la biodisponibilidad de esta vía para varios polisacáridos sulfatados (MacGregor y col. (1985) *Thromb. Haemost.* 53:411-414; Millet y col. (1999) *Thromb. Haemost.* 81:391-395). Las vidas medias del PPS y el fucoidán puede ser tan cortas como 1-2 horas. Por tanto, se adoptó un régimen de dosificación de dos veces al día. Los estudios iniciales indicaron que se prefería la dosificación de varios días sobre 1-2 días.

Los efectos del tratamiento con PSNA sobre la regulación de la coagulación en los ratones tratados se evaluó basándose en varios criterios de valoración potenciales, incluyendo el aislamiento del plasma para los ensayos de dPT, el muestreo de sangre para el ensayo del tiempo de coagulación de sangre completa (WBCT), los tiempos de sangrado agudo, y la supervivencia a largo plazo después del corte de la cola o la incisión transversa (Broze y col. (2001) *Thromb. Haemost.* 85:747-748). Los resultados de los estudios en 5 días *in vivo* con PPS y fucoidán se resumen en las Tablas 11-13.

A. Eficacia del PPS en ratones Hem-A y Hem-B

Se ensayó la eficacia del PPS para mejorar la coagulación en ratones Hem-A y Hem-B. A ratones machos o hembras Hem-A y Hem-B se les administró PPS a una dosis de 0,02, 0,06, o 0,2 mg/kg de vehículo salino por vía subcutánea dos veces al día durante 5 días. En la mañana del quinto día tras la dosificación, se les cortó la cola a 1 cm de la punta, y se supervisó el comportamiento y la supervivencia las siguientes 20-24 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

TABLA 11

Mejoría de la hemostasia en ratones hemofílicos tratados con PPS			
Hemofilia	Grupo de tratamiento	n/grupo	% Supervivencia (20 horas después del corte)
A (deficiente de FVIII)	Vehículo de control	8	25
	0,02 mg/kg	5	20
	0,06 mg/kg	9	44 [#]
	0,2 mg/kg	5	40
B (deficiente de FIX)	Vehículo de control	8	25
	0,06 mg/kg	9	44 [#]

Los ratones se eligieron al azar y se dosificaron por vía subcutánea con el agente indicado dos veces al día durante 4,5 días a lo que le siguió el corte de la cola (t=0).
[#] p=0,07 vs. vehículo

5 El tratamiento de ratones Hem-A con PPS a 0,06 mg/kg mostró una mejora de casi dos veces en la supervivencia, pero el resultado no fue estadísticamente significativo ($0,05 < p < 0,1$) (Tabla 11). Los beneficios terapéuticos se apoyaron además por observaciones visuales del equipo técnico sin conocimiento de los grupos de tratamiento, que observaron comportamientos más normales (menos letargia y encorvamiento) y menos sangrado extensivo en los animales con dosis media y alta con respecto a los controles con vehículo. De forma similar, el tratamiento posterior de los ratones Hem-B con la dosis más eficaz de 0,06 mg/kg por vía subcutánea dos veces al día produjo un resultado idéntico al observado en los ratones deficientes de FVIII.

10 La eficacia del PPS en la mejora de la coagulación en ratones Hem-B se ensayó además por ensayos de dPT. Se extrajo sangre de todos los ratones antes del estudio para establecer la línea base (preensayo) de los tiempos de coagulación. Los ratones (de 14 semanas de edad) se trataron por vía subcutánea dos veces al día con PPS durante 4,5 días a las siguientes dosis: 2, 0,3 y 0,06 mg/kg en un volumen de 250 μ l. Se extrajo sangre de los ratones después de 4,5 días, y se determinaron los tiempos de coagulación de las muestras de sangre recogidas. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

TABLA 12

Coagulación para los ratones Hem-B tratados con PPS		
Mejora del dPS por PSNA		
Grupo (mg/kg)	Tiempos de coagulación individuales a los 4,5 días (min)	Media del tiempo de coagulación a los 4,5 días (min)
0,06	44	37
	42	
	26	
0,3	43	38
	31	
	39	
2,0	42	44
	45	
	44	

Los Hem-B sin experimentación previa tienen una variación en dPT de 44-50 segundos.

15 B. Eficacia del fucoidán en ratones Hem-A

Dada la potencia mejorada y la magnitud de la eficacia del fucoidán con respecto al PPS en algunos de los ensayos de coagulación descritos anteriormente, se llevaron a cabo estudios adicionales en ratones Hem-A con fucoidán. En el primer estudio con fucoidán, se adoptó casi el mismo régimen que se describió para el PPS pero con niveles de dosis ligeramente diferentes. A los machos de ratones Hem-A se les administró fucoidán a una dosis de 0,1 o 1,0 mg/kg o solución salina por vía subcutánea dos veces al día durante 4 días. En la mañana del 5° día, los ratones recibieron una dosis doble de fucoidán antes del ensayo de sangrado. Se evaluaron la supervivencia y el comportamiento de los animales para los ratones tratados con fucoidán comparados con los controles con vehículo.

