(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 512 066**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/28	(2006.01)
A61K 31/295	(2006.01)
A61K 31/416	(2006.01)
A61K 31/69	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61P 7/04	(2006.01)
A61P 9/12	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2010** **E 10749399 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014** **EP 2403498**

(54) Título: **Potenciación de la coagulación o reducción de la fibrinólisis**

(30) Prioridad:

05.03.2009 US 157719 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2014

(73) Titular/es:

THE UAB RESEARCH FOUNDATION (100.0%)
1720 2nd Avenue South, Administration Building 770
Birmingham, AL 35294-0107, US

(72) Inventor/es:

NIELSEN, VANCE G.;
GEORGE, JAMES F. y
KIRKLIN, JAMES K.

(74) Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 512 066 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

Potenciación de la coagulación o reducción de la fibrinólisis

Referencia cruzada a solicitudes de prioridad

[0001] La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de EE.UU. nº 61/157.719 presentada el 5 de marzo de 2009.

Antecedentes

[0002] La hemorragia debe controlarse bajo una variedad de circunstancias. Por ejemplo, lesión, enfermedad o cirugía pueden producir hemorragia, y los profesionales clínicos usan una variedad de medidas para controlar tal hemorragia en sus pacientes. Tal control, sin embargo, puede ser particularmente difícil si el paciente está tomando ciertas medicaciones o tiene ciertas afecciones, tales como hemofilia.

Resumen

[0003] En el presente documento se proporcionan composiciones para controlar la hemorragia en un sujeto. La potenciación de la coagulación y la reducción de la fibrinólisis se usan en todas partes como medios para controlar la hemorragia en un sujeto. Los procedimientos incluyen seleccionar un sujeto en necesidad de coagulación potenciada o fibrinólisis reducida y administrar al sujeto una molécula liberadora de monóxido de carbono (CORM) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Ejemplos de CORM y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas útiles con los procedimientos descritos en el presente documento incluyen dímero de tricarbonildiclororutenio (II) (es decir, CORM-2), tricarbonilcloro(glicinato)rutenio (II) (es decir, CORM-3), boranocarbonato de sodio, decacarbonilo de dimanganeso, pentacarbonilo de hierro, y derivados de los mismos. También se proporcionan composiciones que incluyen una CORM o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un hemoderivado. El hemoderivado es un crioprecipitado o plasma fresco congelado. Se proporciona tratamiento de un sujeto en necesidad de un hemoderivado, que incluye administrar al sujeto la composición que comprende la CORM o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un hemoderivado.

[0004] Los detalles de uno o más ejemplos de las composiciones y procedimientos se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción más adelante. Otras características, objetivos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y dibujos, y de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

[0005]

La Figura 1 es una gráfica que muestra la potenciación por CORM-2 y CORM-2 inactivada (iCORM-2) de la cinética de coagulación en plasma deficiente en FXIII. En comparación con plasma sin exponer normal (traza en rejilla gris clara), el plasma expuesto a CORM-2 100 μM (traza negra) o iCORM (traza gris) tiene un aumento significativo en tanto la velocidad de formación del coágulo como la fortaleza del coágulo.

La Figura 2 es una gráfica que ilustra las definiciones de variables del modelo de duración del coágulo. TCC = tiempo de crecimiento del coágulo (s), definido como el tiempo cuando la formación del coágulo comienza (fortaleza del coágulo de 102 dinas/cm^2 [amplitud de 2 mm]) a cuando se observa la máxima fortaleza del coágulo; TLC = el tiempo de lisis del coágulo (s) empieza cuando se observa la máxima fortaleza del coágulo y continúa hasta que la lisis convierte la fortaleza del coágulo igual a 102 dinas/cm^2; DC = duración del coágulo (s) es la suma de TCC y TLC; TMVGT = tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos (s); MVGT = máxima velocidad de generación de trombos (dinas/cm^2/s); GTT = generación total de trombos (dinas/cm^2); TML = tiempo hasta la máxima velocidad de lisis (s); MVL = máxima velocidad de lisis (-dinas/cm^2/s); ACL = área bajo la curva de la lisis (-dinas/cm^2).

La Figura 3 muestra relaciones de concentración-respuesta de la cinética de crecimiento del coágulo y fortaleza con concentración de CORM-2 creciente. CORM-2 disminuyó el tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos (TMVGT) (panel superior), aumentó la máxima velocidad de generación de trombos (MVGT) (panel central) y aumentó la generación total de trombos (GTT) (panel inferior) de un modo dependiente de la concentración.

La Figura 4 muestra relaciones de concentración-respuesta de la cinética fibrinolítica del coágulo con concentración de CORM-2 creciente. CORM-2 prolongó el tiempo hasta la máxima velocidad de lisis (TMVL) (panel superior) y aumentó la máxima velocidad de lisis (MVL) (panel inferior) de un modo dependiente de la concentración.

La Figura 5 muestra relaciones de concentración-respuesta del tiempo de crecimiento del coágulo (panel superior), tiempo de lisis del coágulo (panel central) y duración del coágulo (panel inferior) con concentración de CORM-2 creciente. CORM-2 aumentó el tiempo de crecimiento del coágulo (TCC), tiempo de lisis del coágulo (TLC) y duración del coágulo (DC) de un modo dependiente de la concentración.

La Figura 6 es una gráfica que muestra el efecto de CORM-2 sobre el crecimiento/disgregación del coágulo en plasma normal. La exposición de plasma normal a CORM-2 100 μM (traza gris) produjo trombos significativamente más fuertes que duraron más tiempo en comparación con plasma sin exponer (traza negra).

La Figura 7 es una gráfica que muestra el efecto de CORM-2 sobre el crecimiento/disgregación del coágulo en plasma deficiente en FXIII. Al igual que con plasma normal, la exposición de plasma deficiente en FXIII a CORM-2 100 μM (traza gris) produjo trombos significativamente más fuertes que duraron más tiempo en comparación con el plasma sin exponer (traza negra).

La Figura 8 es una gráfica que muestra el efecto de CORM-2 sobre el crecimiento/disgregación del coágulo en plasma deficiente en PAI-1. La exposición de plasma deficiente en PAI-1 a CORM-2 100 μM (traza gris) produjo trombos significativamente más fuertes que duraron más tiempo en comparación con plasma sin exponer (traza negra). Sin embargo, el grado de potenciación de la coagulación y atenuación de la fibrinólisis por CORM-2 fue inferior al observado en plasma normal.

La Figura 9 es una gráfica que muestra el efecto de CORM-2 sobre el crecimiento/disgregación del coágulo en plasma deficiente en IFAT. La exposición de plasma deficiente en IFAT a CORM-2 100 μM (traza gris) produjo trombos significativamente más fuertes que duraron más tiempo en comparación con plasma sin exponer (traza negra). Sin embargo, el grado de potenciación de la coagulación y atenuación de la fibrinólisis por CORM-2 fue inferior al observado en plasma normal, pero similar al observado en plasma deficiente en PAI-1.

