(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 482 105**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/727 (2006.01)
A61K 31/717 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2005** **E 09180857 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014** **EP 2165711**

(54) Título: **Procedimientos 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:
01.08.2014

(73) Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, Illinois 60015-4633 , US y
BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)

(72) Inventor/es:

JOHNSON, KIRK W.

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 482 105 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

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

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.

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.

Por tanto, existe la necesidad de nuevos enfoques terapéuticos 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

La presente invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de los trastornos hemorrágicos usando polisacáridos sulfatados no anticoagulantes (PSNA) como procoagulante. 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 una composición para su uso en el tratamiento de un sujeto que necesita una coagulación de la sangre mejorada que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA) al sujeto, tal como se define en las reivindicaciones o una realización, el PSNA es un fragmento de fucoidán que disminuye el tiempo de coagulación de la sangre cuando se ensaya en ensayos de dPT.

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 quininógeno 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 alfa$_2$-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, 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 trombina; 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. 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 una composición para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto, donde una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA) como se ha definido anteriormente se administra al sujeto. 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, 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 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 un anticuerpo que se una al Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XIII, Factor II, Factor XI, Factor XII, factor de von Willebrands, precalicreína, o quininógeno 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 de los factores seleccionados del grupo que consiste en el 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 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 una composición para uso en el tratamiento de un sujeto que se va a someter a un procedimiento quirúrgico o invasivo en el que sería deseable una coagulación de la sangre mejorada que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA) tal como se define en la reivindicación 1 al sujeto. 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, 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 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.

La invención proporciona una composición para el uso que se ha definido anteriormente que comprende una PSNA, donde el PSNA se selecciona entre el grupo definido en la reivindicación 1. En ciertas realizaciones, la composición

puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. 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, 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, 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 elágico, sulfátidos, y caolín.

En un aspecto de referencia, la presente memoria descriptiva proporciona un procedimiento para medir la aceleración de la coagulación mediante un PSNA en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:

a) combinar la muestra biológica con una composición que comprende el PSNA,
b) la medición del tiempo de coagulación de la muestra biológica,
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.

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 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, factor tisular, tromboplastina, fibrina, TFPI, veneno de víbora de Russell, partículas de sílice micronizada, ácido elágico, 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

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). Una representación gráfica del tiempo de coagulación (segundos) frente a la concentración de TFPI (µg/ml) muestra que el tiempo de coagulación aumenta linealmente con la dosis de TFPI.
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 diferentes 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 mostrados son valores medios procedentes de mediciones realizadas por duplicado.
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 mostrados son valores medios procedentes 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 determinan usando el ensayo dPT. Se muestra un gráfico del tiempo de coagulación (en segundos) frente a la concentración del PSNA (nM). Los puntos de datos mostrados son valores medios procedentes 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 hemofílico 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 determinan usando el ensayo dPT. Se muestra un gráfico del tiempo de coagulación (en segundos) frente a la concentración de PSNA (nM). Los puntos de datos mostrados son valores medios procedentes 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 TPFI 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 de PSNA (nM). Los tiempos de coagulación se determinan usando el ensayo dPT. Los puntos de datos mostrados son valores medios procedentes 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 del PSNA (nM). Los tiempos de coagulación se

determinan usando el ensayo dPT. Los puntos de datos mostrados son valores medios procedentes 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 del tiempo de coagulación (en segundos) frente a la concentración del PSNA (nM). Los puntos de datos mostrados son valores medios procedentes de mediciones realizadas por duplicado.

Descripción detallada de la invención

La puesta en 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.).

1. Definiciones

En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y están concebidos para 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 se pueden purificar y/o modificar a partir de fuentes naturales (por ejemplo, algas marrones, corteza de árbol, tejidos animales) o bien se pueden sintetizar desde el principio y pueden tener pesos moleculares en un intervalo de 100 daltons a 1.000.000 daltons. Los PSNA se pueden utilizar en la invención para mejorar la hemostasia en el tratamiento de los trastornos hemorrágicos, especialmente los asociados con deficiencias de los factores de coagulación para revertir los efectos de los anticoagulantes. La capacidad de los PSNA para estimular la coagulación y reducir el sangrado se determina fácilmente mediante varios ensayos de coagulación in vitro (por ejemplo, los ensayos dPT y aPTT) y en modelos de sangrado in vivo (por ejemplo, corte de la cola, corte transversal, tiempo de coagulación de la sangre completa, o determinación del tiempo de sangrado de las cutículas 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. 65:464-467; 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 de coagulación intrínsecas o extrínsecas, tales como un factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste en factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa, precalicreína, quininógeno de alto peso molecular, factor tisular, factor VI Ia, y factor Va. Otros reactivos que estimulan la coagulación incluyen calicreína, iniciador de APTT (es decir, un reactivo que contiene un fosfolípido y un activador de contacto), veneno de víbora de Russel (tiempo 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 elágico, 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 estar alterados químicamente y pueden tener modificaciones que pueden incluir, pero sin limitarse a estas, 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" incluye además polipéptidos que tienen una o más moléculas análogas de aminoácidos que incluyen pero no se limitan a compuestos que comprenden solamente moléculas de amino y/o imino, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), polipéptidos con uniones sustituidas, así como otras modificaciones conocidas en la materia, tanto de origen natural como de origen no natural (por ejemplo, sintético), moléculas cíclicas o ramificadas, y similares. El término también incluye moléculas que comprenden uno o más restos de glicina N-sustituida (un "peptoide") y otros aminoácidos o péptidos sintéticos. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos con números 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 descripciones 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) basiclisina, arginina, histidina; (3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga - glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, se puede predecir de manera razonable que una sustitución aislada de leucina por isoleucina o valina, de aspartato por glutamato, de treonina por serina, o una sustitución conservativa similar de un aminoácido por otro 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.

"Derivado" está concebido para 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 TPFI. 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., más arriba; DNA Cloning, supra; Nucleic Acid Hybridization, más arriba.

"Recombinante", tal como se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, vírico, semisintético o sintético que, debido a su origen o a una

manipulación, no está asociado con todos o una parte del polinucleótido con el 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 *cordata*, incluyendo sin limitación, seres humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja tales como ganado bobino, ovejas, cerdos, cabras y caballos; animales domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves, incluyendo aves domésticas, salvajes y cinegéticas tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares. El término no denota una edad en particular. Así, está concebido incluir tanto adultos como individuos recién nacidos. La invención descrita en el presente documento está concebida 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.