20 En un segundo estudio con fucoidán, se evaluó el potencial de la terapia de combinación con factor VIII. Este estudio se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente, excepto porque en la mañana del quinto día, los ratones

5 recibieron una dosis intravenosa en embolada de FVIII de 53 mU/ratón (aproximadamente el 1,25% del nivel normal de FVIII) en la vena caudal en el extremo cercano al cuerpo. Como antes, la vena lateral de la cola, y no la arteria, se cortó transversalmente 2 horas más tarde en la región correspondiente a un diámetro de aproximadamente 2,7 mm. En estos estudios de fucoidán se utilizó la modificación del corte transversal de la vena de la cola ya que se consideró que evaluaba de forma más precisa la hemostasia y su regulación (Broze y col. (2001) *Thromb. Haemost.* 85:747-748). Se registraron la supervivencia y las observaciones clínicas durante 20-24 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

TABLA 13

Eficacia del fucoidán y la combinación de fucoidán + FVIII en ratones con Hemofilia A			
Grupo de Tratamiento	n/grupo	% supervivencia	
		9 h	20 h
Control con vehículo	14	21	7
Fucoidán (0,1 mg/kg)	13	61*	38 ⁺
Factor VIII (reconstitución al 1,25%)	7	57*	57*
Fucoidán+FVIII	7	86*	86* [#]

Los ratones se eligieron al azar y se dosificaron por vía subcutánea con vehículo o PSNA dos veces al día durante 4,5 días y se continuó por incisión de la vena de la cola (t=0). Donde se indica, se administró FVIII 2 horas antes del corte de la cola. Se señala que la reconstitución con FVIII al 1% produce ~10% de supervivencia mientras que la reconstitución con FVII al 2% proporciona ~100% de supervivencia en estos ratones.

* p<0,05 vs. vehículo
⁺ p=0,06 vs. vehículo
[#] p=0,06 vs. fucoidán

10 En el primer estudio, el tratamiento de los ratones con fucoidán a una dosis de 0,1 mg/kg parecía ser más eficaz que el tratamiento a la dosis de 1,0 mg/kg (la supervivencia a aproximadamente las 10 horas fue 1/6 para el vehículo, 4/6 para 0,1 mg/kg, y 3/6 para 1,0 mg/kg). Por lo tanto, el segundo estudio se llevó a cabo con fucoidán a una dosis de 0,1 mg/kg.

15 Como se indica en las 2 filas de arriba de la Tabla 13, el tratamiento con fucoidán de ratones Hem-A mejoró significativamente la supervivencia con sangrado. El comportamiento animal, como se ha descrito anteriormente, fue más normal en todos los ratones tratados con fucoidán durante la primeras 8-10 horas después de la incisión, y mejoró claramente a largo plazo en casi la mitad de los animales.

20 El potencial de la terapia de combinación se evaluó preliminarmente tratando a los ratones con FVIII +/- fucoidán (Tabla 13). Un estudio de una guía de dosis preliminar con la administración de FVIII solo a ratones Hem-A dos horas antes de la incisión de la cola indicó una relación dosis-respuesta muy escalonada para la supervivencia. La administración de ReFacto^R a un 1% de lo normal produjo aproximadamente un 10% de supervivencia, mientras que una dosificación al 2% de lo normal produjo aproximadamente el 100% de supervivencia (datos no mostrados). De acuerdo con esto, se seleccionó una dosis de reconstitución de FVIII al 1,25% para dar aproximadamente un 50% de supervivencia. Notablemente. El porcentaje de supervivencia en el grupo de tratamiento de fucoidán + FVIII fue consistentemente mayor que el de fucoidán o FVIII solos. Por tanto, los resultados de los estudios de PPS y fucoidán indican que la hemostasia se mejora en modelos animales de hemofilia tras la administración de PSNA seleccionados.

Conclusión

30 Se realizó una serie de estudios para ensayar los PSNA con respecto a la mejora de la coagulación en modelos de hemofilia *ex vivo* e *in vivo*. Se identificaron polisacáridos sulfatados con propiedades anticoagulantes sustancialmente reducidas con respecto a la heparina. Se mostró que un subgrupo de estos PSNA, particularmente fucoidán y PPS, inhibían de forma potente la actividad del TFPI, el regulador negativo predominante de la ruta extrínseca de la coagulación sanguínea. El fucoidán y el PPS mejoraron los tiempos de coagulación de la protrombina diluida del plasma humano deficiente en factores VII, VIII, o IX. Los beneficios terapéuticos del tratamiento con fucoidán o PPS *in vivo* fueron evidentes en los ensayos de sangrado de ratones hemofílicos.