La Figura 10 es una gráfica que muestra el efecto de CORM-2 sobre el crecimiento/disgregación del coágulo en plasma deficiente en α_2-antiplasmina. La exposición de plasma deficiente en α_2-antiplasmina a CORM-2 100 μM (traza gris) produjo muy poco cambio en tanto la coagulación como la cinética fibrinolítica en comparación con plasma sin exponer (traza negra). Este resultado fue notablemente diferente de todos los otros tipos de plasma probados.

La Figura 11 contiene imágenes que muestran los efectos de CORM-2 sobre la ultraestructura del trombo en plasma normal a poco aumento. El aumento para ambos paneles fue 5.000 veces del normal. El panel A muestra plasma normal no expuesto a CORM-2 y el panel B muestra plasma normal expuesto a CORM-2 100 μM. La barra blanca en la esquina inferior derecha de ambos paneles representa 2 micrómetros. Una diferencia entre los dos paneles fue la reducción de la formación de fibra gruesa tras la exposición a CORM-2.

La Figura 12 contiene imágenes que muestran los efectos de CORM-2 sobre la ultraestructura del trombo en plasma normal a gran aumento. El aumento para ambos paneles fue 60.000 veces del normal. El panel A muestra plasma normal no expuesto a CORM-2 y el panel B muestra plasma normal expuesto a CORM-2 100 μM. La barra blanca en la esquina inferior derecha de ambos paneles representa 500 nanómetros. Hubo poca diferencia en la arquitectura de la fibra delgada tras la exposición a CORM-2.

La Figura 13 contiene imágenes que muestran los efectos de CORM-2 sobre la ultraestructura del trombo en plasma deficiente en FXIII a poco aumento. El aumento para ambos paneles fue 5.000 veces del normal. El panel A muestra plasma deficiente en FXIII no expuesto a CORM-2 y el panel B muestra plasma deficiente en FXIII expuesto a CORM-2 100 μM. La barra blanca en la esquina inferior derecha de ambos paneles representa 2 micrómetros. La exposición a CORM-2 disminuyó la formación de fibra gruesa y aumentó el contenido de matriz de fibra delgada en el coágulo deficiente en FXIII. Cuando se comparó con el panel A en la Figura 11, la exposición a CORM-2 “normalizó” la ultraestructura del trombo en plasma deficiente en FXIII como se representa en el panel B de esta figura.

La Figura 14 contiene imágenes que muestran los efectos de CORM-2 sobre la ultraestructura del trombo en plasma deficiente en FXIII a gran aumento. El aumento para ambos paneles fue 60.000 veces del normal. El panel A muestra plasma deficiente en FXIII no expuesto a CORM-2 y el panel B muestra plasma deficiente en FXIII expuesto a CORM-2 100 μM. La barra blanca en la esquina inferior derecha de ambos paneles representa 500 nanómetros. La exposición a CORM-2 disminuyó el contenido de fibra gruesa y potenció la formación de coágulo de fibra delgada.

La Figura 15 muestra la cinética de coagulación en muestras de plasma deficientes en factor VIII expuestas a CORM-2 y no expuestas a CORM-2 (control). En comparación con condiciones de control, las muestras de plasma individuales expuestas a 100 mmoles de CORM-2 tuvieron un aumento significativo en tanto la velocidad de formación del coágulo (MVGT) como la fortaleza del coágulo (GTT) sin cambio en TMVGT. La línea discontinua representa el valor medio para el plasma normal reunido tras la activación del factor tisular.

La Figura 16 muestra la cinética de coagulación en muestras de plasma deficientes en factor IX expuestas a CORM-2 y no expuestas a CORM-2 (control). En comparación con condiciones de control, las muestras de plasma individuales expuestas a 100 mmoles CORM-2 tuvieron un aumento en tanto la velocidad de formación del coágulo (MVGT, cuatro de cinco donantes) como la fortaleza del coágulo (GTT, cinco de cinco donantes). Los cinco donantes demostraron una disminución en el TMVGT tras la exposición a CORM-2. La línea discontinua representa el valor medio para el plasma normal reunido tras la activación del factor tisular.

La Figura 17 muestra la cinética de coagulación en muestras de plasma deficientes en factor VII expuestas a CORM-2 y no expuestas a CORM-2 (control). En comparación con condiciones de control, las muestras de plasma individuales expuestas a 100 mmoles de CORM-2 tuvieron un aumento en tanto la velocidad de formación del coágulo (MVGT) como la fortaleza del coágulo (GTT). Los cuatro individuos deficientes en FVII demostraron una prolongación del TMVGT tras la exposición a CORM-2. La línea discontinua representa el valor medio para el plasma normal reunido tras la activación del factor tisular.

La Figura 18 es una gráfica que muestra el efecto de CORM-2 sobre la formación de trombos de rata y conejo con tPA presente. Panel superior: la exposición de plasma de rata a CORM-2 100 μM (traza negra) produjo

velocidad de crecimiento mejorada, fortaleza y sin fibrinólisis en comparación con plasma sin exponer (traza gris). Panel inferior: la exposición de plasma de conejo a CORM-2 100 μM (traza negra) produjo velocidad de crecimiento y fortaleza mejoradas, con aparición prolongada de la fibrinólisis en comparación con plasma sin exponer (traza gris).

La Figura 19 es una gráfica que muestra el efecto de CORM-2 sobre la formación de trombos sin activador del plasminógeno tipo tisular (tPA) presente. Nivel inicial = CORM-2 0 μM; CORM-2 = CORM-2 100 μM. Se identifican sujetos individuales según la leyenda en el panel A. Las barras horizontales cortas representan el valor medio derivado de plasma humano normal con RNI = 1,0.

La Figura 20 es una gráfica que muestra el efecto de CORM-2 sobre la formación de trombos con 100 U/ml de activador del plasminógeno tipo tisular (tPA) presente. Nivel inicial = CORM-2 0 μM; CORM-2 = CORM-2 100 μM. Se identifican sujetos individuales según la leyenda en el panel A. Las barras horizontales cortas representan el valor medio derivado de plasma humano normal con RNI = 1,0.

La Figura 21 es una gráfica que muestra el efecto de CORM-2 sobre la fibrinólisis. Nivel inicial = CORM-2 0 μM; CORM-2 = CORM-2 100 μM. Se identifican sujetos individuales según la leyenda en el panel A. Las barras horizontales cortas representan el valor medio derivado de plasma humano normal con RNI = 1,0.

La Figura 22 es una gráfica que muestra el efecto de CORM-2 sobre la duración del coágulo. Nivel inicial = CORM-2 0 μM; CORM-2 = CORM-2 100 μM. Se identifican sujetos individuales según la leyenda en el panel A. Las barras horizontales cortas representan el valor medio derivado de plasma humano normal con RNI = 1,0.