Tal como se usa en el presente documento, una "muestra biológica" se refiere a una muestra de tejido o fluido aislado de un sujeto, incluyendo pero sin limitación, por ejemplo, sangre, plasma, suero, materia fecal, orina, médula ósea, bilis, fluido cefalorraquídeo, fluido linfático, muestras de piel, secreciones externas de la piel, de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, células sanguíneas, órganos, biopsias y también muestras de componentes de los cultivos in vitro que incluyen pero no se limitan a medio acondicionado resultante del crecimiento de células y tejidos en el 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 tal como se describe en el presente documento, consigue una respuesta terapéutica eficaz, tal como una reducción en la hemorragia o un acortamiento de los tiempos de sangrado.

El término "trastorno hemorrágico" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier trastorno asociado con un sangrado excesivo, tal como un trastorno congénito de la coagulación, un trastorno adquirido de la coagulación, un estado hemorrágico inducido por un traumatismo. Dichos trastornos hemorrágicos incluyen, pero no se limitan a, 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 quininógeno 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 alfa$_2$-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.

II. Modos de realización de la invención

Antes de describir detalladamente la presente invención, se debe entender que la presente invención no está limitada a la formulación o parámetro de procedimiento concretos que, como tales 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 está concebida para que sea limitante.

Aunque en la puesta en 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 estos tratamientos son frecuentemente eficaces, las características que incluyen la utilizad incluyen el elevado coste, la incomodidad (por ejemplo, la administración intravenosa) y la generación de anticuerpo neutralizando (Bishop y col., más arriba; Carcao y col., más arriba; Roberts y col., más arriba; Lee, más arriba; y Bohn y col. (2004) Haemophilia 10 Suppl. 1:2-8). Aunque FVIIa se utiliza cada vez más en diferentes trastornos hemorrágicos (Roberts y col., más arriba), son de interés tratamientos alternativos con procoagulantes en monoterapia desprovistos de las restricciones anteriormente citadas y con amplia aplicación.

Un enfoque general para mejorar la hemostasia en individuos con trastornos hemorrágicos para mejorar el inicio de la coagulación mediante la sobrerregulación de la ruta extrínseca de la coagulación sanguínea. 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 fundamental para el inicio, y contribuye a la propagación de la coagulación in vivo (Mann (2003) Chest 124(3 Supl.):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) Throb. Res. 64:213-222) y que la IgG anti-TFPI mejoraba el tiempo de sangrado de conejos que eran deficientes de factor VIII (Erhardtsen 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 una actividad anticoagulante diferenciada mediada por las interacciones de la antitrombina III y/o el cofactor II de la heparina (Toida y col., más arriba). 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 está basada en el descubrimiento de que determinados polisacáridos sulfatados no anticoagulantes (PSNA) se pueden utilizar como procoagulantes en el tratamiento de pacientes con trastornos hemorrágicos. Los inventores presentes han descubierto un nuevo enfoque 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 subconjunto de PSNA, incluyendo pentosano polisulfato (PPS) y fucoidán, inhiben el inhibido de la ruta del factor tisular (TFPI) y mejoran (es decir, aceleran) el tiempo de coagulación de los plasmas con hemofilia A y hemofilia B o del plasma con niveles reducidos de FVII cuando se ensayan en concentraciones comprendidas en 4-500 nM en los ensayos de protrombina diluida (dPT). Se observó una mejora de la hemostasia in vivo en ratones con hemofilia A o B después de la administración de dosis subcutáneas bajas de PPS o fucoidán, o una combinación de PSNA y suplemento de factor. También se observó mayor supervivencia de los ratones deficientes en factor después de un estímulo de sangrado. Estos resultados indican que la administración sistémica de PSNA seleccionados puede representar un enfoque único para regular la hemostasia en trastornos hemorrágicos.

Así, la invención se refiere al uso de los PSNA para controlar la hemostasia en sujetos con trastornos hemorrágicos, incluyendo los trastornos de coagulación congénitos, los trastornos de coagulación adquiridos y los procesos hemorrágicos inducidos por traumatismos.

C. PSNA

Los PSNA para uso en los procedimientos de la invención son polisacáridos sulfatados que tienen actividad procoagulante tal como se define en la reivindicación 1. 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 se pueden purificar y/o modificar a partir de fuentes naturales (por ejemplo, algas marrones, corteza de árbol, tejidos animales) o bien se pueden sintetizar desde el principio y pueden tener pesos moleculares en un intervalo de 100 daltons a 1.000.000 daltons. Compuestos adicionales con actividad PSNA incluyen heparina oxidada con peryodato (POH) (Neoparin, Inc., San Leandro, CA), laminarina químicamente sulfatada (CSL) (Sigma-Aldrich), ácido algínico químicamente sulfatado (CSAA) (Sigma- Aldrich), pectina químicamente sulfatada (CSP) (Sigma-Aldrich), dextrán sulfato (DXS) (Sigma-Aldrich), oligosacáridos derivados de 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, dichos glicoconjugados sulfatados pueden incluir, sin limitación, mucopolisacáridos sulfatados (restos de D-glucosamina y ácido D- glucourónico) curdlan (carboximetil éter, hidrogenosulfato, curdlan carboximetilado) (Sigina-Aldrirh), esquizofilano sulfatado (Itoh y col. (1990) Int. J. Immunopharmacol. 12:225-223; Hirata y col. (1994) Pharm. Bull. 17:739-741), glicosoaminoglicanos sulfatados, complejos polisacárido-peptidoglicano sulfatado, alquilmaltooligosacárido sulfatado (Katsuraya y col. (1994) Carbohydr Res. 260:51-61), amilopectina sulfato, N-acetil-heparina (NAH) (Sigma- Aldrich), heparina N-acetil-de-O-sulfatada (NA-de-o-SH) (Sigma-Aldrich), de-N-sulfatada-heparina (De-NSH) (Sigma- Aldrich), y De-N-sulfatada-acetilada-heparina (De-NSAH) (Sigma-Aldrich).

