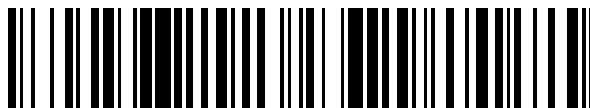


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 696**

21 Número de solicitud: 201231992

51 Int. Cl.:

A61K 33/24 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.12.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.07.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070905

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT DE BARCELONA (33.3%)
Centre de Patents de la UB - Baldri Reixac 4
08028 Barcelona ES;
HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA (33.3%) y
INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES
AUGUST PI I SUNYER (IDIBAPS) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**DÍAZ RICART, M. Isabel;
PINO FERRER, Marcos;
ESCOLAR ALBALADEJO, Ginés y
GOMIS DE BARBERÀ, Ramon**

74 Agente/Representante:

SEGURA CAMARA, Pascual

54 Título: **SALES DE TUNGSTATO COMO AGENTES ANTIPLAQUETARIOS**

57 Resumen:

Sales de tungstato como agentes antiplaquetarios.
Las sales de tungstato con cationes farmacéuticamente aceptables o sus solvatos son útiles para reducir la reactividad de las plaquetas en un sujeto y se pueden utilizar para tratar a sujetos que padecen una condición o enfermedad vascular asociada a plaquetas.

ES 2 478 696 A1

DESCRIPCIÓN

Sales de tungstato como agentes antiplaquetarios.

- 5 La invención se refiere a sales de tungstato que muestran un efecto antiplaquetario, en particular, a su uso para reducir la reactividad de las plaquetas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 La aterotrombosis continúa siendo la mayor causa de morbilidad y mortalidad en la sociedad occidental. Las plaquetas juegan un papel clave en la hemostasia, pero también son responsables de la formación patológica de trombos subyacente en las manifestaciones clínicas de la enfermedad vascular aterotrombótica aguda (infarto de miocardio, accidente cerebro vascular y muerte vascular). Por ello, la reducción de la
- 15 tendencia protrombótica relacionada con una respuesta excesiva de las plaquetas a superficies vasculares dañadas es uno de los objetivos principales en el desarrollo de estrategias farmacológicas para prevenir el desarrollo de accidentes cardiovasculares. La activación de las plaquetas tiene lugar a través de múltiples vías y los agentes antiplaquetarios actuales no interfieren en todas ellas.

20

- En pacientes que padecen síndromes coronarios agudos o expuestos a una intervención coronaria percutánea, se administran tratamiento antiplaquetarios orales de forma rutinaria con el fin de inhibir la formación de trombos plaquetarios y la subsiguiente oclusión abrupta de vasos sanguíneos. Hasta ahora, la mayor parte de
- 25 fármacos desarrollados como agentes antiplaquetarios basan su efecto en la inhibición de los receptores de la membrana plaquetaria así como de las vías metabólicas intraplaquetarias, teniendo un gran impacto en la función de dichas células. Aunque muchos de ellos han mostrado tener eficacia clínica reduciendo la morbilidad y la mortalidad de pacientes con enfermedad aterotrombótica, estos agentes se asocian a
- 30 un riesgo residual de sucesos trombóticos o, por el contrario, de hemorragia y una elevada variabilidad en la respuesta de los pacientes. Las complicaciones trombóticas atribuibles a las plaquetas requieren casi invariablemente de una formación previa de un trombo mural. El trombo mismo, o porciones embolizadas, pueden ser los responsables de posteriores complicaciones isquémicas.

35

La inhibición de la agregación plaquetaria se puede lograr mediante el bloqueo de receptores de membrana o por interferencia de las vías intracelulares. La inhibición del metabolismo del ácido araquidónico mediante aspirina y el bloqueo de receptores de ADP por tienopiridinas, tales como el clopidogrel (comercializado con el nombre de Plavix y descrito en EP 281459-A) son las estrategias antiplaquetarias utilizadas con más frecuencia en la actualidad.

La variabilidad individual de la respuesta a la aspirina y especialmente al clopidogrel hacen difícil encontrar un balance adecuado entre el riesgo de trombosis y hemorragia asociados al tratamiento con estos compuestos.

De hecho, el tratamiento estándar actual en la prevención de la trombosis tras intervención coronaria percutánea (*percutaneous coronary intervention*, ICP) en pacientes con síndrome coronario agudo (*acute coronary syndrome*, SCA) consiste en una terapia dual antiplaquetaria con aspirina y la tienopiridina clopidogrel. Sin embargo, la elevada reactividad plaquetaria y los polimorfismos genéticos afectan a la respuesta del paciente al tratamiento antiplaquetario.

Aunque los nuevos compuestos de tienopiridinas desarrollados, tales como prasugrel (descrito en JP06041139-A), han demostrado ser efectivos como agentes antiplaquetarios para los pacientes con SCA tras ICP, muestran un elevado riesgo de hemorragia asociado y un elevado coste de adquisición comparados con clopidogrel.

A pesar de todos los esfuerzos realizados en investigación en el pasado, la disponibilidad de agentes antiplaquetarios orales está lejos de ser satisfactoria. Por ello, la investigación en busca de nuevos agentes con menor variabilidad en la actividad antiplaquetaria y con un menor riesgo de hemorragia asociado continúa activa.