35 Tanto el PPS como el fucoidán pueden mostrar actividad anticoagulante a mayores concentraciones, probablemente como resultado de la interacción con el cofactor II de la heparina (Church y col. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:3618-3623; Giedrojc y col. (1999) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34:340-345). El PPS requiere dosis >5 mg/kg cuando se administra por vía subcutánea en ratas para prolongar la coagulación (Giedrojc y col., *supra*), y el fucoidán parece ser bien tolerado en conejos incluso cuando se administra por vía intravenosa a 10 mg/kg (Granert y col. (1999) *Infect. Immun.* 67:2071-2074). Por tanto, los resultados actuales muestran que la hemostasia se mejora a dosis ≤ 0,1 mg/kg en roedores hemofílicos. Los niveles de dosis que mejoraron la hemostasia *in vivo* fueron menores que los que causaron otros efectos comunicados (Toida y col. (2003) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 15:29-46; Luyt y col. (2003) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305:24-30; Berteau y col. (2003) *Glycobiology* 13:29R-40R; Granert y col., *supra*; y Sweeney y col. (2002) *Blood* 99: 44-51).

Sin estar supeditados a ninguna teoría en particular, la inhibición del TFPI por los PSNA puede explicar en parte las mejoras en la coagulación *ex vivo* e *in vivo*. Se ha mostrado que la neutralización del TFPI por anticuerpos aumenta la hemostasia en un modelo de Hem-A en conejos y que acelera la coagulación del plasma hemofílico humano (Nordfang y col., *supra*; Welsch y col., *supra*; y Erhardtsen y col. (1995) Blood Coagul. Fibrinolysis 6:388-394). En los estudios actuales, solo los compuestos que inhiben la actividad del TFPI también reducen los tiempos de coagulación en los ensayos de dPT de plasma hemofílico. Adicionalmente, el fucoidán mostró mejor potencia y quizá mayor efecto máximo comparado con el PPS en el ensayo de coagulación de dPT cuando el TFPI se había mezclado previamente con el plasma para imitar mejor el entorno natural. De forma similar, el tratamiento con fucoidán en ratones produjo de alguna manera mejor eficacia que el PPS aunque la farmacocinética relativa no definida puede haber influido en los resultados de sangrado.

Debe tenerse en cuenta que tal comportamiento no fue aparente con todos los PSNA ensayados. Por ejemplo, la NAH solo mostró una débil actividad neutralizante de TFPI (Figuras 4-6) y no aceleró los tiempos de coagulación del plasma hemofílico en ausencia de adición de TFPI (datos no mostrados). Además, tres PSNA que fallaron en mostrar una actividad anticoagulante inherente a concentraciones de hasta 5000 nM (Figura 2; De-N-S-AH, De-N-SH, y NA-De-O-SH) no mostraron ninguna actividad neutralizante de TFPI y además fallaron en acelerar los tiempos de coagulación en plasma Hem-A (datos no mostrados).

La magnitud de la mejoría de la hemostasia observada con los PSNA parece ser clínicamente relevante. La mejoría en los tiempos de coagulación del plasma Hem-A a concentraciones óptimas de fucoidán, fue comparable a la obtenida con suplementación de FVIIa a aproximadamente 5 nM (Ejemplo 6), que ha resultado eficaz para normalizar la hemostasia en pacientes (Bishop y col. (2004) Nat. Rev. Drug Discov. 3:684-694; Carcao y col. (2004) Blood Rev. 18:101-113; Roberts y col. (2004) Anesthesiology 100:722-730; Lee y col. (2004) Int. Anesthesiol. Clin. 42:59-76; and Brummel y col. (2004) J. Thromb. Haemost. 2: 1735-1744). Además, los beneficios en supervivencia con el tratamiento con PSNA en ratones fue significativo (Ejemplo 7). La aceleración de la coagulación en los ensayos de dPT por el fucoidán es más pronunciada en plasma hemofílico humano que en el plasma de ratón (datos no mostrados).

Una consideración obvia con respecto al potencial desarrollo clínico de un PSNA para los trastornos hemorrágicos sería un índice terapéutico. Específicamente, el índice entre la hemostasia mejorada y la transición a la anticoagulación. Por los resultados de los ensayos de coagulación para compuestos tales como el PPS o el fucoidán en plasma humano, el margen entre la "actividad" anti-TFPI o la "actividad" de coagulación en dPT acelerada y la pérdida de dicha eficacia y el inicio de la coagulación neta parecería ser de ≥ 50 veces. Como se mencionó anteriormente para los estudios con ratón, el índice parecería ser, en ratones, al menos de diez veces. Además como clase, los polisacáridos sulfatados similares a la heparina generalmente se toleran bien.

En resumen, la administración sistémica de PSNA seleccionados puede representar una aproximación excepcional para regular la hemostasia en trastornos hemorrágicos. El pentosano polisulfato y el fucoidán, en particular, inhibían la actividad del TFPI y mejoraban la coagulación de los plasmas humanos deficientes de factores VII, VIII, y IX. Por tanto, el tratamiento con PSNA mejoraba la hemostasia y puede representar un suplemento o una alternativa relativamente barata, segura y conveniente para las terapias actuales de factores de coagulación.