La capacidad de los PSNA para estimular la coagulación y reducir el sangrado se determina fácilmente mediante varios ensayos de coagulación in vitro (por ejemplo, los ensayos dPT y aPTT) y en modelos de sangrado in vivo (por ejemplo, corte de la cola, o determinación del tiempo de sangrado de las cutículas 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 elágico, 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 fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen, sin limitación, las bases seleccionadas del grupo que consiste en hidróxido de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formiato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumarato de sodio 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. Por lo general, sin embargo, el excipiente o excipientes estarán presentes en la composición en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 99% en peso, preferiblemente de aproximadamente 5% a aproximadamente 98% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 95% en peso del excipiente, siendo lo más preferido concentraciones inferiores al 30%. 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. Se prefieren particularmente las preparaciones compuestas que incluyen uno o más factores sanguíneos tales como 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. 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 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 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, transmucosal, 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 son también adecuadas para el 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 abarca administrar un conjugado que contiene un PSNA tal como se proporciona en el presente documento a un paciente que padece una dolencia que sea sensible al tratamiento con un PSNA incluido en el conjugado o en la 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 para tratar trastornos hemorrágicos que incluyen, pero no se limitan a, 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 quininógeno 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 alfa$_2$-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.

Los expertos 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.

En general, 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, preferiblemente proporcionado como parte de una preparación farmacéutica) se puede administrar solo o combinado con otros PSNA o agentes terapéutico, tales como agentes hemostásicos, factores sanguíneos, u otros medicamentos utilizados para tratar una dolencia o enfermedad concreta de acuerdo con una variedad de otros calendarios de dosificación dependiendo del criterio del médico especialista, necesidades del paciente, y otros. El calendario de dosificación específico se puede determinar por personas normalmente expertas en la técnica o se puede determinar experimentalmente mediante 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 de, junto con, 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 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, se puede conseguir un tratamiento paralelo administrando 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 hemostásico o un factor de coagulación (por ejemplo FVTII o FIX), que en combinación comprende una dosis terapéuticamente eficaz, de acuerdo con un régimen de dosificación particular. 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 utilizar en los procedimientos de la invención para mejorar la hemostasia en el tratamiento de los trastornos hemorrágicos, especialmente los asociados con deficiencias de los factores de coagulación para revertir los efectos de los anticoagulantes. 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 se pueden tratar con los PSNA incluyen, pero no se limitan a, 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 quininógeno 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 alfa$_2$-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, 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 utilizan para tratar trastornos de la coagulación adquiridos, incluyendo deficiencias en el factor VIII, factor de von Willebrand, factor IX, factor V, factor XI, factor XII y factor XIII, especialmente trastornos ocasionados por inhibidores o autoinmunidad contra los factores de coagulación de la sangre, o trastornos hemostásicos ocasionados por una dolencia o enfermedad que da como resultado una reducción en 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, 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 factor Xa. Además, puede ser necesaria la transfusión de productos de la sangre para remplazar 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 proporciona una composición para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un PSNA al sujeto. 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 un anticuerpo que se una al Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XIII, Factor II, Factor XI, Factor XII, factor de von Willebrands, precalicreína, o quininógeno 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 de otros agentes terapéuticos 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 de los factores seleccionados del grupo que consiste en el 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 factor Xa.

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 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 XI Ia, y VII Ia, 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.

En un aspecto de referencia, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para inhibir la actividad de TFPI que comprende combinar una composición que comprende TFPI con una cantidad suficiente de un PSNA para inhibir la actividad de TFPI. En ciertas realizaciones, la actividad de TFPI se inhibe en un sujeto mediante un procedimiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un PSNA al sujeto. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para inhibir la actividad de TFPI en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento combinar la muestra biológica (por ejemplo, sangre o plasma) con una cantidad suficiente de un PSNA para inhibir la actividad de TFPI.

III. Parte experimental

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 están concebidos para que limiten el ámbito 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

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 del George King Biomedical (Overland Park, KS). Los Factores VIIa y TFPI humano recombinante procedían de American Diagnostica (Stamford, CT) y el Factor VIII fue el ReFacto^R que se receta obtenido 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

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.

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. 1975;9:575-580). $CaCl_2$ 25 mM y cubetas de fibrina (Fisher) se precalentaron a 37°C. Se añadió 0,1 ml de plasma humano (normal o hemofílico) descongelado a los tubos de ensayo calentados. 5 µl de solución salina (por ejemplo Sigma) o 5 ml de agente de ensayo (por ejemplo, PSNA) disuelto en solución salina se incubaron 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 desde los tubos de ensayo a las cubetas de fibrina precalentadas y se incubaron durante 2-3 minutos. 0,1 ml de 25 mM $CaCl_2$ precalentado se añadieron para iniciar la coagulación, y el tiempo de coagulación del plasma se midió con un fibrómetro BBL FIBROSYSTEM.

Ensayo de tiempo de protrombina diluida (dPT)

El ensayo de dPT utilizado fue un ensayo clínico PT de referencia modificado (Nordfang y col. (11991) Thromb Haemost 66:464-467; Welsch y col. (1991) Thrombosis Research 64: 213-222). El reactivo SIMPLASTIN EXCEL (Organon Teknika) se reconstituyó con el diluyente del fabricante y se diluyó adicionalmente a 1:100 en solución salina al 0,9%. El reactivo de tromboplastina, $CaCl_2$ 25 mM, y las muestras de plasma se precalentaron a 37 °C antes de iniciar el ensayo. 100 ml de plasma descongelado se dividió en alícuotas en tubos de microcentrífuga. Para las mediciones de inhibición de la actividad TFPI, 5 µl de suero salino (por ejemplo Sigma) o 5 µl de agente de ensayo (por ejemplo, polisacárido sulfonado) se añadió a 95 µl de plasma y se incubó durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. 100 µl del reactivo de tromboplastina diluido y 100 µl de $CaCl_2$ 25 mM se añadieron a cubetas de fibrina (Fisher) precalentadas a 37 °C. 100 µl de plasma (normal o hemoflílico) que contenía el agente de ensayo o el control de suero salino se añadieron a las cubetas de fibrina que contenían el reactivo de tromboplastina y $GaCl_2$ 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 isofluorano). 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 1,0 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. Los criterios de valoración farmacodinámicos alternativos o adicionales pueden incluir el muestreo de sangre de sujetos tratados con PSNA para análisis directo o aislamiento del plasma, y la medición de los tiempos de coagulación in vivo (por ejemplo, tiempo de coagulación de sangre completa 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 isofluorano. A continuación se extrajo sangre de los ratones (por ejemplo, 150 µl) del plexo retroorbital en tubos de recogida de sangre de plástico). Los tubos se colocaron en un baño de agua a 37 ºC 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).