30 EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han encontrado que la presencia de una sal de tungstato con un catión farmacéuticamente aceptable, en particular la sal sódica de tungstato (Na_2WO_4), en la sangre reduce la reactividad plaquetaria por inhibición de las propiedades adhesiva y cohesiva bajo condiciones de flujo. Así, se ha encontrado que el tungstato sódico

regula aspectos parciales de la función plaquetaria y, por tanto, conduce a un efecto inhibitorio de la función plaquetaria más moderado y manejable. La principal preocupación cuando se utilizan terapias antiplaquetarias consiste en encontrar las condiciones apropiadas para inhibir la reactividad plaquetaria sin causar complicaciones hemorrágicas. Los estudios *in vivo* e *in vitro* incluidos en los Ejemplos demuestran que el tungstato sódico inhibe significativamente la interacción plaquetaria sobre superficies subendoteliales bajo condiciones de flujo, disminuyendo tanto la propiedad adhesiva como la cohesiva de las plaquetas sin interferir en las propiedades tromboelastométricas del coágulo sanguíneo.

10

En los estudios de adhesión en superficies vasculares bajo condiciones de flujo, el tungstato sódico muestra un efecto moderado y consistente en las propiedades adhesiva y cohesiva de las plaquetas. Este comportamiento es más similar al observado con los inhibidores del receptor para el ADP que al de la aspirina, ya que la inhibición del metabolismo del ácido araquidónico resulta en una disminución significativa de la formación del trombo mientras que la interacción individual de las plaquetas con el subendotelio dañado tiende a aumentar. En contraste con el tratamiento con clopidogrel, el efecto del tungstato sobre las propiedades hemostáticas de las plaquetas fue detectado en el sistema PFA-100 utilizando cartuchos de Col/Epi de manera similar al tratamiento con aspirina. El efecto del tungstato sobre la hemostasia está dirigido a la función plaquetaria ya que no se ha detectado ninguna acción sobre la coagulación. En los estudios *in vivo* con ratones (antes y después de iniciar el tratamiento con tungstato) se observaron tiempos de oclusión prolongados cuando se utilizaron los cartuchos Col/ADP en el grupo tratado. No se detectaron diferencias cuando se utilizaron cartuchos Col/Epi, probablemente debido al hecho de que los tiempos de cierre en el grupo no tratado ya eran muy prolongados. En ausencia de PTP1B, el tiempo de cierre fue aumentado significativamente, tal y como ocurría en muestras de sangre procedente de animales control con tratamiento de tungstato sódico. PTP1B es una fosfatasa fosfotirosina importante en la función plaquetaria, involucrada en la formación del trombo tras el daño en un vaso. De hecho, el tratamiento con tungstato sódico del ratón knockout para PTP1B no modifica esta respuesta.

20
25
30

Considerando que la carga socioeconómica de la aterotrombosis está creciendo en nuestra sociedad y que los actuales tratamientos antiplaquetarios están asociados con

35

riesgo trombótico y/o hemorrágico, el tungstato sódico ofrece una interesante estrategia antiplaquetaria.

El tungstato sódico es un compuesto con un perfil fármaco-toxicológico razonablemente delimitado que ha superado tres estudios diferentes de fase clínica I. Ha demostrado ser efectivo en la normalización de los niveles de glucosa así como en la disminución de la ganancia de peso corporal y adiposidad. EP1400246-A describe una composición farmacéutica de un compuesto de tungsteno (VI) para la disminución de la glicemia en humanos afectados de diabetes tipo 1 (*Insulin dependent diabetes mellitus*, IDDM) o tipo 2 (*Non-insulin dependent diabetes mellitus*, NIDDM). EP 755681-A muestra que los compuestos de tungsteno (VI) son también eficaces para el tratamiento de la obesidad/sobrepeso en humanos no diabéticos. El tungstato sódico también ha sido propuesto para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o la esquizofrenia (cf. WO2007014970-A). Sin embargo, el efecto del tungstato sódico sobre la modulación de las funciones adhesiva y cohesiva de las plaquetas no ha sido descrito previamente.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención está relacionado con el uso de una sal de tungstato farmacéuticamente aceptable o de un solvato de la misma, para la preparación de un medicamento para reducir la reactividad de las plaquetas en un sujeto.

La expresión "sal de tungstato farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de tungstato con un catión farmacéuticamente aceptable. Ambos términos se han utilizado indistintamente. La sal de tungstato está formada por tungsteno (VI) y una parte catiónica farmacéuticamente aceptable.

Este aspecto de la invención puede ser también formulado como una sal de tungstato farmacéuticamente aceptable o un solvato de la misma para uso para reducir la reactividad de las plaquetas en un sujeto.

La invención también se refiere a un método para disminuir la reactividad de las plaquetas en un sujeto, que comprende la administración a este sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una sal de tungstato farmacéuticamente aceptable o de un solvato de la misma, junto con excipientes o vehículos

farmacéuticamente aceptables.

Por “reactividad de las plaquetas” se entiende la activación plaquetaria en respuesta a un estímulo químico y/o herida. La agregación plaquetaria es la medida más común
5 de reactividad plaquetaria. Así, el término reactividad plaquetaria mayoritariamente se refiere a la agregación plaquetaria en respuesta a activadores plaquetarios, por ejemplo, trombina o colágeno.