La Figura 23 es una gráfica que muestra la respuesta de MVGT a concentración de fibrinógeno creciente en presencia de CORM-2 0 ó 100 μM. Aumentos en la concentración de fibrinógeno potenciaron los valores de MVGT en muestras expuestas a CORM-2 0 μM (círculos negros). Se observó una correlación similar, pero potenciada, de valores de MVGT con concentración de fibrinógeno tras la exposición a CORM-2 100 μM (círculos huecos). La línea continua representa el ajuste de curva sigmoide para muestras expuestas a CORM-2 0 μM, mientras que la línea discontinua representa el ajuste de curva sigmoide para plasma expuesto a CORM-2 100 μM.

La Figura 24 es una gráfica que muestra la respuesta de GTT a concentración de fibrinógeno creciente en presencia de CORM-2 0 ó 100 μM. Aumentos en la concentración de fibrinógeno potenciaron los valores de GTT en muestras expuestas a CORM-2 0 μM (círculos negros). Se observó una correlación similar, pero potenciada, de valores de GTT con concentración de fibrinógeno tras la exposición a CORM-2 100 μM (círculos huecos). La línea continua representa el ajuste de curva sigmoide para muestras expuestas a CORM-2 0 μM, mientras que la línea discontinua representa el ajuste de curva sigmoide para plasma expuesto a CORM-2 100 μM.

La Figura 25 es una gráfica que muestra la potenciación mediada por CORM-2 de MVGT y GTT. La exposición de plasma con concentración de fibrinógeno progresivamente mayor a CORM-2 100 μM produjo una potenciación en “forma de campana” de MVGT y GTT. Porcentaje (%) de aumento de CORM-2 = la diferencia en porcentaje entre las medias de muestras expuestas a CORM-2 0 ó 100 μM a las concentraciones de fibrinógeno indicadas.

La Figura 26 es una gráfica que muestra la respuesta de MVGT a aumentar el grado de dilución de plasma con cloruro sódico (CS) o hidroxietilalmidón de bajo peso molecular (VOL) en presencia de CORM-2 0 ó 100 μM. El panel A muestra los resultados de dilución con cloruro sódico y el panel B muestra los resultados de dilución con hidroxietilalmidón de bajo peso molecular. La línea continua representa el ajuste de curva para muestras expuestas a CORM-2 0 μM, mientras que la línea discontinua representa el ajuste de curva para plasma expuesto a CORM-2 100 μM.

La Figura 27 es una gráfica que muestra la respuesta de GTT a aumentar el grado de dilución de plasma con cloruro sódico (CS) o hidroxietilalmidón de bajo peso molecular (VOL) en presencia de CORM-2 0 ó 100 μM. El panel A muestra los resultados de dilución con cloruro sódico y el panel B muestra los resultados de dilución con hidroxietilalmidón de bajo peso molecular. La línea continua representa el ajuste de curva para muestras expuestas a CORM-2 0 μM, mientras que la línea discontinua representa el ajuste de curva para plasma expuesto a CORM-2 100 μM.

Descripción detallada

[0006] Estudios previos han mostrado que el monóxido de carbono (CO) generado durante la degradación de hemo por hemo oxigenasa o farmacológicamente administrado con moléculas liberadoras de monóxido de carbono (CORM) disminuye la inflamación, promueve la vasodilatación, atenúa la lesión por isquemia-reperfusión y disminuye la apoptosis. También se ha mostrado que el CO liberado por CORM reduce la trombosis *in vitro* y la coagulación *in vivo.* Sin embargo, los ejemplos proporcionados en el presente documento demuestran que el CO administrado con CORM produce coagulación potenciada y fibrinólisis atenuada, como se demuestra por un aumento de la velocidad de crecimiento y fortaleza del coágulo.

[0007] Con respecto a los efectos antitrombóticos de CO, se produce una disminución suave en la agregación de plaquetas tras la exposición a gas CO, que se planteó que era secundaria a la activación de guanilato ciclasa soluble (Brune y col., Mol Pharmacol 32:497-504 (1987); Brune y col., Eur. J Biochem 192:683-688 (1990)). Después se determinó que CO 100-500 μM liberado de tricarbonilcloro(glicinato)rutenio (II) inhibió el 25-95 % la agregación de plaquetas *in vitro* independientemente de la activación de guanilato ciclasa soluble (Chlopicki y col., Cardiovasc Res

71:393-401 (2006)). Además, informes previos mostraron un efecto anticoagulante de CO *in vivo* (True y col., Circ Res 101:893-901 (2007)). La concentración de CO ambiental en la circulación del modelo de roedor descrito en True y col., 2007, no estuvo probablemente próxima a CO 500 μM requerida para la notable inhibición de plaquetas *in vitro* (Chlopicki y col., Cardiovasc Res 71:393-401 (2006)), ya que ésta sería probablemente letal (véase Motterlini y col., Circ Res 90:e17-e24 (2002) para la citotoxicidad en la exposición de bolo de CORM-2 170 μM a 420 μM a células de músculo liso vasculares bovinas). Así, los efectos de CO sobre la formulación del trombo parecen estar relacionados con el modo de administración y el momento preciso de administración. Los ejemplos descritos en el presente documento, a diferencia, indican que la exposición de plasma humano al dímero de tricarbonildiclororutenio (II) produce coagulación potenciada y fibrinólisis atenuada, como se demuestra por un aumento de la velocidad de crecimiento y fortaleza del coágulo.

[0008] Las composiciones descritas en el presente documento son útiles en controlar la hemorragia en un sujeto. Sin querer decir que sea limitante, las composiciones descritas en el presente documento tienen efectos procoagulantes y/o antifibrinolíticos. Las composiciones descritas en el presente documento, por ejemplo, puede ser útiles en potenciar la coagulación o reducir la fibrinólisis. El potenciar la coagulación o reducir la fibrinólisis en un sujeto incluye las etapas de seleccionar un sujeto en necesidad de coagulación potenciada o fibrinólisis reducida y administrar al sujeto una CORM o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

[0009] Como se usa en el presente documento, un agente liberador de monóxido de carbono (CORM) se refiere a un compuesto de carbonilo metálico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que libera monóxido de carbono. La CORM pueden liberar monóxido de carbono por varios procedimientos. Por ejemplo, la CORM puede liberar monóxido de carbono en contacto con un disolvente o medio adecuado, por ejemplo, en contacto con un fluido fisiológico acuoso tal como sangre o linfa. La CORM también puede liberar monóxido de carbono, por ejemplo, en contacto con materiales celulares fisiológicos, tales como un tejido, órgano o célula. Otro ejemplo de un procedimiento por el que una CORM puede liberar monóxido de carbono es por irradiación. El compuesto puede ser irradiado antes de la administración, por ejemplo, para producir una disolución de CO disuelto, o puede irradiarse *in situ* después de la administración.