Análisis estadístico

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

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. Una disolución madre de 100 µg/ml de TFPI (American Diagnostica, Stamford, CT) se diluyó secuencialmente en suero salino para generar disoluciones de TFPI con las siguientes concentraciones: 20, 15, 10, 6, y 2 µg/ml. 5 µl de estas diluciones de TFPI se mezclaron con 95 µl de plasma deficiente en FVIII y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los ensayos de dPT se realizaron como sigue: La tromboplastina SIMPLASTIN se diluyó 1:100 en suero salino y se precalentó a 37 °C. $CaCl_2$ 25 mM y 100 µl de plasma de ensayo que contenía TFPI se precalentaron a 37 ºC. 100 µl de tromboplastina SIMPLASTIN y 100 µl de $CaCl_2$ se mezclaron y el tiempo de coagulación de midió con un fibrómetro BBL FIBROSYSTEM. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

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

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 TFPI de 0,5 µg/ml para los ensayos de la función coagulante del PSNA.

Ejemplo 3

Detección de PSNA

Los compuestos de polisacárido sulfatados, incluyendo heparinas modificadas, pentosano polisulfato y fucoidán se ensayaron para determinar su actividad anticoagulante que se comparó con la de heparina para determinar si se les podía considerar como "no anticoagulantes". Los compuestos ensayados se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

PSNA ensayados con respecto a la actividad anti-coagulante		
PSNA	**Empresa/Nº cat.**	**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

Los compuestos de ensayo se diluyeron a 100 µM, 10 µM, 2 µM y 200 µM. Para cada compuesto de ensayo, se añadieron 12,5 µl de una disolución diluida que contenía el compuesto de ensayo a 237,5 ml de plasma Hem-A y se incubó a temperatura ambiente. Se extrajeron 100 µl de plasma que contenía el compuesto de ensayo para los ensayos de dPT para determinar el 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 sobre 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.							

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

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". Las diluciones de FACT, un plasma humano de referencia "normal" (George King Biomedical), se realizaron en plasma Hem-A humano para generar plasma con concentraciones de plasma normal entre 0,31-100%. A continuación, el ensayo WBCT se realizó como sigue: 100 µl de una mezcla de FACT-plasma Hem-A y 100 µl de reactivo aPTT se mezclaron e incubaron a 37° durante 3 minutos. se añadieron 100 µl de $CaCl_2$, y el tiempo de coagulación del plasma de midió con un fibrómetro BBL FIBROSYSTEM. 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

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 en el tiempo de coagulación del plasma se determinó como sigue: 5 µl de un PSNA se añadieron a 95 µl de un FACT diluido al 1,25% en plasma Hem-A humano y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se realizaron ensayos de aPTT 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

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

Ejemplo 5

Inhibición de la actividad TFPI por PSNA

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

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.			

TFPI a una concentración final de aproximadamente 0,5 µg/ml prolongó el tiempo de coagulación del plasma en aproximadamente 40 segundos desde 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. De manera importante, en concentraciones óptimas de PPS o fucoidán, el tiempo de coagulación fue más corto comparado con los que no tenían TFPI, o niveles de control con vehículo, o ligeramente inferiores, y la amplitud del efecto de neutralización del TFPT se extendió como mínimo a un intervalo de 100 veces (por ejemplo, de 5 a 500 nM).

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.			

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.

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			

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

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, se puede relacionar con la neutralización de la actividad TFPI endógena, que está presente en el plasma humano a aproximadamente 100 ng/ml (Nordfang y col., más arriba) ampliamente asociada con lipoproteína o plaquetas (Broze y col. (1992) Semin. Hematol. 29: 159-169; Broze y col. (2003) J. Thromb. Haemost.1:1671-1675).

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, fucoidán o PPS se valoraron en el plasma Hem-A y se realizaron ensayos de dPT. Además, se analizó la tc dosis respuesta del factor VIIa como control positivo para la activación amplificadora de la ruta extrínseca. Los resultados se muestran en la Figura 7 y 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			

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. 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 FVI Ia.

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 que se muestra en el ensayo dPT imita algunas formas de la deficiencia en 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, + FVIIa 0,1 nM: 173 segundos		

Como se muestra en la Figura 8, la valoración de fucoidán y PPS aceleró la coagulación del plasma deficiente en Factor VII y tal como se observó con el plasma Hem A, el fucoidán fue significativamente más potente y eficaz que el PPS. Una vez de nuevo, la ventana terapéutica era amplia, en el caso del fucoidán, se observó una aceleración sustancial de la coagulación con un intervalo de concentraciones comprendidas de aproximadamente 10 nM a 500 nM.

Ejemplo 7

Mejoría de la hemostasia en ratones tratados con PSNA

Ratones Hem A o Hem B se trataron con PPS y fucoidán para evaluar la mejora potencial de la hemostasia in vivo. Los PSNA se inyectaron por vía subcutánea en dosificación frecuente fueron bien tolerados en ratones hemofílicos, con anterioridad se había establecido la biodisponibilidad de esta ruta para varios polisacáridos sulfatados (MacGregor y col. (1985) Thromb. Haemost. 53:411-414; Millet y col. (1999) Thromb. Haemost. 81:391-395). La semivida de PPS y fucoidán puede ser tan corta como 1-2 horas. Por tanto, se adoptó un régimen de dosificación de dos veces al día. Los estudios iniciales indicaron que las dosis de varios días se preferían con respecto a las de 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, muestreo de sangre para el tiempo de coagulación de sangre completa (WBCT), tiempos de sangrado agudo, y supervivencia a largo plazo después del corte de la cola o incisión transversal (Broze y col. (20 Thromb, Haemost. 85:747-748). Los resultados de los estudios de 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 de los PPS para mejorar la coagulación en ratones Hem-A y Hem-B. A los machos y hembras de ratones Hem-A y Hem-B se les administró PPS a una dosis de 0,02, 0,06 o 0,2 mg/kg o solución salina por vía

subcutánea dos veces al día durante 5 días. En la mañana del quinto día después de la dosis, la cola se pinzó a 1 cm de la punta, y se controlaron la conducta y la supervivencia durante 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)	Control con vehículo	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 0,06 mg/kg	8 9	25 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			

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.