La reducción de la reactividad de las plaquetas (exceso de reactividad) se refiere a la
10 disminución de la capacidad hemostática de las plaquetas en un sujeto, que es la capacidad que tiene un organismo de hacer que la sangre en estado líquido permanezca en los vasos sanguíneos. La hemostasia permite que la sangre circule libremente por los vasos y cuando una de estas estructuras se ve dañada, permite la formación de agrupaciones plaquetarias para detener la hemorragia, posteriormente
15 reparar el daño y finalmente disolver el tapón hemostático. En el caso particular de las sales de tungstato de la presente invención, la reducción de la reactividad plaquetaria se produce por inhibición de las propiedades adhesiva y cohesiva de las plaquetas bajo condiciones de flujo.

20 La expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” tal y como se utiliza aquí, se refiere a la cantidad de un compuesto que, al ser administrado, es suficiente para prevenir el desarrollo, o mejorar en algún grado, uno o más de los síntomas de la enfermedad a la que se dirige. La dosis particular del compuesto administrada de acuerdo con esta invención será por supuesto determinada por las circunstancias particulares que
25 rodeen al caso, incluyendo el compuesto administrado, la vía de administración, la condición particular a tratar y otras consideraciones similares.

La expresión “excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables” se refiere a materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables. Cada
30 componente debe ser aceptable farmacéuticamente en el sentido de ser compatible con otros ingredientes de la composición farmacéutica. Asimismo debe ser apropiado para su uso en contacto con tejido u órganos humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogeneidad u otros problemas o complicaciones conmensurado con una relación beneficio/riesgo razonable.

35

Preferiblemente, el sujeto a tratar es un mamífero. Más preferiblemente, el mamífero es un humano.

5 En una realización preferida, el sujeto a tratar padece o es susceptible de padecer una enfermedad vascular asociada a plaquetas. En otra realización más preferida, la enfermedad vascular asociada a plaquetas del sujeto es una aterotrombosis. En otra realización aún más preferida, la enfermedad vascular asociada a plaquetas es una complicación de aterotrombosis asociada a plaquetas seleccionada del grupo que consiste en ictus, arteriosclerosis cerebral, infarto de miocardio, angina de pecho,
10 arritmias cardíacas, disfunción arterial periférica y enfermedad de Burger.

En otra realización preferida, la sal de tungstato está seleccionada del grupo que consiste en una sal de metal alcalino y una sal de metal alcalinotérreo. En otra realización más preferida, la sal de tungstato está seleccionada del grupo que consiste
15 en sal de tungstato de sodio, potasio, magnesio y calcio.

Las sales de tungstato de la presente invención pueden estar en forma de cristalina, tanto en forma de compuestos libres de solvatación como de solvatos (por ejemplo hidratos) y se pretende que ambas formas estén dentro del ámbito de la presente
20 invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos en el estado de la técnica.

La sal más preferida es el tungstato sódico (Na_2WO_4) y su dihidrato. Este último está disponible comercialmente. El tungstato sódico dihidratado es una sal blanca, inodora
25 con una textura fina y cristalina, y de fácil disolución en agua.

El uso de una sal de tungstato farmacéuticamente aceptable o un solvato de la misma para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad vascular asociada a plaquetas se considera también parte de la invención.
30 Este aspecto puede ser formulado como una sal de tungstato farmacéuticamente aceptable o de un solvato de la misma para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad vascular asociada a plaquetas. La invención también hace referencia a un método para la prevención y/o tratamiento de una condición o enfermedad vascular asociada a plaquetas que comprende la administración a un sujeto que
35 padece o es susceptible de padecer esta condición o enfermedad, de una cantidad

terapéuticamente efectiva de una sal de tungstato farmacéuticamente aceptable o de un solvato de la misma tal y como se define anteriormente, junto con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables. La enfermedad vascular asociada a plaquetas puede ser ictus, arteriosclerosis cerebral, infarto de miocardio, angina de pecho, arritmias cardíacas, disfunción arterial periférica o la enfermedad de Burger.

En una realización particular de los aspectos previos de la invención, la sal de tungstato farmacéuticamente aceptable o de un solvato de la misma está en forma de composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la sal de tungstato farmacéuticamente aceptable o de un solvato de la misma, en combinación con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

La sal de tungstato farmacéuticamente aceptable o un solvato de la misma se puede administrar mediante cualquier sistema de administración oral convencional, siendo el formato de comprimido el preferido. Este sistema ha sido utilizado en humanos participantes en ensayos clínicos de Fase I de este compuesto para el tratamiento de la obesidad en humanos no diabéticos (EP 755681-A).

Las composiciones tópicas de la presente invención pueden ser preparadas de acuerdo con métodos bien establecidos. Los excipientes y/o portadores adecuados, y sus cantidades, pueden ser fácilmente determinados por los expertos en la técnica según el tipo de fórmula a preparar.