[0010] Las CORM y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas adecuadas para los usos descritos en el presente documento incluyen aquellas que incluyen un metal de transición o metaloide y uno o más ligando(s) de carbonilo. El metal de transición o metaloide, por ejemplo, puede ser rutenio, hierro, manganeso, cobalto, níquel, molibdeno, rodio o boro. El (Los) ligando(s) de carbonilo puede(n) coordinarse con el centro metálico, o unirse a otros grupos por enlaces iónicos o covalentes. Las CORM y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas para su uso con los procedimientos descritos en el presente documento también pueden incluir ligandos adicionales que pueden modular una propiedad particular de la CORM, tal como, por ejemplo, la velocidad de liberación de monóxido de carbono, solubilidad, hidrofobia, estabilidad o potencial electroquímico. Los ligandos adicionales pueden ser, por ejemplo, haluros, sulfóxidos, aminoácidos naturales y sintéticos, compuestos aromáticos, carboxilatos, éteres, alcoholes o nitrilos. La CORM o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma también puede incluir un resto que elige diana útil para facilitar la liberación del monóxido de carbono en un sitio apropiado. El resto que elige diana puede ser, por ejemplo, capaz de unirse a un receptor sobre una superficie de célula diana particular para promover la liberación del monóxido de carbono en el sitio requerido.

[0011] Un ejemplo de una CORM o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma adecuada para su uso con los procedimientos descritos en el presente documento es el dímero de tricarbonildiclororutenio (II) (CORM-2). Otros ejemplos de CORM adecuadas para su uso con los procedimientos descritos en el presente documento incluyen tricarbonilcloro(glicinato)rutenio (II) (CORM-3), boranocarbonato de sodio, decacarbonilo de dimanganeso y pentacarbonilo de hierro.

[0012] Los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse en una variedad de formas. Los compuestos pueden sintetizarse usando diversos procedimientos sintéticos. Al menos algunos de estos procedimientos se conocen en la técnica de la química orgánica sintética. Los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactantes particulares o disolvente usado, pero tales condiciones pueden determinarse por un experto en la materia.

[0013] Las reacciones para producir los compuestos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo en disolventes, que pueden seleccionarse por un experto en la materia de la síntesis orgánica. Los disolventes pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactantes), los productos intermedios o productos en las condiciones (por ejemplo, temperatura y presión) a las que se llevan a cabo las reacciones. Las reacciones pueden llevarse a cabo en un disolvente o una mezcla de más de un disolvente. La formación de productos o productos intermedios puede monitorizarse según cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de productos puede monitorizarse por medios espectroscópicos, tales como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, ^{1}H o ^{13}C), espectroscopía infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, UV-visible) o espectrometría de masas, o por cromatografía tal como cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía en capa fina.

[0014] Las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas pueden proporcionarse en una composición que incluye una CORM o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un hemoderivado. El hemoderivado es un crioprecipitado o plasma fresco congelado. La CORM para la composición puede seleccionarse de cualquiera de las CORM descritas en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, dímero de tricarbonildiclororutenio (II), tricarbonilcloro(glicinato)rutenio (II), boranocarbonato de sodio, decacarbonilo de dimanganeso, pentacarbonilo de hierro y derivados de los mismos.

[0015] Uno o más de los compuestos descritos en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden proporcionarse en una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede formularse según su uso y modo de administración. Las composiciones incluirá una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos descritos en el presente documento o derivados de los mismos en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, puede incluir adicionalmente otros agentes, que incluyen otros agentes terapéuticos. Estas composiciones pueden prepararse de cualquier manera disponible en la materia y pueden administrarse de varias formas dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico, del área que va a tratarse, el sujeto que va a tratarse, y otras variables. Así, las composiciones y compuestos desvelados pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral, parenteralmente (por ejemplo, intravenosamente), intraventricularmente, intramuscularmente, intraperitonealmente, transdérmicamente, extracorporalmente o tópicamente. Las composiciones y compuestos pueden administrarse localmente.

[0016] Por farmacéuticamente aceptable se indica un material que no es biológicamente o de otro modo no deseable, que puede administrarse a un individuo junto con el compuesto seleccionado sin causar efectos biológicos no aceptables o interaccionar de una manera perjudicial con los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

[0017] Como se usa en el presente documento, el término vehículo engloba cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, tampón, estabilizador, solubilizante, lípido, estabilizador, u otro material muy conocido en la técnica para su uso en formulaciones farmacéuticas. La elección de un vehículo para su uso en una composición dependerá de la vía de administración prevista para la composición. La preparación de vehículos farmacéuticamente aceptables y formulaciones que contienen estos materiales se describe en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, ed. University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia Pa., 2005. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como tampones fosfato, tampón citrato, y tampones con otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN® (ICI, Inc.; Bridgewater, Nueva Yérsey), polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™ (BASF; Florham Park, NJ).

[0018] Composiciones que contienen el compuesto descrito en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables del mismo adecuadas para inyección parenteral puede comprender disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles fisiológicamente aceptables, y polvos estériles para reconstitución en disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Ejemplos de excipientes, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y por el uso de tensioactivos.

[0019] Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, humectantes, emulsionantes y agentes de dispensión. La prevención de la acción de microorganismos puede promoverse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También pueden incluirse agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse por el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0020] Formas de dosificación sólidas para administración por vía oral de las composiciones descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, los compuestos descritos en el presente documento o derivados de los mismos se mezclan con al menos un excipiente habitual inerte (o vehículo) tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio o (a) cargas o sustancias de relleno como, por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, (c) humectantes como, por ejemplo, glicerol, (d) agentes disgregantes como, por ejemplo, agar-agar, carbonato cálcico, patata o almidón de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos complejos y carbonato sódico, (e) retardantes de la disolución como, por ejemplo, parafina, (f) aceleradores de la

absorción como, por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) adsorbente como, por ejemplo, caolín y bentonita, y (i) lubricantes como, por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, o mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes de tamponamiento.

[0021] También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blanda y dura usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, además de polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

[0022] Formas de dosificación sólidas tales como comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y vainas, tales como recubrimientos entéricos y otros conocidos en la técnica. Pueden contener opacificantes y también pueden ser de composición tal que liberen el compuesto o compuestos activos en una cierta parte del tubo intestinal de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de incorporación que pueden usarse son sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente mencionados.

[0023] Formas de dosificación líquidas para administración por vía oral de las composiciones descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas incluyen emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la materia, tales como agua u otros disolventes, solubilizantes y emulsionantes como, por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, o mezclas de estas sustancias, y similares.

[0024] Además de tales diluyentes inertes, la composición también puede incluir agentes adicionales, tales como humectantes, emulsionantes, agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes o perfumantes.

[0025] Las suspensiones pueden contener, además de los compuestos activos, agentes adicionales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias, y similares.

[0026] Las composiciones de los compuestos descritos en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para administraciones rectales son opcionalmente supositorios, que pueden prepararse mezclando los compuestos con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio, que son sólidos a temperaturas habituales pero líquidos a temperatura corporal y, por tanto, se funden en el recto o cavidad vaginal y liberan el componente activo.