Aunque se han ilustrado y descrito las realizaciones preferidas de la invención, se apreciará que pueden realizarse varios cambios en las mismas sin apartarse del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA) en la fabricación de una composición para tratar a un sujeto en necesidad de mejora en la coagulación sanguínea, en el que dicho PSNA muestra una actividad anticoagulante en un ensayo de coagulación de tiempo de protrombina diluida (dPT) o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) que no es más de un tercio de la actividad anticoagulante molar de la heparina no fraccionada, y además en el que el PSNA está seleccionado de fucoidán o un fragmento del mismo, N-acetil-heparina (NAH), heparina N-acetil-des-O-sulfatada (NA-de-os-SH), heparina des-N-sulfatada (De-NSH), heparina des-N-sulfatada acetilada (De-NSAH), pentosano polisulfato (PPS), condroitín sulfato o dermatán sulfato.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho PSNA es NAH.
3. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho PSNA es PPS.
4. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho PSNA es fucoidán.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el PSNA se administra a una dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.
6. El uso de las reivindicaciones precedentes, en el que el sujeto tiene un trastorno hemorrágico seleccionado del grupo que consiste en un trastorno hemorrágico agudo o crónico, un trastorno de la coagulación congénito causado por una deficiencia de factores sanguíneos, y un trastorno de la coagulación adquirido.
7. El uso de la reivindicación 6, en el que la deficiencia de factores sanguíneos es de uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor XI, factor XII, factor XIII, y factor de von Willebrand.
8. El uso de la reivindicación 1, en el que la causa de la necesidad para mejorar la coagulación de la sangre es la administración previa de un anticoagulante o cirugía u otro procedimiento invasivo.
9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sujeto se trata además mediante la administración de un agente seleccionado del grupo que consiste en un procoagulante, un activador de la ruta intrínseca de la coagulación, un activador de la ruta extrínseca de la coagulación, y un segundo PSNA.
10. El uso de la reivindicación 9, en el que el activador de la ruta intrínseca de la coagulación está seleccionado del grupo que consiste en factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa, precalicreína, y quinínogeno de alto peso molecular.
11. El uso de la reivindicación 9, en el que el activador de la ruta extrínseca de la coagulación está seleccionado del grupo que consiste en factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa.
12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sujeto además se trata por la administración de uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa, y factor de von Willebrand.
13. El uso de la reivindicación 8, en el que el anticoagulante está seleccionado del grupo que consiste en la heparina, un derivado de la cumarina, tal como warfarina o dicumarol, inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), antitrombina III, anticoagulante lúpico, péptido anticoagulante de nematodo (NAPc2), el factor VIIa bloqueado en el sitio activo (VIIai), inhibidores del factor IXa, inhibidores del factor Xa, incluyendo el fondaparinux, idraparinux, DX-9065a, y razaxabán (DPC906), inhibidores de los factores Va y VIIIa, incluyendo la proteína C activada (APC) y trombosmodulina soluble, inhibidores de la trombina, incluyendo la hirudina, bivalirudina, argatrobán, y ximelagatrán, y un anticuerpo que se une a un factor de coagulación.
14. El uso de la reivindicación 13, en el que el anticoagulante es un anticuerpo que se une a un factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste en Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XIII, Factor II, Factor XI, Factor XII, factor de von Willebrand, precalicreína, y quinínogeno de alto peso molecular (QAPM).
15. Uso de un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA) para inhibir la actividad del TFPI en una muestra biológica, en el que dicho PSNA muestra actividad anticoagulante en el ensayo de coagulación de tiempo de protrombina diluida (dPT) o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) que no es más de un tercio de la actividad anticoagulante molar de la heparina no fraccionada, y además en el que el PSNA está seleccionado del fucoidán o un fragmento del mismo, N-acetil-heparina (NAH), heparina N-acetil-des-O-sulfatada (NA-de-os-SH), heparina des-N-sulfatada (De-NSH), heparina des-N-sulfatada acetilada (De-NSAH), pentosano polisulfato (PPS), condroitín sulfato o dermatán sulfato.

16. Una composición inyectable para mejorar la coagulación de la sangre que comprende:

un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA); en el que dicho PSNA muestra actividad anticoagulante en un ensayo de coagulación de tiempo de protrombina diluida (dPT) o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) que no es más de un tercio de la actividad anticoagulante molar de la heparina no fraccionada, y además en el que el PSNA está seleccionado de fucoidán o un fragmento del mismo, N-acetil-heparina (NAH), heparina N-acetil-des-O-sulfatada (NA-de-os-SH), heparina des-N-sulfatada (De-NSH), heparina des-N-sulfatada acetilada (De-NSAH), pentosano polisulfato (PPS), condroitín sulfato o dermatán sulfato; un excipiente farmacéuticamente aceptable; y uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quininógeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, y factor de von Willebrand, factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa.

17. La composición inyectable de la reivindicación 16, que está seleccionada del grupo

- polvos o liofilizados que pueden reconstituirse con un disolvente antes de su uso,
- soluciones o suspensiones listas para inyección,
- composiciones secas insolubles para su combinación con un vehículo antes de su uso,
- y emulsiones y concentrados líquidos para su dilución antes de la administración.