Al menos que se indique lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en este documento, tienen el significado comúnmente entendido por el experto medio de la técnica al cual la invención pertenece.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra "comprende" incluye el caso "consiste en". Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- FIG 1 es un diagrama de barras que muestra el efecto del tungstato sódico sobre los tiempos de oclusión mediante el dispositivo PFA-100 utilizando cartuchos de colágeno/epinefrina (Col/Epi) y colágeno/ADP (Col/ADP). El tungstato sódico prolonga el tiempo de oclusión en los cartuchos Col/Epi. Los datos se expresan como mean±SEM, n=10, *p<0,05.
- FIG 2 muestra imágenes de microscopía óptica que ilustran el efecto del tungstato sódico sobre la adhesión plaquetaria sobre superficies subendoteliales. El diagrama de barras muestra que en presencia de tungstato sódico tanto la superficie cubierta por plaquetas ("*surface coverage*", %) como la formación de trombos ("*thrombus formation*", %) disminuyeron significativamente (p<0,005).
- FIG 3 muestra el efecto del tratamiento con tungstato sódico durante 1 semana sobre la función plaquetaria en ratones. Se evaluaron los tiempos de oclusión en el PFA-100 utilizando muestras de sangre citrada. Tras el tratamiento oral con tungstato sódico, los tiempos de oclusión se prolongaron al analizar la capacidad hemostática de animales control (WT) en cartuchos Col/ADP (A), permaneciendo invariable al utilizar cartuchos Col/Epi (B). No se observaron cambios en animales knock-out (KO).
- FIG 4 muestra el efecto del tratamiento con tungstato sódico durante 1 semana de animales control (WT) y knock-out (KO) sobre diferentes parámetros medidos en un viscosímetro. El tratamiento con tungstato sódico de animales WT resultó en un aumento de la superficie cubierta y del número de agrupaciones plaquetarias, aunque disminuyó el tamaño de los trombos. La disminución en el tamaño de los trombos también se observó en los animales KO.
- FIG 5 muestra el efecto del tungstato sódico sobre la adhesión plaquetaria sobre una superficie de colágeno en condiciones de flujo. Los experimentos se realizaron con sangre de animales control o knock-out, tratados y no tratados con tungstato. En presencia de tungstato sódico, la superficie cubierta por plaquetas ("*surface coverage*", %) disminuyó significativamente cuando se utilizó sangre de animales WT (p<0,05). Resultados similares fueron obtenidos en sangre de animales KO no tratados, aunque

el tungstato sódico no modificó la superficie cubierta por plaquetas al utilizar sangre de estos animales KO.

EJEMPLOS

5

Se incubaron alícuotas de sangre total humana y plasma rico en plaquetas (PRP) se incubaron con tungstato sódico 200 μ M, durante 1 hora a 37°C, para evaluar su efecto sobre la función plaquetaria, utilizando i) agregometría, con PRP, ii) el analizador de función plaquetaria (PFA-100), iii) cámara de perfusión anular, y iv) tromboelastometría, para determinar su potencial efecto en la coagulación sanguínea. Además, se obtuvieron muestras de sangre de ratones control y knockout para la fosfatasa fosfotirosina -1B (PTP-1B), en antecedente genético mezclado de C57BL/6Jx129/svJ. Estos animales se trataron o no, durante 1 semana con Na₂WO₄ a una concentración de 2 g/l en agua de bebida, para estudiar la función plaquetaria mediante PFA-100 y un viscosímetro (“*cone-plate analyzer*”, CPA).

15

Diseño experimental

Se diseñaron estudios para evaluar el efecto del tungstato sódico (Na₂WO₄ x 2H₂O) sobre la función plaquetaria *in vitro*. Alícuotas de sangre total o plasma rico en plaquetas (PRP) se incubaron con tungstato sódico 200 μ M durante 1 hora a 37°C, para evaluar su efecto en la función plaquetaria, utilizando i) agregometría, con PRP, ii) analizador de función plaquetaria (PFA-100), iii) cámara de perfusión anular, y iv) tromboelastometría, para determinar su potencial efecto en la coagulación sanguínea.

25

Se realizaron estudios adicionales con muestras de sangre de ratones control y knockout para la fosfatasa fosfotirosina -1B (PTP-1B), en un antecedente genético mezclado de C57BL/6Jx129/svJ. Estos animales se trataron durante 1 semana con Na₂WO₄ a una concentración de 2 g/l en agua de bebida, para estudiar la función plaquetaria. Dado el bajo volumen de sangre que puede ser obtenido de los ratones, los experimentos se realizaron mediante el sistema PFA-100, que requiere menores volúmenes.

35

Recolección de sangre

La sangre se extrajo a voluntarios sanos que no habían ingerido ningún fármaco que pudiera afectar la función plaquetaria durante los 10 días previos. Se obtuvo el
5 consentimiento informado de todos los pacientes o voluntarios. La sangre se anticoaguló con citrato trisódico 110mM 1:10 (vol/vol).

Estudios de agregación usando técnicas turbidimétricas

10 El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo por centrifugación de sangre total (120g, 15min). Las alícuotas de PRP se incubaron con tungstato sódico mediante agitación suave en un agregómetro convencional (Aggrecorder PA 3210 aggregometer Menarini Diagnostic, Firenze). Tras 1 hora de incubación, las plaquetas se activaron con ácido araquidónico (AA, 1,6mM), ADP (4 y 2 μ M), colágeno (Col, 5 μ g/ml) y ristocetina (R,
15 1mg/ml), durante 10min y 37°C bajo agitación. Se registraron los cambios en el perfil turbidimétrico y se expresó el resultado de estos cambios como % de la agregación máxima.