La eficacia de los PPS para mejorar la coagulación en ratones Hem-B se ensayó adicionalmente en ensayos dPT. Se extrajo sangre de todos los ratones antes del estudio para establecer la línea base (preensayo) de los tiempos de coagulación. Los ratones (14 semanas de edad) se trataron por vía subcutánea dos veces al día con PPS durante 4,5 días en las siguientes dosis: 2, 0,3 y 0,06 mg/kg en un volumen de 250 µl. 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 4,5 días (min)**	**Tiempo de coagulación promedio a 4,5 días (min)**
0,06	44 42 26	37
0,3	43 31 39	38
2,0	42 45 44	44
Los Hem-B sin experimentación previa tienen una variación en dPT de 44-50 segundos.		

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 5º 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.

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 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 seccionó transversalmente 2 horas después en la región correspondiente hasta un diámetro de aproximadamente 2,7 mm. En estos estudios con fucoidán, se utilizó la modificación del seccionamiento transversal de la vena de la cola, para evaluar con más precisión 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. Tenga en cuenta que la reconstitución de FVIII al 1% proporciona un -10% de supervivencia mientras que la reconstitución de FVIII 2% proporciona ~100% de supervivencia en estos ratones. * $p < 0.05$ vs. vehículo + p = 0,06 vs. vehículo # p=0,06 vs. fucoidán			

En el primer estudio, el tratamiento de los ratones con fucoidán a una dosis de 0,1 mg/kg pareció ser más eficaz que el tratamiento a una dosis de 1,0 mg/kg (la supervivencia a aproximadamente 10 horas fue de 1,/6 para el vehículo, 4/6 para 1,0 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.

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.

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

Se llevaron a cabo una serie de estudios para ensayar los PANS en relación a la mejora de la coagulación en modelos de hemofilia in vivo y ex 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. La ventaja terapéutica del tratamiento con fucoidán o PPS in vivo fue evidente según los ensayos de sangrado en ratones hemofílicos.

Tanto PPS como fucoidán pueden mostrar actividad anticoagulante a concentraciones más elevadas, posiblemente como resultado de su 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). PPS administrado por vía subcutánea a ratas necesitó dosis >5 mg/kg para prolongar la coagulación (Giedrojc y col., más arriba), y 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 mejoran la hemostasia in vivo fueron inferiores a los que causaban otros efectos notificados (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) Glycobiology13:29R-40R; Granert y col., más arriba; y Sweeney y col. (2002) Blood 99:44-51).

Sin desear quedar vinculado a teoría particular alguna, la inhibición de TFPI debida a los PSNA puede representar una parte de las mejoras observadas en la coagulación ex vivo e in vivo. Se ha demostrado que la neutralización de TFPI por anticuerpos mejora la hemostasia en un modelo de conejo Hem A y que acelera la coagulación del plasma humano hemofílico (Nordfang y col., más arriba; Welsch y col., más arriba; 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. Igualmente, el tratamiento de ratones con fucoidán consiguió una eficacia ligeramente superior al PPS aunque una farmacocinética relativa no definida puede haber afectado los resultados del 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. Los tiempos de concentración mejorados del plasma Hem A en concentraciones óptimas de fucoidán fueron comparables al uso de suplementos de FVIIa a aproximadamente 5 nM (Ejemplo 6) que se ha demostrado eficaz para formalizar 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 anti-coagulación. 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 un enfoque 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. Una composición que comprende un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA), en la 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 molar anticoagulante de la heparina no fraccionada, y además en la que dicho PSNA está seleccionado entre fucoidán o un fragmento del mismo, 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), condroitín sulfato o dermatán sulfato, en la que la composición está en una forma de dosificación unitaria, para su uso en la mejora de la coagulación sanguínea.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que la cantidad de PSNA presente en la composición proporciona una dosis comprendida en el intervalo de 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

3. Una composición que comprende:

un polisacárido sulfatado no anticoagulante (PSNA), en la que el PSNA se ha seleccionado entre fucoidán o un fragmento del mismo, 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), 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, and factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa; para su uso en la mejora de la coagulación sanguínea.

4. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho PSNA es NAH.

5. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho PSNA es PPS.

6. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho PSNA es fucoidán.

7. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho PSNA es un fragmento de fucoidán que disminuye el tiempo de coagulación de la sangre cuando se ensaya en ensayos de dPT.

8. La composición de la reivindicación 3, en la que el factor es Factor VIIIa.

9. La composición de la reivindicación 1, en la que el sujeto tiene un trastorno hemorrágico seleccionado entre el grupo que consiste en un trastorno hemorrágico crónico o agudo, un trastorno de la coagulación congénito ocasionado por la deficiencia en un factor sanguíneo, y un trastorno de la coagulación adquirido.

10. La composición de la reivindicación 9, en la que el trastorno hemorrágico es una deficiencia en un factor sanguíneo de uno o más factores seleccionados entre el grupo que consiste en factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, y factor de von Willebrand; un trastorno de hipoprotrombinemia por fibrinógeno, o una disfunción plaquetaria.

11. La composición de la reivindicación 1, en la que la causa de la necesidad de la coagulación mejorada de la sangre es anterior a la administración de un anticoagulante o una intervención quirúrgica u otro procedimiento invasivo.

12. La composición de la reivindicación 11, en la que el anticoagulante se selecciona entre el grupo que consiste en heparina, un derivado de cumarina, tal como la warfarina o el dicumarol, 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 VIIIa, incluyendo la proteína C activada (APC) y trombomodulina soluble, inhibidores de la trombina, incluyendo la hirudina, bivalirudina, argatrobán, y ximelagatrán, y un anticuerpo que se une a un factor de coagulación.

13. La composición de la reivindicación 11, en la 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 Willebrands, precalicreína, o quininógeno de alto peso molecular (QAPM).