18. El uso de la reivindicación 1, en el que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición.

19. Un procedimiento *in vitro* de inhibición de la actividad del TFPI en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento la combinación de la muestra biológica con una cantidad suficiente de un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA) para inhibir dicha actividad de TFPI, en el que dicho PSNA muestra una actividad anticoagulante en un ensayo de coagulación de tiempo de protrombina diluida (dPT) o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) que no es más de un tercio de la actividad anticoagulante molar de la heparina no fraccionada, y además en el que el PSNA está seleccionado de fucoidán o un fragmento del mismo, N-acetil-heparina (NAH), heparina N-acetil-des-O-sulfatada (NA-de-os-SH), heparina des-N-sulfatada (De-NSH), heparina des-N-sulfatada acetilada (De-NSAH), pentosano polisulfato (PPS), condroitín sulfato o dermatán sulfato.

20. Un procedimiento *in vitro* de medición de la aceleración de la coagulación sanguínea por un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA) en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:

- a) combinar la muestra biológica con una composición que comprende dicho PSNA, en el que dicho PSNA muestra una actividad anticoagulante en un ensayo de coagulación de tiempo de protrombina diluida (dPT) o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) que no es más de un tercio de la actividad anticoagulante molar de la heparina no fraccionada, y además en el que el PSNA está seleccionado de fucoidán o un fragmento del mismo, N-acetil-heparina (NAH), heparina N-acetil-des-O-sulfatada (NA-de-os-SH), heparina des-N-sulfatada (De-NSH), heparina des-N-sulfatada acetilada (De-NSAH), pentosano polisulfato (PPS), condroitín sulfato o dermatán sulfato.
- b) medir el tiempo de coagulación de dicha muestra biológica,
- c) comparar el tiempo de coagulación de dicha muestra biológica con el tiempo de coagulación de una muestra biológica correspondiente no expuesta al PSNA, en el que el descenso en el tiempo de coagulación de la muestra biológica expuesta al PSNA es indicativo de un PSNA que acelera el tiempo de coagulación.

21. Una composición inyectable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, en la que la composición está formulada para inyección intravenosa.

22. Una composición para mejorar la coagulación de la sangre que comprende:

un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA); en el que dicho PSNA muestra una actividad anticoagulante en un ensayo de coagulación de tiempo de protrombina diluida (dPT) o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) que no es más de un tercio de la actividad anticoagulante molar de la heparina no fraccionada, y además en el que el PSNA está seleccionado de fucoidán o un fragmento del mismo, N-acetil-heparina (NAH), heparina N-acetil-des-O-sulfatada (NA-de-os-SH), heparina des-N-sulfatada (De-NSH), heparina des-N-sulfatada acetilada (De-NSAH), o pentosano polisulfato (PPS), un excipiente farmacéuticamente aceptable; y uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quininógeno de alto peso molecular (QAPM), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, y factor de von Willebrand, factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa.