Capacidad hemostática mediante el analizador de función plaquetaria (Platelet
20 Function Analyzer, PFA-100)

La función plaquetaria se analizó también mediante el sistema PFA-100. Básicamente, el sistema monitoriza la interacción de las plaquetas con membranas recubiertas de colágeno/ADP (COL/ADP) o colágeno-epinefrina (COL-Epi). Muestras
25 de sangre citrada se aspiraron mediante condiciones de flujo controladas por una apertura de 150 μ m en la membrana. La capacidad hemostática de las plaquetas ("*platelet hemostatic capacity*", PHC) de las muestras de sangre se indica como el tiempo requerido para que las plaquetas tapen y ocluyan la apertura (tiempo de oclusión, expresado en segundos).

30

Experimentos en sistemas de perfusión anular

Los estudios de adhesión bajo condiciones reológicas se realizaron utilizando cámaras de perfusión anular. Segmentos de aorta de conejo New Zealand desendotelizados
35 enzimáticamente se colocaron de forma invertida, exponiendo la superficie dañada, en

el eje central de la cámara de perfusión. Se recircularon 20 ml de muestra de sangre anticoagulada con citrato, durante 10min por la cámara de perfusión con índices de cizalladura de 800s⁻¹ y 1200s⁻¹ ajustados mediante una bomba peristáltica (Renal systems, Minneapolis, MN). Las superficies profundidas se lavaron con PBS 0,15 M y se fijaron con glutaraldehído al 2,5% (en PBS 0,15M) a 4°C durante 24 horas. Las superficies fijadas de deshidrataron en un gradiente de etanol creciente, se incluyeron en el compuesto plástico JB-4, se realizaron cortes finos para microscopia óptica y posteriormente se tiñeron con azul de metileno. Las interacciones plaquetarias se evaluaron al microscopio óptico y mediante un software que clasifica y cuantifica automáticamente la superficie cubierta por plaquetas. Las interacciones plaquetarias se expresaron globalmente como el porcentaje o el área media (µm²) de la superficie cubierta por plaquetas (surface covered, SC). Además, el software utilizado nos permitió clasificar las interacciones plaquetarias en contacto (C), adhesión (A) y trombos (T). De hecho, %SC = %C + %A + %T.

15

Estudios de tromboelastometría

El potencial efecto del tungstato en la tromboelastografía dinámica que mide parámetros de la coagulación de sangre total se estudió mediante el sistema ROTEM Thromboelastometry Analyser (Pentapharm GmbH, Munich, Germany). La técnica se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Nos centramos en el análisis de los tests exTEM, inTEM y fibTEM. Brevemente, exTEM usa factor tisular como activador y es sensible a la medida de cambios en la vía extrínseca de coagulación, polimerización de fibrina y fibrinógeno y función plaquetaria. En el test fibTEM la función plaquetaria se elimina por el inhibidor de plaquetas citocalasina D. Mientras que los coágulos obtenidos en exTEM están compuestos de plaquetas y fibrina, los coágulos obtenidos en el ensayo fibTEM son fundamentalmente coágulos de fibrina. El test inTEM contiene ácido elágico para medir los cambios en la vía intrínseca de coagulación.

30

Se evaluaron parámetros estándar como tiempo de coagulación (“clotting time”, CT), tiempo de formación del coágulo (“clot formation time”, CFT), amplitud del coágulo tras 10min (“clotting amplitude after 10 min”, A10), velocidad máxima (MaxV), y tiempo de velocidad máxima de formación del coágulo (MaxV-t). CT y CFT indican la dinámica de la formación del coágulo. La amplitud del coágulo da información sobre la resistencia y

35

estabilidad del coágulo, la cual depende principalmente del fibrinógeno y las plaquetas, y MaxV y MaxV-t expresan la velocidad de formación del coágulo.

Estudios en ratones

5

Ratones macho C57BL6/SV129 se estabularon bajo condiciones estándar de luz (ciclos de 12 h luz/oscuridad) y temperatura (21°C). Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta de pienso estándar (tipo A04 de Panlab, Barcelona, España), y recibieron tungstato en el agua de bebida a una concentración de 2 g/l, durante una
10 semana. Los estudios recibieron la aprobación del Comité Ético de la Universidad de Barcelona, cumpliendo con la legislación vigente española.

Los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina-xilacina, y se les practicó una punción cardíaca para obtener aproximadamente 800µl de sangre,
15 anticoagulada con citrato 110 mM trisódico 1:10 (vol/vol).

Resultados

Efecto del tungstato sódico en la agregación plaquetaria mediante técnicas
20 turbidimétricas

Se activaron muestras de PRP antes y después de ser incubadas con tungstato sódico durante 1 hora, con AA, ADP 4, ADP 2, Col, y R durante 5 minutos. Los resultados expresados como % de agregación máxima (Mean±SEM, n=10) fueron
25 respectivamente 82.5±3.3%, 86,4±3,6%, 78,0±8,1%, 91,5±2,8%, and 71,1±6,8% respectivamente. En presencia de tungstato sódico, el % máximo de agregación fue de 81.2±7,0%, 82,8±5,4%, 54,3±9,0%, 84,7±6,4%, y 72,7±6,2% respectivamente. Aunque los resultados no son diferentes significativamente, se detectó una disminución de la respuesta de agregación a ADP en la mínima concentración ensayada (54,3±9,0% vs.
30 78,0±8,1%, p=0,06).