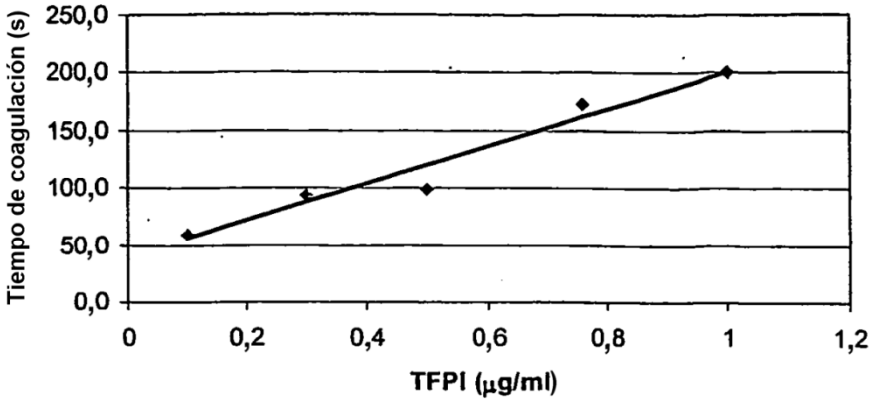
Tiempo de coagulación (s)
250,0
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
1,2
TFPI (µg/ml)

Figura 1

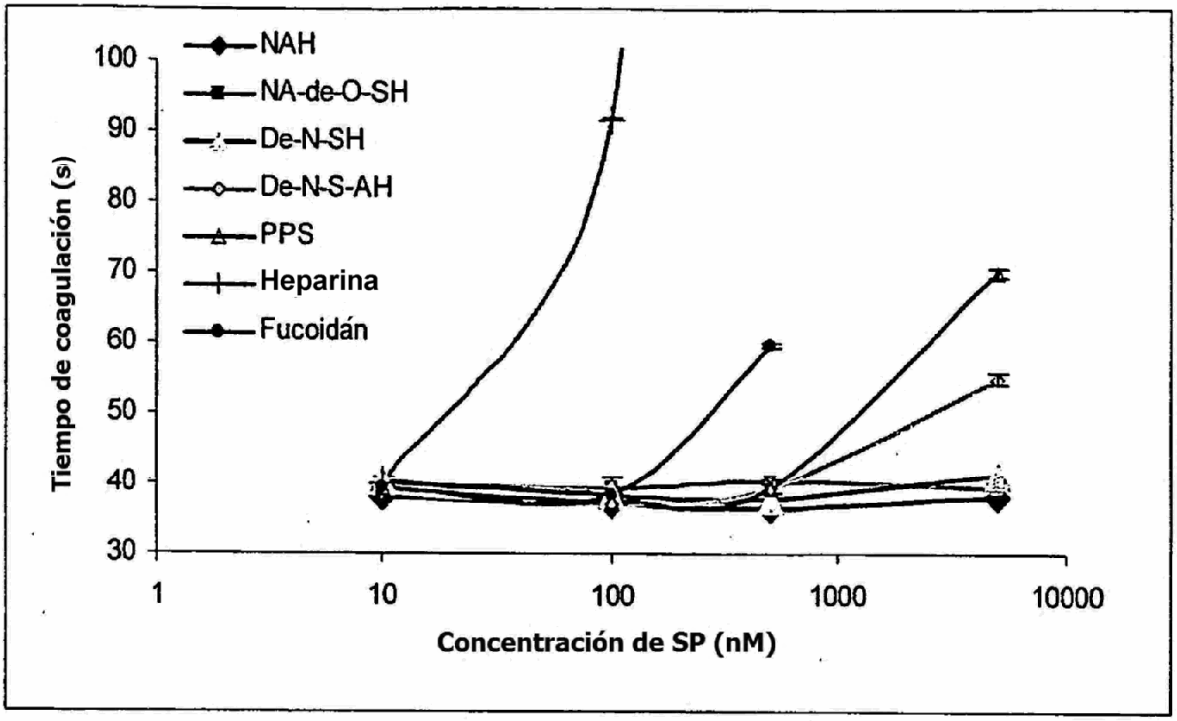
NAH
NA-de-O-SH
De-N-SH
De-N-S-AH
PPS
Heparina
Fucoidán
Tiempo de coagulación (s)
100
90
80
70
60
50
40
30
1
10
100
1000
10000
Concentración de SP (nM)

Figura 2

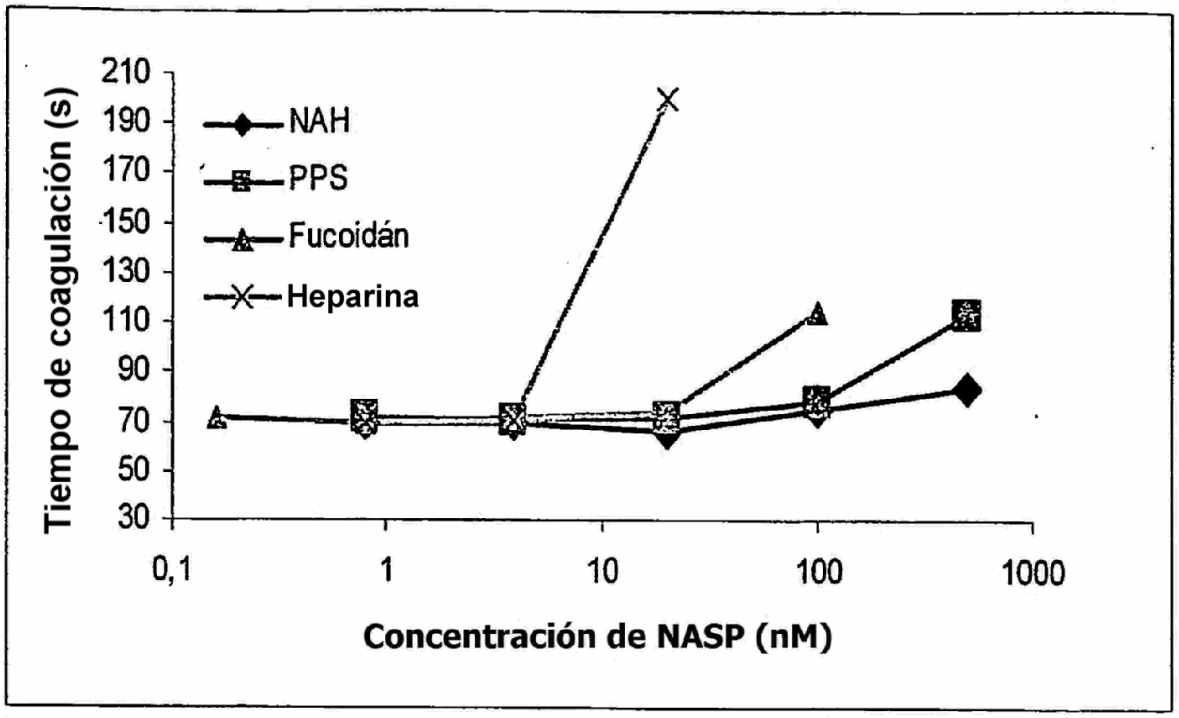
Tiempo de coagulación (s)
210
190
170
150
130
110
90
70
50
30
NAH
PPS
Fucoidán
Heparina
0,1
1
10
100
1000
Concentración de NASP (nM)