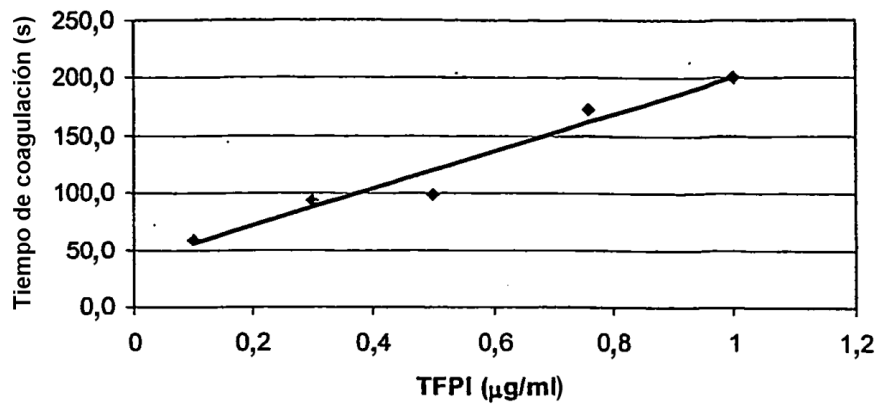


Figura 1

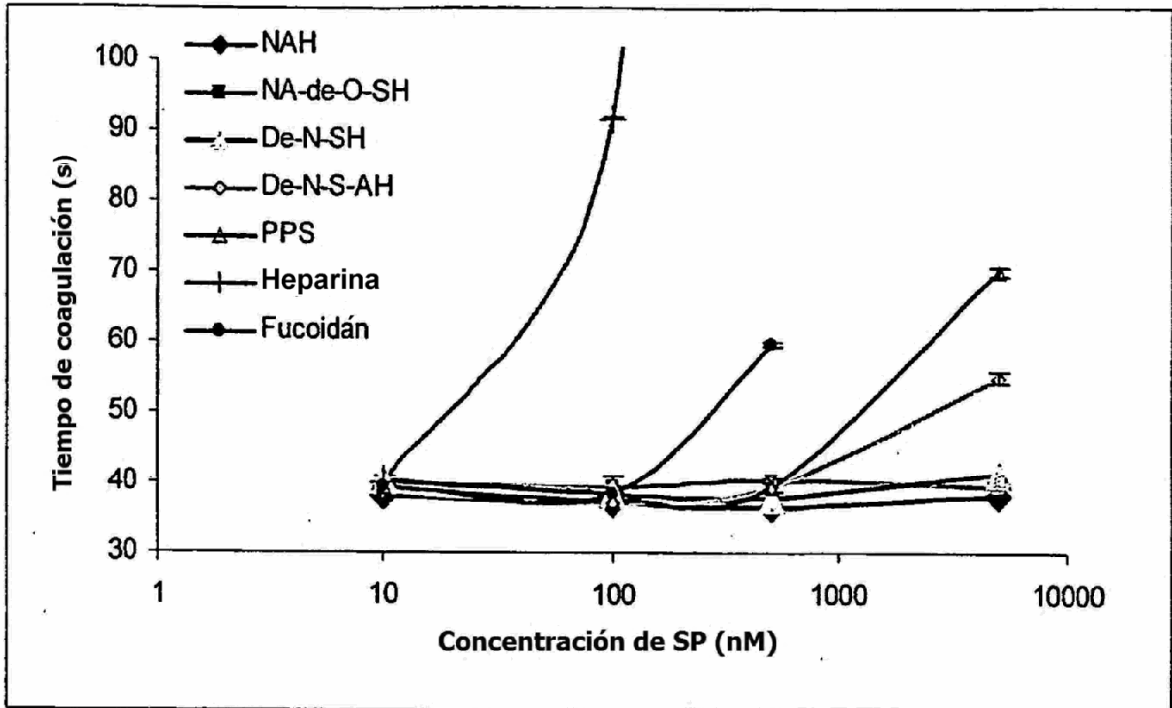


Figura 2

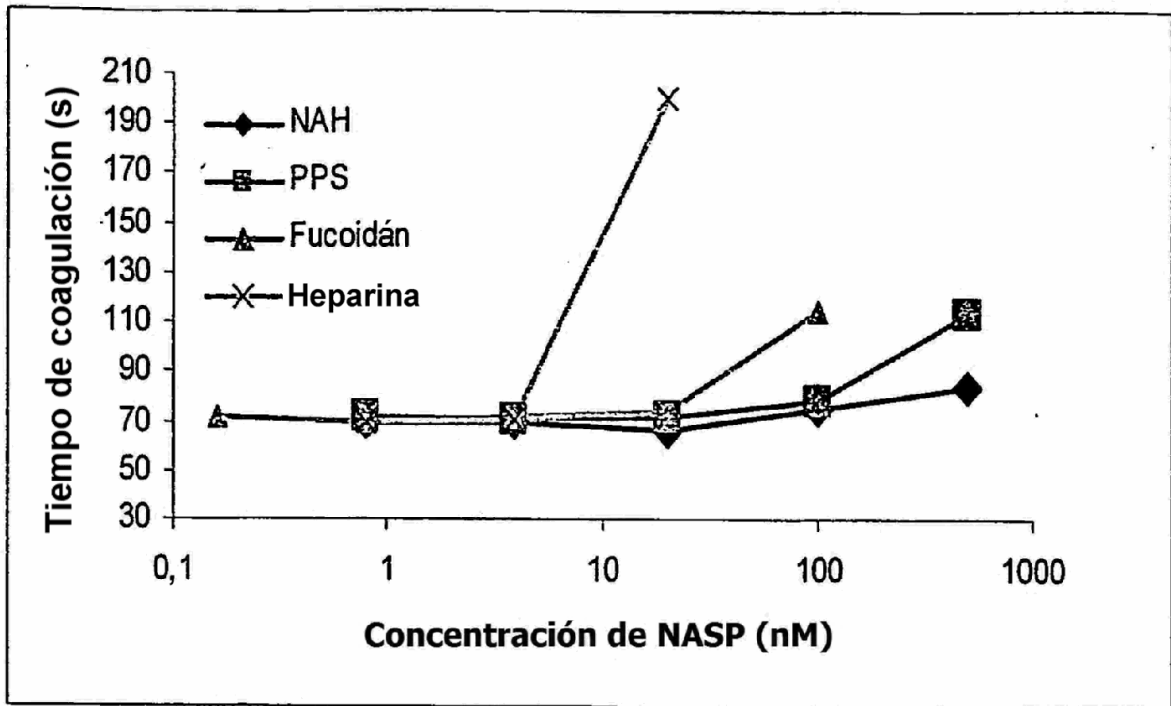