Efecto del tungstato sódico en la función plaquetaria mediante el sistema PFA-100

La función plaquetaria se midió en muestras de sangre antes y después de incubación
35 con tungstato sódico mediante el sistema PFA-100 (n=7). Los tiempos de oclusión en

ausencia de tungstato fueron de $141 \pm 6,6$ y $102 \pm 5,3$ sec utilizando cartuchos Col/Epi y Col/ADP respectivamente. En presencia de tungstato, el tiempo de oclusión fue significativamente prolongado sólo en los cartuchos Col/Epi, hasta $193 \pm 23,29$ sec ($p < 0,05$), y permaneció en el rango control en el cartucho Col/ADP ($100 \pm 6,2$ sec) (ver FIG 1).

Efecto del tungstato sódico sobre la interacción plaquetaria con superficies subendoteliales bajo condiciones de flujo

Para determinar el efecto del tungstato sódico en la interacción plaquetaria con superficies subendoteliales, se llevaron a cabo ensayos de perfusión de sangre sobre segmentos vasculares dañados utilizando índices de cizalladura moderados. La interacción plaquetaria se evaluó morfométricamente utilizando un sistema computerizado. La perfusión de sangre total citrada en ausencia de tungstato sódico dio como resultado la formación de trombos plaquetarios. El estudio morfométrico de las superficies perfundidas a $800s^{-1}$ mostró que el %CS en las muestras control tras 10min de perfusión era de $32,9 \pm 1,4\%$ (Mean \pm SEM, $n=5$). En las muestras tratadas con tungstato sódico, el %CS se redujo de manera significativa a $17,9 \pm 3,2\%$ ($p < 0,005$). Los agregados de más de $5 \mu m$ (%T) cubrían el $62,9 \pm \%$ de la CS en ausencia de tungstato, mientras que las superficies perfundidas con muestras de sangre preincubadas con este compuesto mostraban una disminución significativa en el porcentaje de los trombos mayores hasta $31,6 \pm 5,0$ ($p < 0,002$). Se obtuvieron resultados similares aplicando un índice de cizalladura de $1200s^{-1}$ (%CS y %T de $18,5 \pm 2,9$ y $33 \pm 4,3$, respectivamente, en presencia de tungstato sódico) (ver FIG 2).

Efecto del tungstato sódico en las propiedades tromboelastrométricas del coágulo sanguíneo

En presencia de tungstato sódico, no se observaron diferencias significativas en los parámetros medidos en los tres tests aplicados. El efecto del tungstato sobre las propiedades viscoelásticas de los coágulos se resume en la Tabla 1.

Tabla 1:

Los datos están expresados como media \pm S.E.M (n=4). El tungstato sódico no mostró ningún efecto sobre las propiedades tromboelastométricas del coágulo sanguíneo.

5

Efecto del tungstato sódico en la función plaquetaria del ratón

		CT (s)	CFT (s)	A10 (mm)	MaxV (mm/min)	MaxV-t (s)
ExTEM	Control	55.5 \pm 10.5	95.5 \pm 10.5	53.0 \pm 2.0	13.5 \pm 1.5	113.5 \pm 4.0
	Tungstato	60.5 \pm 5.0	84.5 \pm 3.5	54 \pm 1.0	15.5 \pm 0.5	115.0 \pm 18.0
In TEM	Control	168.0 \pm 23.0	79.0 \pm 11.0	52.0 \pm 3.0	16.0 \pm 2.0	189.0 \pm 29.0
	Tungstato	166.0 \pm 15.0	75.0 \pm 2.0	54.5 \pm 1.5	17.0 \pm 0.0	191.5 \pm 29.0
Fib TEM	Control	54.5 \pm 6.5	N.A	11.0 \pm 1.0	10.5 \pm 2.5	58.0 \pm 6.0
	Tungstato	56.5 \pm 0.5	N.A	12.0 \pm 0.0	12.5 \pm 1.5	58.5 \pm 0.5

Se midió la función plaquetaria en muestras de sangre de n=8 ratones control, antes y tras tratamiento con tungstato sódico, mediante el PFA-100 (ver FIG 3). Los tiempos de oclusión en ausencia de tungstato sódico fueron de 148 \pm 17,4 y 211 \pm 18 s al utilizar cartuchos Col/ADP y Col/Epi, respectivamente. En presencia de tungstato sódico, los tiempos de oclusión fueron significativamente prolongados sólo en el cartucho Col/ADP, hasta 272,8 \pm 12,4 s (p<0,01), y permanecieron similares a los obtenidos en ausencia de tungstato sódico en el cartucho Col/Epi (227 \pm 10 s).

15

La función plaquetaria se midió en muestras de sangre de n=8 ratones knockout para PTP1B, tras tratamiento con tungstato sódico, mediante el PFA-100. Los tiempos de oclusión en ausencia de tungstato sódico fueron de 292,9 \pm 4,5 y 256 \pm 10 s al utilizar cartuchos Col/ADP y Col/Epi, respectivamente. En presencia de tungstato sódico, los tiempos de oclusión no fueron significativamente diferentes, ni en el cartucho Col/ADP (258,6 \pm 13,3 s) ni en el cartucho Col/Epi (196,6 \pm 61 s).