Figura 3

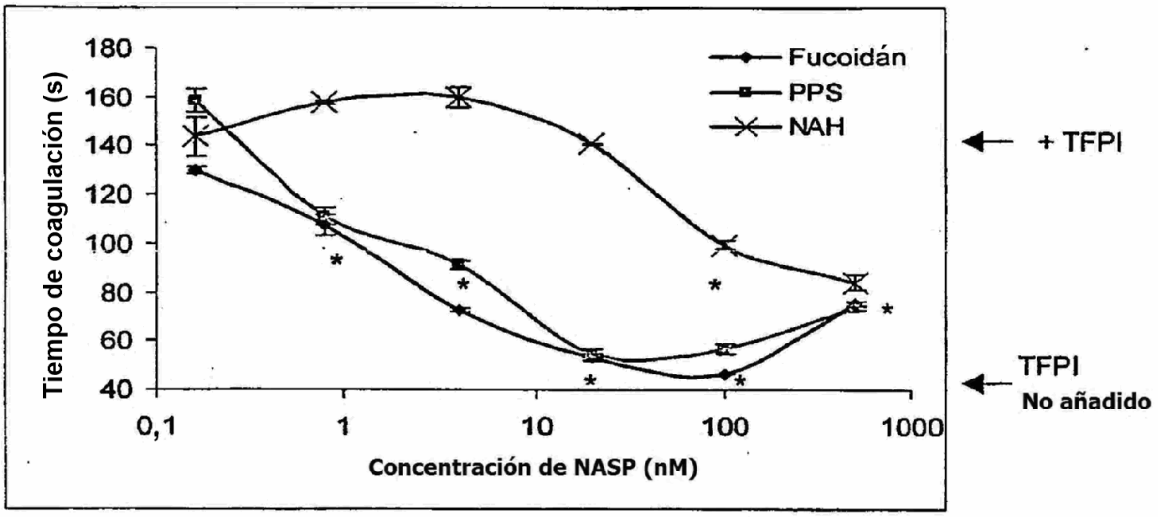
Tiempo de coagulación (s)
180
160
140
120
100
80
60
40
0,1
1
10
100
1000
Concentración de NASP (nM)
Fucoidán
PPS
NAH
+ TFPI
TFPI
No añadido

Figura 4

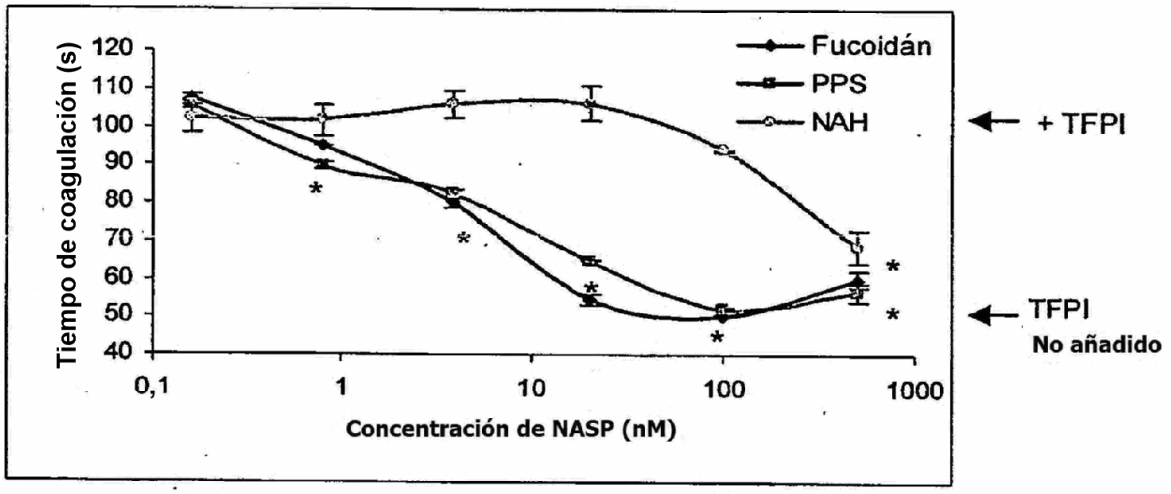
Tiempo de coagulación (s)
120
110
100
90
80
70
60
50
40
0,1
1
10
100
1000
Concentración de NASP (nM)
Fucoidán
PPS
NAH
+ TFPI
TFPI
No añadido

Figura 5

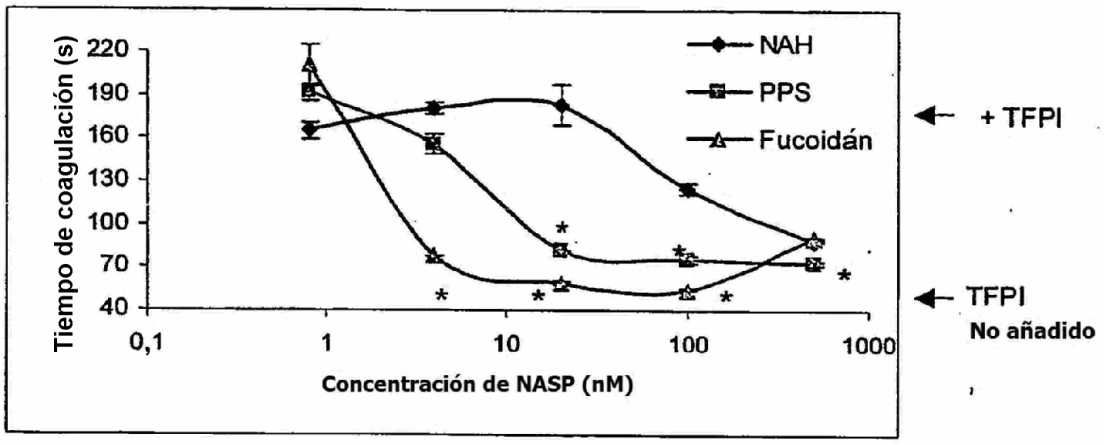
Tiempo de coagulación (s)
220
190
160
130
100
70
40
0,1
1
10
100
1000
Concentración de NASP (nM)
NAH
PPS
Fucoidán
+ TFPI
TFPI
No añadido