[0027] Las formas de dosificación para administración tópica de los compuestos descritos en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen pomadas, polvos, esprays e inhalantes. Por ejemplo, las CORM y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas puede formularse como un espray para la nasofaringe, el pulmón o la piel. Los compuestos descritos en el presente documento o sales farmacéuticas de los mismos se mezclan bajo condiciones estériles con un vehículo fisiológicamente aceptable y cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda ser requerido. También se contempla que están dentro del alcance de las composiciones formulaciones oftálmicas, pomadas, polvos y disoluciones.

[0028] El término sales farmacéuticamente aceptables como se usa en el presente documento se refiere a aquellas sales del compuesto descrito en el presente documento o derivados de las mismas que están dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de sujetos sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable, y eficaces para su uso previsto, además de las formas de ión bipolar, cuando sea posible, de los compuestos descritos en el presente documento. El término sales se refiere a las sales de adición de ácido relativamente no tóxicas, inorgánicas y orgánicas de los compuestos descritos en el presente documento. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación de los compuestos o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal así formada. Sales representativas incluyen las sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, metanosulfonato y laurilsulfonato, y similares. Éstas pueden incluir cationes basados en metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, además de cationes amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos que incluyen amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares (véase Stahl y Wermuth, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Wiley-VCH, 2008.

[0029] Las CORM y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas descritas en el presente documento son útiles en controlar la hemorragia en seres humanos (incluyendo poblaciones pediátricas y geriátricas) y animales (por ejemplo, aplicaciones veterinarias). Los tratamientos descritos en el presente documento comprenden seleccionar un sujeto en necesidad de hemorragia controlada y administrar a un sujeto una cantidad eficaz de la CORM o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. La hemorragia puede controlarse potenciando la coagulación y/o atenuando la fibrinólisis.

[0030] Las composiciones descritas en el presente documento son útiles para sujetos que se someten a cirugía, que se someten a hemodilución, o tienen una enfermedad o afección asociada a hemorragia interna o externa. Por ejemplo, la enfermedad o afección asociada a hemorragia puede ser hemofilia, trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand, telangiectasia hemorrágica hereditaria o coagulación intravascular diseminada. Además, la enfermedad o afección asociada a hemorragia puede ser una herida abierta. La herida abierta puede producirse, por ejemplo, por traumatismo, lesión o un procedimiento quirúrgico. La enfermedad o afección también puede asociarse a hemorragia interna (por ejemplo, una úlcera sangrante o hemoptisis). La CORM o composición de CORM puede administrarse localmente o sistémicamente según las necesidades del sujeto. Por ejemplo, si un sujeto con hemofilia experimenta hemorragia en una articulación, la CORM o composición de CORM puede inyectarse intra-articularmente. En el caso de una laceración del hígado o herida abdominal, apósitos de gasa estériles empapados en CORM o composiciones de CORM pueden usarse para ponerse en contacto con el sitio de hemorragia. Las composiciones descritas en el presente documento también son útiles para los tratamientos de sujetos con hemofilia y trastornos similares a la hemofilia, que incluyen deficiencias de factor VII (FVII), factor VIII (FVIII) y factor IX (FIX) como se describe en el Ejemplo 4.

[0031] Las composiciones descritas en el presente documento son útiles para tratar un sujeto en necesidad de un hemoderivado, que incluye sujetos que tienen una enfermedad o afección producida por una bacteria o un virus, sujetos que han experimentado pérdida de sangre, sujetos con una enfermedad crónica o afección asociada a hemorragia (por ejemplo, hemofilia), sujetos en necesidad de transfusiones (por ejemplo, un lactante Rh positivo nacido de una madre Rh negativa). El tratamiento de un sujeto en necesidad de un hemoderivado incluye administrar al sujeto una composición que incluye una CORM o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un hemoderivado, como se describe en el presente documento. Ejemplos de enfermedades o afecciones infecciosas que pueden tratarse con las composiciones descritas en el presente documento incluyen sujetos con infección por el virus de la hepatitis A (VHA), infección por el virus de la hepatitis B (VHB), infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), infección por coronavirus, infección por citomegalovirus (CMV) y síndrome respiratorio agudo grave (SRAG). Las composiciones descritas en el presente documento también pueden ser útiles en el tratamiento de deficiencia congénita de antitrombina III, trombosis venosa y arterial, deficiencia adquirida de antitrombina III, coagulación intravascular diseminada, anemias hemolíticas microangiopáticas y enfermedad veno-oclusiva (EVO).

[0032] Las composiciones descritas en el presente documento son útiles para sujetos en necesidad de elevada formación de coágulos de sangre. Estos sujetos incluyen, por ejemplo, aquellos que están siendo simultáneamente tratados con un agente terapéutico que previene la coagulación, tal como anticoagulantes (por ejemplo, heparina o warfarina como se describe en Ejemplo 6), medicaciones antiplaquetarias (por ejemplo, clopidogrel), antitrombinas (por ejemplo, argatroban, lepirudina, bivalirudina o hirudina) o medicaciones fibrinolíticas (por ejemplo, urocinasa, estreptocinasa, o activador del plasminógeno tipo tisular).

[0033] Las composiciones y compuestos como se describen en el presente documento son útiles para tanto tratamiento profiláctico como terapéutico. Para uso profiláctico, una cantidad terapéuticamente eficaz de las CORM y sales farmacéuticamente aceptables las mismas se administran a un sujeto antes de la hemorragia o durante la hemorragia. La administración profiláctica puede producirse durante varias horas a días antes de la hemorragia. La administración profiláctica puede usarse, por ejemplo, en la preparación para un procedimiento quirúrgico. El tratamiento terapéutico implica administrar a un sujeto una cantidad eficaz de las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas después de que la hemorragia haya comenzado.

[0034] La administración de las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas puede llevarse a cabo usando cantidades terapéuticamente eficaces de las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas durante periodos de tiempo eficaces para controlar la hemorragia (por ejemplo, el tiempo necesario para potenciar la coagulación o para reducir la fibrinólisis). Por ejemplo, las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas pueden administrarse como una dosis única (es decir, dosificación de bolo) o como múltiples dosis. La cantidad eficaz de las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas puede determinarse por un experto habitual en la materia e incluye a modo de ejemplo cantidades de dosificación para un sujeto de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 200 μM de la CORM. Alternativamente, la cantidad de dosificación puede ser de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 100 μM de la CORM, o aproximadamente 100 μM de CORM. Aquellos expertos en la materia entenderán que el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier sujeto particular variará y dependerá de una variedad de factores, que incluyen la estabilidad metabólica y duración de la acción de la CORM, la especie, el modo y momento de

administración, la velocidad de eliminación, combinación de fármacos y el tipo y gravedad de la afección particular.

[0035] La administración de las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas puede administrarse sistémicamente o regionalmente a áreas de hemorragia para permitir que el monóxido de carbono esté disponible durante un periodo de tiempo controlable (por ejemplo, una semivida de aproximadamente 1 minuto). Así no se producen síntomas que son comunes después de la administración de otros agentes hemostáticos, que incluyen activación persistente de la coagulación y/o hipercoagulabilidad residual.