20

También se evaluó el efecto del tungstato sódico en la interacción plaquetaria con el viscosímetro Cone Plate Analyzer (ver FIG 4). La adhesión plaquetaria a una superficie plástica se midió utilizando muestras de sangre de n=8 ratones control, antes y después de tratamiento con tungstato sódico. La superficie cubierta por plaquetas (*“surface covered by platelets”, SC*), el tamaño medio de los agregados (*“average size”, AS*), y el número de objetos adheridos (*“objects”, OB*) en ausencia de tungstato sódico fue de $1,40 \pm 0,39$; $32,9 \pm 1,82$ y $47,96 \pm 11,75$ respectivamente. Tras el tratamiento con tungstato sódico, tanto SC como OB aumentaron significativamente hasta $4,48 \pm 1,37$ y $783,1 \pm 229,39$ respectivamente ($p < 0,05$); AS disminuyó a $22,2 \pm 0,79$.

Los mismos parámetros se midieron utilizando muestras de sangre de n=8 ratones knockout para PTP1B antes y después de tratamiento con tungstato sódico. No se observaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros en sangre de ratones KO en respuesta al tratamiento con tungstato sódico. La superficie cubierta por plaquetas (SC), el tamaño medio de los agregados (AS), y el número de objetos adheridos (OB) en ausencia de tungstato sódico fueron de $1,75 \pm 0,79$; $32,1 \pm 2,8$ y $100,1 \pm 25,28$, respectivamente. Tras el tratamiento con tungstato, SC se encontraba disminuida ligeramente pero no de manera significativa hasta $0,64 \pm 0,14$; AS se encontraba disminuida ligeramente pero no de manera significativa hasta $26,13 \pm 02,1$ y OB se encontraban ligeramente aumentados a $146,5 \pm 33,87$.

Además, se analizó el efecto del tungstato sódico en la interacción plaquetaria con una proteína adhesiva de la matriz extracelular, como es el colágeno, bajo condiciones de flujo (ver FIG 5). La perfusión de sangre total citrada en ausencia de tungstato sódico resultó en la formación de trombos plaquetarios. El análisis morfométrico de las superficies profundidas a $1200s^{-1}$ mostró que el %CS en sangre de ratones control tras 5min de perfusión era de $45,49 \pm 13,43\%$ (Mean \pm SEM, n=5). Tras el tratamiento con tungstato sódico, el %CS en muestras de sangre de ratones control se redujo a $30,71 \pm 1,26\%$, aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa.

Al realizar estos experimentos en sangre de ratones knockout, el %CS fue de $13,86 \pm 0,35$ y $16,23 \pm 0,74$, sin y con tratamiento con tungstato respectivamente. El tratamiento con tungstato en el ratón knockout no modificó la interacción de las plaquetas con el colágeno.

En resumen, en presencia de Na_2WO_4 ni la respuesta de agregación máxima ni las propiedades tromboelastográficas del coágulo sanguíneo estaban afectadas. Sin embargo, el tiempo de oclusión medido con el PFA-100 estaba significativamente
5 prolongado en el cartucho Col/Epi y permanecía en el rango control en el cartucho Col/ADP. En los estudios de adhesión sobre segmentos vasculares desendotelizados bajo condiciones de flujo, la superficie cubierta por plaquetas y la formación de trombos disminuyó en presencia de Na_2WO_4 . En estudios con ratones, el tratamiento con Na_2WO_4 prolongó los tiempos de oclusión medidos con el sistema PFA-100
10 utilizando el cartucho Col/ADP. Además, la presencia de Na_2WO_4 disminuyó el tamaño de los trombos en estudios de adhesión en condiciones de flujo.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una sal de tungstato con un catión farmacéuticamente aceptable o de un solvato de la misma para la preparación de un medicamento para reducir la reactividad de las plaquetas en un sujeto.
5
2. Uso según la reivindicación 1, donde el sujeto es un mamífero.
3. Uso según la reivindicación 2, donde el mamífero es un humano.
10
4. Uso según las reivindicaciones 1-3, donde la reducción de la reactividad plaquetaria es producida por inhibición de sus propiedades adhesivas y cohesivas.
5. Uso según las reivindicaciones 1-4, donde el sujeto padece o es susceptible de padecer una condición o enfermedad vascular asociada a plaquetas.
15
6. Uso según la reivindicación 5, donde la condición o enfermedad vascular asociada a plaquetas es aterotrombosis.
7. Uso según la reivindicación 6, donde la enfermedad vascular asociada a plaquetas es una complicación de la aterotrombosis asociada a plaquetas y se selecciona del grupo que consiste en: ictus, arteriosclerosis cerebral, infarto de miocardio, angina de pecho, arritmias cardíacas, disfunción arterial periférica y enfermedad de Burger.
20
8. Uso según las reivindicaciones 1-7, donde la sal de tungstato se selecciona del grupo que consiste en una sal de metal alcalino y una sal de metal alcalinotérreo.
25
9. Uso según la reivindicación 8, donde la sal de tungstato está seleccionada del grupo que consiste en tungstato de sodio, de potasio, de magnesio y de calcio.
30
10. Uso según la reivindicación 9, donde la sal de tungstato es tungstato sódico o un solvato del mismo.
11. Uso según la reivindicación 10, donde el solvato es un dihidrato.
35

12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde la sal de tungstato o un solvato del mismo está en forma de composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la sal de tungstato con un catión farmacéuticamente aceptable o un solvato de la misma, en combinación con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