Figura 3

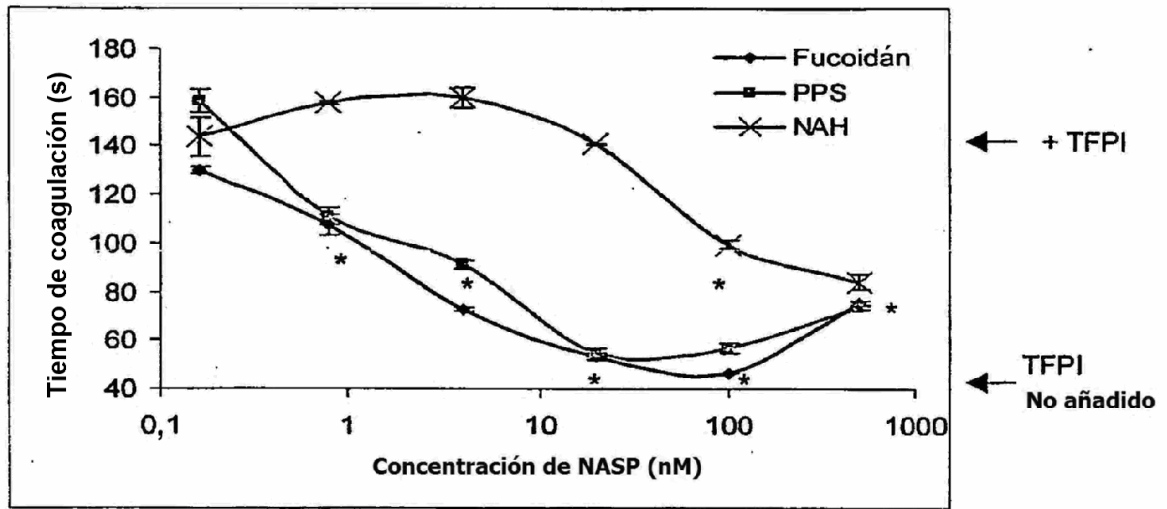


Figura 4

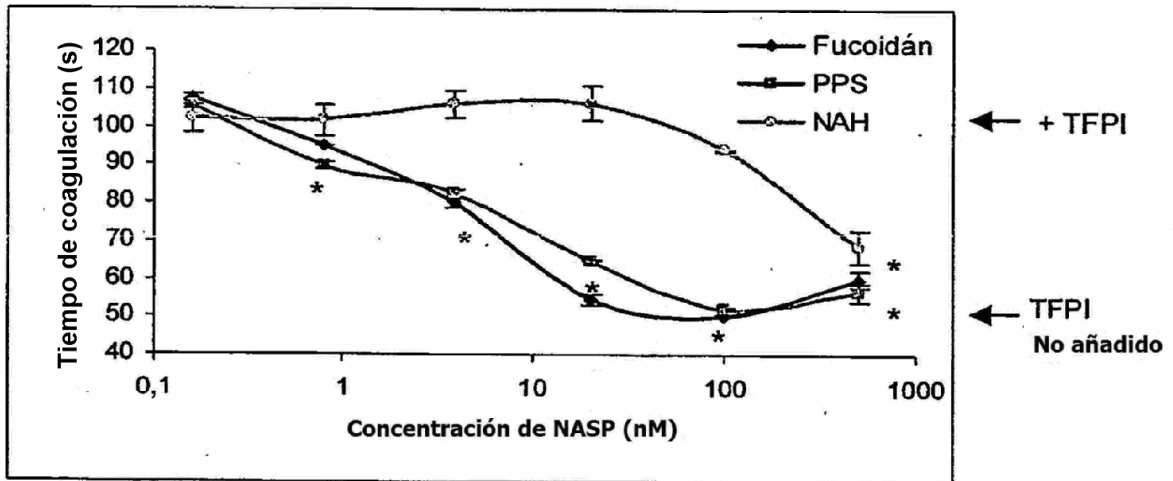


Figura 5