[0036] El control de la hemorragia en un sujeto puede comprender además administrar al sujeto un agente adicional. Así, las composiciones proporcionadas pueden incluir uno o más agentes adicionales. El uno o más agentes adicionales y las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas pueden co-administrarse. La co-administración, como se usa en el presente documento, incluye administración en cualquier orden, que incluye administración simultánea, además de orden temporalmente separado de hasta varios días separados. Los tratamientos también pueden incluir más de una única administración del uno o más agentes adicionales y/o las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. La administración del uno o más agentes adicionales y las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables pueden ser por las mismas vías o vías diferentes y simultáneamente o secuencialmente.

[0037] Los agentes adicionales pueden incluir, por ejemplo, agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, anestésicos, analgésicos, antihistamínicos, antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, agentes quimioterapéuticos, anticuerpos, agentes inmunoterapéuticos convencionales, citocinas, quimiocinas y/o factores de crecimiento.

[0038] Además, las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas pueden co-administrarse con agentes adicionales que ayudan a controlar la hemorragia. Por ejemplo, las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas pueden co-administrarse con un agente hemostático, un coagulante o una medicación antifibrinolítica. Ejemplos de agentes antifibrinolíticos útiles con las composiciones descritas en el presente documento incluyen ácido aminocaproico y ácido tranexámico. Otros agentes que son útiles en controlar la hemorragia, que incluyen factores de coagulación de la sangre (por ejemplo, factor VIII, factor IX, factor XIII, factor de von Willebrand), fibrina, trombina, factor VII activado recombinante, concentrado del complejo de protrombina y FEIBA (Baxter, Viena, Austria), también pueden co-administrarse con las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

[0039] Cualquiera de los agentes terapéuticos anteriormente mencionados puede usarse en cualquier combinación con las composiciones descritas en el presente documento. Las combinaciones se administran tanto concomitantemente (por ejemplo, como una mezcla), por separado, pero simultáneamente (por ejemplo, mediante líneas intravenosas separadas en el mismo sujeto), o secuencialmente (por ejemplo, uno de los compuestos o agentes se administra primero seguido del segundo). Así, el término combinación se usa para referirse a tanto administración concomitante, simultánea como secuencial de dos o más agentes.

[0040] Las CORM descritas en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas, con o sin agentes adicionales, pueden administrarse en o cerca del sitio de hemorragia. Las CORM también pueden administrarse, por ejemplo, tópicamente, localmente, intravenosamente o intramuscularmente. Además, la CORM puede formularse para administración, por ejemplo, por esprays en aerosol, pomadas, suturas, vendas, apósitos quirúrgicos, rellenos de heridas, gasa, hisopos, líquidos, pastas, cremas, lociones, espumas, geles, emulsiones o polvos. Las CORM también pueden usarse para recubrir agujas o sondas mínimamente invasivas (por ejemplo, un endoscopio). Instrumentos dentales, hilo dental y preparaciones de enjuague bucal también son formulaciones útiles para administrar CORM, en las que encías sangrantes o similares pueden ser problemáticas. Así, en el presente documento se proporcionan esprays en aerosol, pomadas, suturas, vendas, apósitos quirúrgicos, rellenos de heridas, gasa, hisopos, líquidos, pastas, cremas, lociones, espumas, geles, emulsiones, polvos, agujas, sondas, instrumentos dentales, hilo dental y enjuague bucal que comprende una CORM.

[0041] Las CORM que han liberado todos los ligandos de carbonilo como monóxido de carbono (es decir, CORM inactiva o iCORM) también son útiles con los tratamientos descritos en el presente documento. Estas moléculas pueden potenciar la velocidad de formación del coágulo y fortaleza del coágulo, como se muestra en el Ejemplo 2.

[0042] Como se usa en todo el presente documento, el sujeto puede ser un vertebrado, más específicamente un mamífero (por ejemplo, un ser humano, caballo, gato, perro, vaca, cerdo, ovejas, cabra, ratón, conejo, rata y cobaya), aves, reptiles, anfibios, peces y cualquier otro animal. El término no indica una edad o sexo particular. Así, pretenden estar cubiertos sujetos adultos y recién nacidos, tanto masculinos como femeninos. Como se usa en el presente documento, paciente o sujeto puede usarse indistintamente y puede referirse a un sujeto con una enfermedad o trastorno. El término paciente o sujeto incluye sujetos humanos y veterinarios.

[0043] Como se usa en el presente documento, los términos tratamiento, tratar o que trata se refieren a un procedimiento de reducción de los efectos de una enfermedad o afección o síntoma de la enfermedad o afección o un retardo en la aparición de signos adicionales o síntomas de la enfermedad o afección. Así, en el procedimiento desvelado, el tratamiento puede referirse a una reducción del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 % en la gravedad de una enfermedad establecida o afección o síntoma de la enfermedad o afección. Por ejemplo, un procedimiento de tratamiento de una enfermedad se considera que es un tratamiento si hay una reducción del 10 % en uno o más síntomas o signos de la enfermedad en un sujeto con respecto a un control. Así, la reducción puede ser una reducción del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o cualquier porcentaje entre el 10 % y el 100 % con respecto a niveles sin tratamiento previo o de control. Se entiende que el tratamiento no se refiere necesariamente a una cura o ablación completa de la enfermedad, afección o síntomas de la enfermedad o afección.

[0044] Como se usa en el presente documento, los términos previenen, prevenir y prevención de una enfermedad o trastorno se refieren a una acción, por ejemplo, administración de una composición o agente terapéutico, que se produce antes o en aproximadamente el mismo momento en el que un sujeto empieza a mostrar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, que inhibe o retarda la aparición o gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno. Como se usa en el presente documento, referencias a disminuir, reducir o inhibir incluyen un cambio del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o mayor con respecto a un nivel de control. Tales términos pueden incluir, pero no incluyen necesariamente, la eliminación completa.

[0045] Como se usa en el presente documento, los términos reducen y reducir se refieren a atenuar los efectos de una enfermedad o afección (por ejemplo, hemofilia) o síntoma de la enfermedad o afección disminuyendo un parámetro con respecto al nivel del parámetro en un control. Así, en el procedimiento desvelado, reducir puede referirse a una disminución del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 % en la gravedad de una enfermedad o afección establecida (por ejemplo, una disminución en el número de hospitalizaciones) o síntoma (por ejemplo, una disminución en el tiempo de coagulación). Por ejemplo, un procedimiento de reducción de una enfermedad se considera que es eficaz si hay una disminución del 10 % en uno o más síntomas o signos (por ejemplo, velocidad de hemorragia) de la enfermedad en un sujeto con respecto a un control. Así, la reducción puede ser una disminución del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, o cualquier porcentaje de disminución entre el 10 % y el 100 %, con respecto a niveles sin tratamiento previo o de control. Se entiende que reducir no se refiere necesariamente a una cura o ablación completa de la enfermedad, afección o síntoma(s) de la enfermedad o afección.