13. Uso según la reivindicación 12, donde la composición farmacéutica es para uso oral.

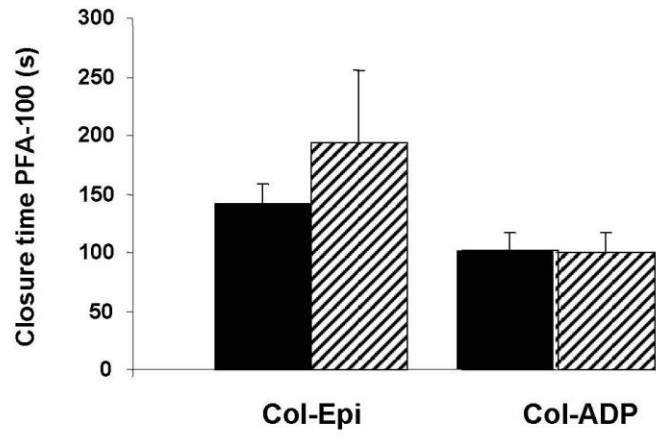


FIG 1

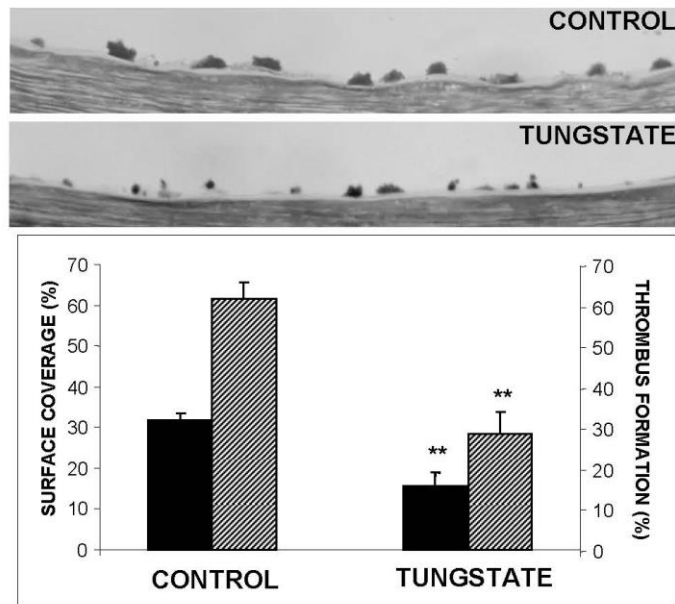


FIG 2

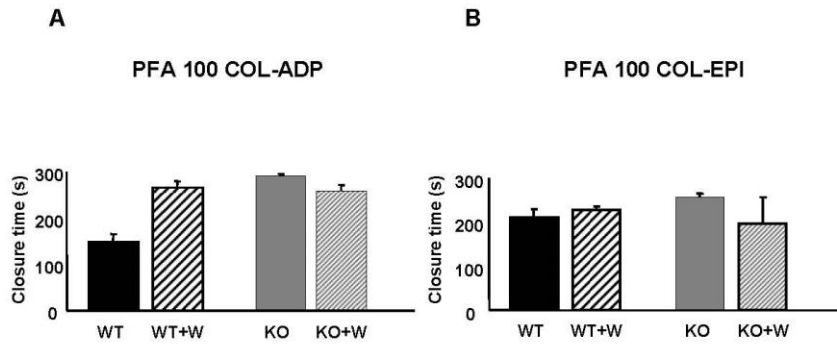


FIG 3

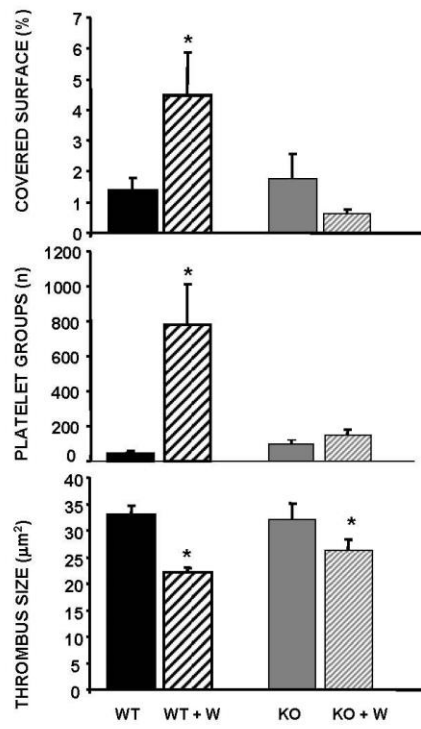


FIG 4

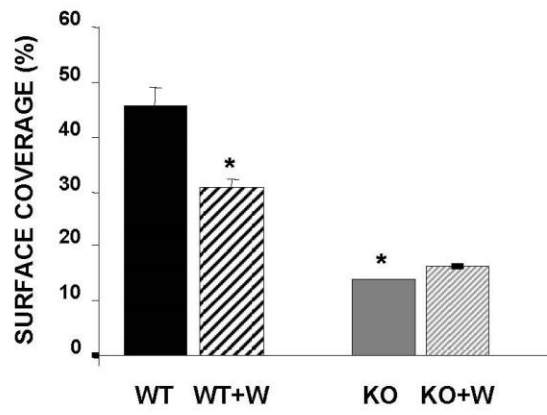


FIG 5