Figura 6

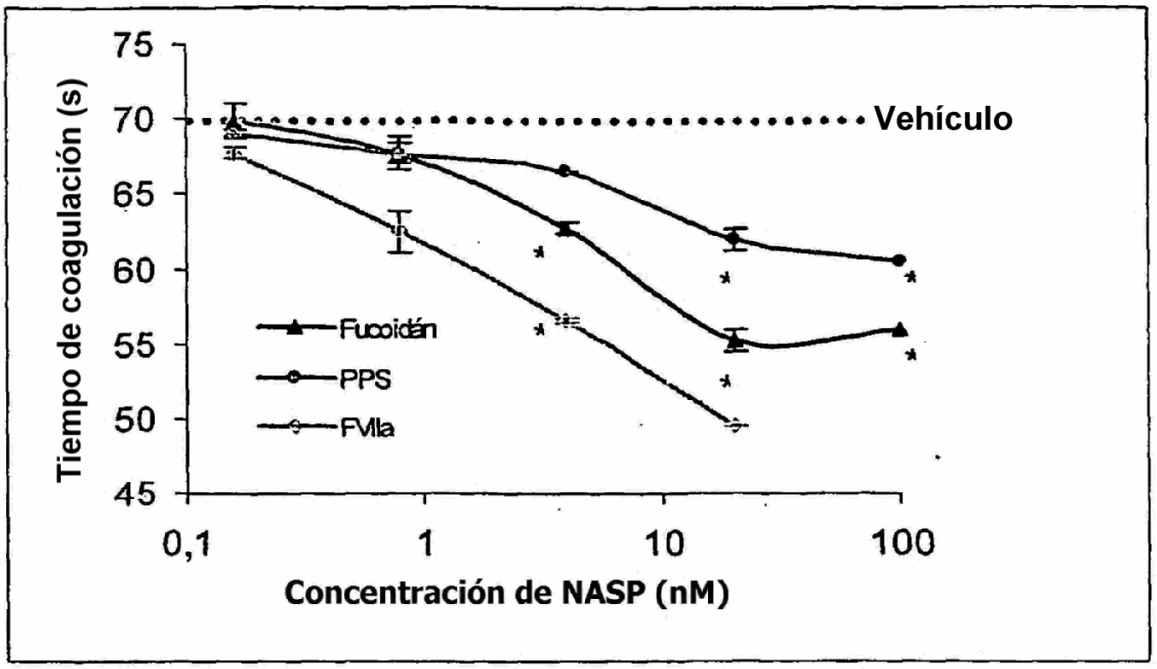
75
70
65
60
55
50
45
Tiempo de coagulación (s)
Vehículo
Fucoidán
PPS
FVIIa
0,1
1
10
100
Concentración de NASP (nM)

Figura 7

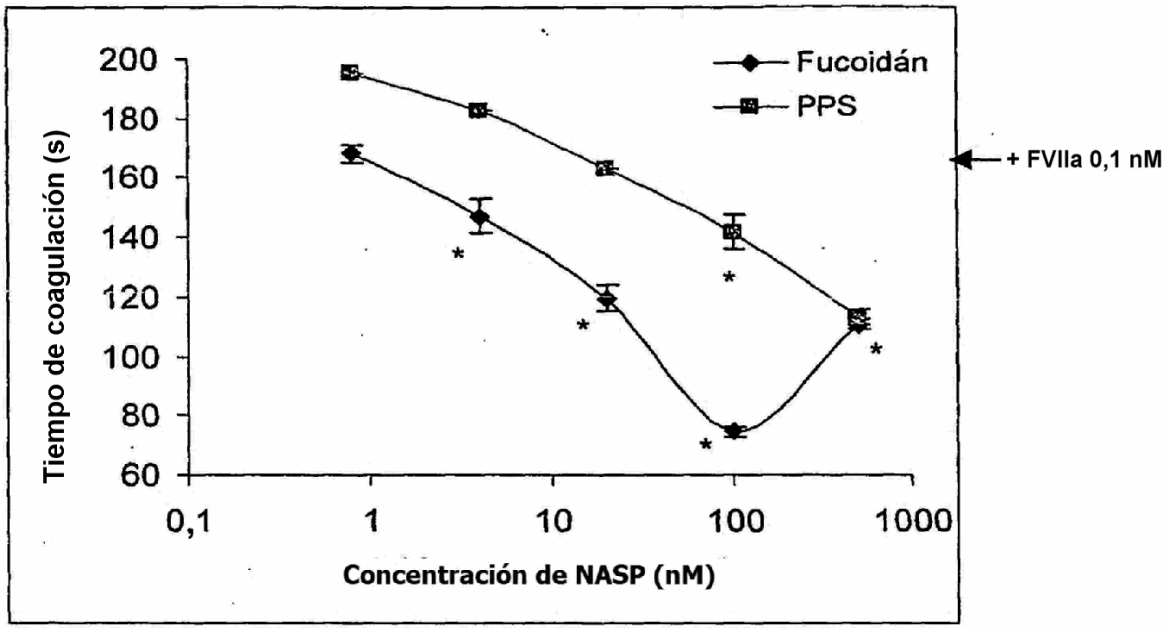
Fucoidán
PPS
+ FVIIa 0,1 nM
Tiempo de coagulación (s)
200
180
160
140
120
100
80
60
0,1
1
10
100
1000
Concentración de NASP (nM)

Figura 8