[0046] Como se usa en el presente documento, los términos potencian y potenciar se refieren a atenuar los efectos de una afección o procedimiento promoviendo o aumentando un parámetro con respecto al parámetro en un control. Así, en el procedimiento desvelado, potenciar puede referirse a un aumento del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 % en el resultado deseado de una afección o procedimiento. Por ejemplo, un procedimiento de potenciación de la coagulación se considera que es eficaz si hay un aumento del 10 % en uno o más síntomas o signos (por ejemplo, fortaleza de un coágulo de sangre) de la afección o procedimiento en un sujeto con respecto a un control. Así, la potenciación puede ser un aumento del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, o cualquier porcentaje de aumento entre el 10 % y el 100 % con respecto a niveles sin tratamiento previo o de control.

[0047] Por control se indica el mismo sujeto antes o después de cualquier efecto de CORM o un sujeto sin tratar diferente o promedio desconocido para sujetos sin tratar.

[0048] Los ejemplos a continuación pretenden ilustrar adicionalmente ciertos aspectos de las composiciones y compuestos descritos en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1. Efectos de los agentes liberadores de monóxido de carbono sobre la coagulación

Materiales y procedimientos

[0049] Para la experimentación se utilizó plasma normal reunido (George King Bio-Medical, Overland Park, KS) anticoagulado con citrato de sodio. Este lote de plasma tuvo un tiempo de protrombina de 12,7 segundos, un tiempo de tromboplastina parcial activada de 29,6 segundos y una concentración de fibrinógeno superior a 250 mg/dl. También se obtuvo plasma deficiente en factor XIII (FXIII) anticoagulado con citrato de sodio de George King Bio-Medical (Overland Park, KS).

[0050] Composición de la muestra de plasma. El volumen final para todas las mezclas de muestras de plasma posteriormente descritas fue 359,4 µl. La composición de la muestra consistió en 316 µl de plasma; 10 µl de factor tisular (0,1 % de concentración final en 0,9 % de NaCl; Diagnostica Stago, Asnières, Francia) o 1 % de Celite en 0,9 % de NaCl (0,28 mg/ml de concentración final), 3,6 µl de sulfóxido de dimetilo (DMSO) o DMSO con el dímero de

tricarbonildiclororutenio (II) (CORM-2, concentración final 100 μM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o DMSO con CORM-2 inactivada (iCORM-2, concentración final 100 μM), 10 μl de dH_2O y 20 μl de cloruro de calcio 200 mM ($CaCl_2$). La CORM-2 se inactivó disponiéndose en DMSO durante tres días hasta que la disolución cambió de una disolución amarilla a transparente, indicativo de completitud de la liberación de CO. Se eligió esta concentración de CORM-2 debido a que se esperaba que la concentración de CO liberado estuviera en los intervalos de medio a inferior usados en experimentos *ex vivo, in vitro* y basados en células previamente informados (Motterlini y col., Circ Res 90:e17-e24 (2002); Megias y col., Br J Pharm 150:977-986 (2007); Chlopicki y col., Cardiovasc Res 71:393-401 (2006); Dong y col., Eur J Pharmacol 590:99-104 (2008), que se incorporan por referencia en el presente documento en sus totalidades). Por tanto, se liberan 0,75 moles de CO de cada mol de CORM-2, con una semivida de liberación del CO de 1 minuto una vez dispuesto en disolución acuosa (pH = 7,4) a una temperatura de 37 ºC (Motterlini y col., Expert Opin Investig Drugs, 14:1305-1318 (2005), que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad). Mientras que la CORM-2 se descompone lentamente en DMSO, se añadió DMSO al compuesto seco justo antes de la colocación en la mezcla de plasma.

[0051] Análisis del modelo de duración del coágulo Se dispusieron mezclas de muestras de plasma en una copa desechable en un sistema de hemostasia THROMBELASTOGRAPH® controlado por ordenador (modelo 5000, Haemoscope Corp., Niles, IL), con adición de $CaCl_2$ como la última etapa para iniciar la coagulación. Los datos se recogieron durante 15 minutos, a medida que el plasma normal completa la formación de trombos dentro de este intervalo en este sistema (Dong y col., Eur J Pharmacol 590:99-104 (2008)). Las siguientes variables previamente descritas (Nielsen y col., Acta Anaesthesiol Scand 49:222-231 (2005) y Nielsen y col., Blood Coagul Fibrinolysis 17:75-81 (2006), que se incorporan por referencia en el presente documento en sus totalidades) se determinaron a 37 ºC: *Tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos* (TMVGT, el intervalo de tiempo (s) observado antes de la máxima velocidad de crecimiento del coágulo); *máxima velocidad de generación de trombos* (MVGT, la máxima velocidad de crecimiento del coágulo observada (dinas/cm^2/s); *generación total de trombos* (GTT, el área total bajo la curva de velocidad durante el crecimiento del coágulo (dinas/cm^2), que representa la cantidad de fortaleza del coágulo generado durante el crecimiento del coágulo).

[0052] Análisis estadísticos. Los datos se presentan como media ± DE. Todas las condiciones descritas se representaron con n=8 experimentos, ya que n=6-8 normalmente proporciona potencia estadística > 0,8 en análisis similares (Nielsen y col., Acta Anaesthesiol Scand 49:222-231 (2005) y Nielsen y col., Blood Coagul Fibrinolysis 17:75-81 (2006)). Los análisis de los efectos de CORM-2 y iCORM-2 sobre las variables tromboelastográficas se realizaron usando análisis unifactorial de la varianza con la prueba de Holm-Sidak usada para comparaciones a posteriori. La representación gráfica de los datos se generó con software comercialmente disponible (Origin 7.5, OriginLab Corp., Northampton, MA). Un valor de p de ≤ 0,05 se consideró significativo.

Resultados

[0053] Tras la activación del factor tisular, tanto la exposición a CORM-2 como a iCORM-2 potenció la coagulación, demostrado por una disminución significativa en el tiempo hasta la aparición de la coagulación, aumento en la velocidad de crecimiento del coágulo y aumento en la fortaleza del coágulo (Tabla 1). En particular, el plasma expuesto a CORM-2 tuvo una velocidad de crecimiento del coágulo superior al doble de la de las muestras sin exponer, mientras que las muestras expuestas a CORM-2 tuvieron una velocidad de crecimiento del coágulo superior al doble de la de las muestras sin exponer, mientras que muestras expuestas a iCORM solo tuvieron un aumento del 50 %. Con respecto a la fortaleza del coágulo también se observó este patrón jerárquico de CORM-2 expuesta > iCORM-2 expuesta > plasma sin exponer. Tras la activación de Celite, como se muestra en la Tabla 1, no hubo efecto sobre el tiempo de aparición de la coagulación, pero se observó el mismo patrón jerárquico de CORM-2 expuesta > iCORM-2 expuesta > plasma sin exponer cuando se consideraron la velocidad de formación del coágulo y la fortaleza del coágulo.