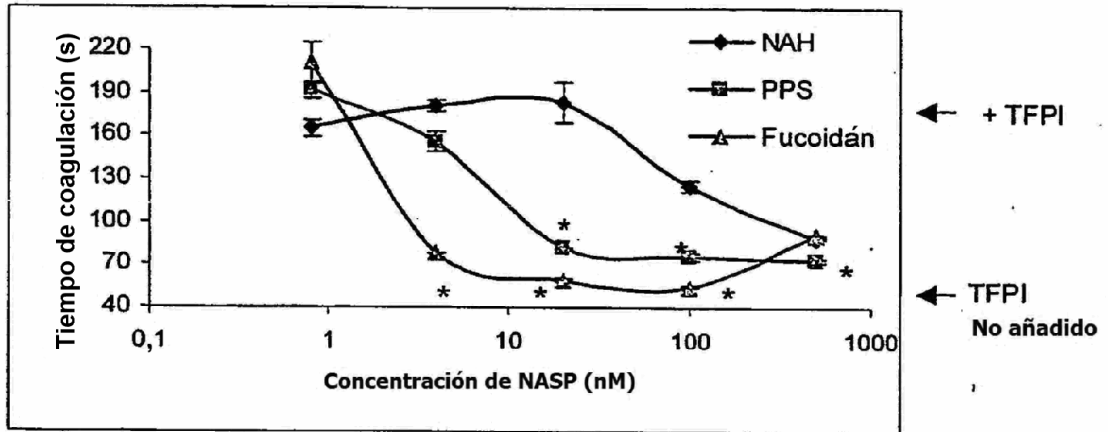


Figura 6

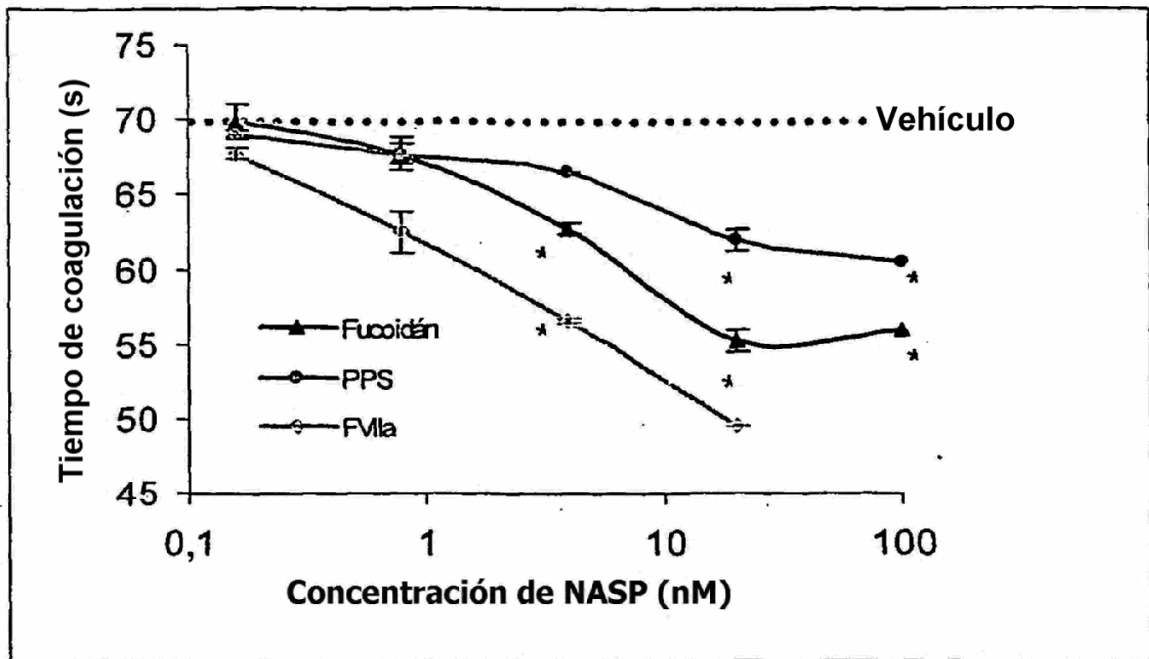


Figura 7

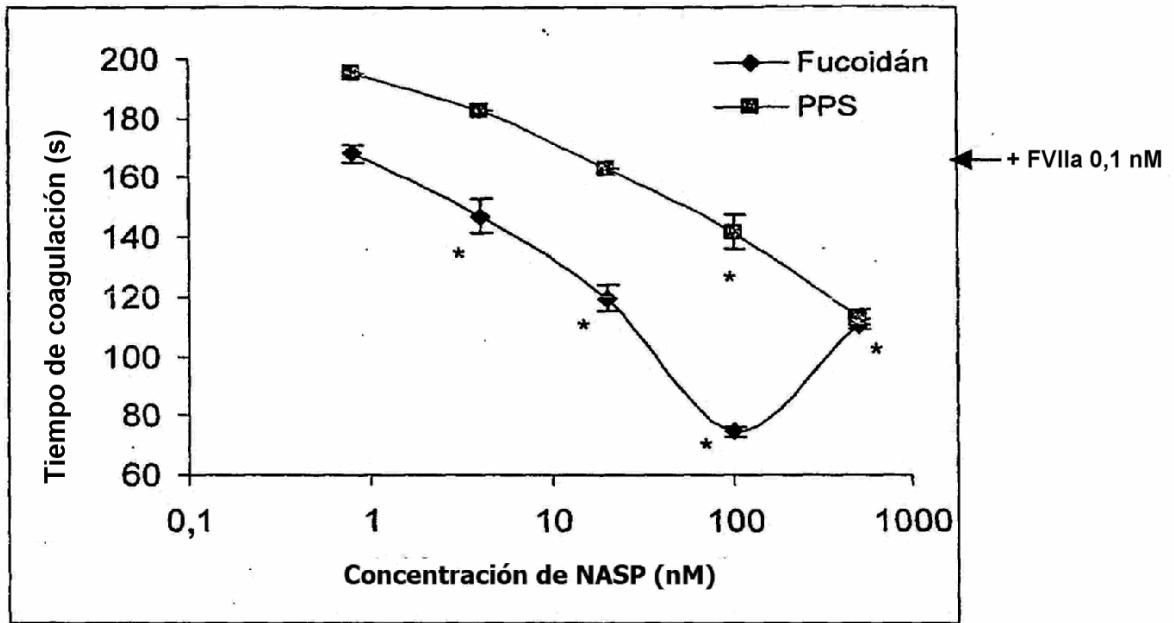


Figura 8