[0054] Con el fin de determinar si esta potenciación dependiente de la ruta común evidente de la coagulación era dependiente de FXIII, se activó plasma deficiente en FXIII con Celite y se expuso a CORM-2 y iCORM-2 en una tercera serie de experimentos. Como se observa en la Tabla 1 y la Figura 1, la velocidad de crecimiento del coágulo y la fortaleza del coágulo aumentaron significativamente con el mismo patrón observado en plasma normal (CORM-2 > iCORM-2 > vehículo de DMSO).

Tabla 1. Valores de coagulación tromboelastográfica en plasma normal y deficiente en FXIII

Plasma normal activado con TF			
	CORM-2 0 μM	**iCORM-2 100 μM**	**CORM-2 100 μM**
TMVGT (s)	188 ± 17	169 ± 12*	156 ± 13*
MVGT (dinas/cm^2/s)	4,1 ± 0,6	5,9 ± 0,5*	9,1 ± 0,9* †
GTT (dinas/cm^2)	164 ± 15	221 ± 20*	273 ± 21* †

Plasma normal activado con Celite			
	CORM-2 0 μM	**iCORM-2 100 μM**	**CORM-2 100 μM**
TMVGT (s)	202 ± 8	199 ± 4	188 ± 18
MVGT (dinas/cm^2/s)	8,8 ± 0,6	11,2 ± 0,5*	13,7 ± 1,3* †
GTT (dinas/cm^2)	158 ± 1,1	206 ± 10*	248 ± 17* †
Plasma deficiente en FXIII activado con Celite			
	CORM-2 0 μM	**iCORM-2 100 μM**	**CORM-2 100 μM**
TMVGT (s)	290 ± 18	282 ± 14	296 ± 13
MVGT (dinas/cm^2/s)	2,5 ± 0,3	5,0 ± 0,5*	9,1 ± 1,2* †
GTT (dinas/cm^2)	48 ± 7	117 ± 11*	163 ± 21* †

* P < 0,05 frente a CORM-2 0 μM; † P < 0,05 frente a iCORM-2 100 μM

Discusión

[0055] Tanto CO como la molécula de vehículo inactivada derivada de CORM-2 potencian la coagulación en plasma. Sin pretender limitarse por teoría, la potenciación de las interacciones trombina-fibrinógeno (y quizás la potenciación del fibrinógeno) parece ser el mecanismo primario responsable de los aumentos mediados por CORM-2 en la cinética de coagulación, basándose en los datos obtenidos con plasma deficiente en FXIII. En realidad, la adición de CORM-2 a plasma deficiente en FXIII fue equivalente al 100 % de sustitución de la actividad de FXIII con respecto a la potenciación de la cinética de coagulación. Por tanto, en condiciones de exposición a CO comúnmente utilizadas en una variedad de entornos experimentales, la exposición a CORM-2 produce velocidad notablemente potenciada de la formación y fortaleza de trombos.

[0056] Los datos tromboelastográficos muestran que la generación de trombina aumentada progresivamente con actividad del factor tisular progresivamente mayor acortó la aparición de la coagulación sin aumentar tanto la velocidad de crecimiento del coágulo como la fortaleza del coágulo en plasma normal. En realidad, la fortaleza del coágulo disminuyó con los aumentos progresivos de la generación de trombina en este modelo. Los datos descritos en el presente documento demostraron que las disminuciones mediadas por CORM-2 en el tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos solo se produjeron en muestras activadas con factor tisular, y el grado de disminución es mínimo en comparación con los cambios en la velocidad de formación y fortaleza de los coágulos del coágulo. Por tanto, la semivida de 1 minuto de la liberación de CO de CORM-2 probablemente produjo esencialmente todo el 75 μM de CO que es liberable por CORM-2 100 μM para estar presente cuando se observa la máxima velocidad de generación de trombos. Así, dada la disminución tanto ausente como mínima en el tiempo hasta la aparición de la coagulación acoplada a la sorprendente potenciación de la velocidad de crecimiento y fortaleza del coágulo, la CORM-2 aumentó la capacidad del fibrinógeno para polimerizarse por trombina de un modo similar a una molécula similar a FXIII.

Ejemplo 2. Efectos de agentes liberadores de monóxido de carbono sobre la fibrinólisis

Materiales y procedimientos

[0057] Se utilizó plasma normal reunido (George King Bio-Medical, Overland Park, KS) anticoagulado con citrato de sodio para la experimentación. El lote de plasma tuvo un tiempo de protrombina (TP) de 12,7 segundos, un tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) de 29,6 segundos y una concentración de fibrinógeno superior a 250 mg/dl. También se obtuvo plasma deficiente en factor XIII (FXIII) anticoagulado con citrato de sodio del mismo vendedor. Los siguientes tipos de plasma inmunoempobrecido se obtuvieron de Affinity Biologicals, Inc, (Ancaster, Ontario, Canadá): plasma deficiente (<0,5 ng/ml) en inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) con un TP de 14,3 segundos, un TTPa de 38,5 segundos y una concentración de fibrinógeno de 353 mg/dl; plasma deficiente (<0,01 U/ml) en inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (IFAT) con un TP de 10,5 segundos, un TTPa de 36,2 segundos y una concentración de fibrinógeno de 234 mg/dl; y, plasma deficiente en α_2-antiplasmina (<0,01 U/ml) con un TP de 10,0 segundos, un TTPa de 35,3 segundos y una concentración de fibrinógeno de 332 mg/dl.

[0058] Composición de la muestra de plasma. El volumen final para todas las mezclas de muestras de plasma posteriormente descritas fue 359,4 μl. La composición de la muestra consistió en 316 μl de plasma; 10 μl de factor tisular (0,1 % de concentración final en 0,9 % de NaCl; Diagnostica Stago, Asnières, Francia), 3,6 μl de sulfóxido de dimetilo (DMSO) o DMSO con CORM-2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o DMSO con CORM-2 inactivada (iCORM-2), 10 μl de activador del plasminógeno tipo tisular (tPA, 580 U/μg, Genentech, Inc., San Francisco, CA) diluido con tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 7,4) para una actividad final de 100 UI/ml, y 20 μl de $CaCl_2$ 200 mM. La CORM-2 se inactivó disponiéndose en DMSO durante tres días hasta que la disolución cambió de una disolución amarilla a transparente, indicativo de completitud de la liberación de CO. Se eligió esta concentración de CORM-2 debido a que se esperaba que la concentración de CO liberado estuviera en los intervalos de medio a inferior usados en experimentos *ex vivo, in vitro* y basados en células previamente informados (Motterlini y col. 2002;

Megias y col. 2007; Chlopicki y col. 2006; Dong y col. 2008). Por tanto, se liberan 0,75 moles de CO de cada mol de CORM-2, con una semivida de liberación del CO de 1 min una vez dispuesto en disolución acuosa a pH=7,4 a una temperatura de 37 ºC (Motterlini y col. 2005). Mientras que la CORM-2 se descompone lentamente en DMSO, se añadió DMSO al compuesto seco justo antes de la colocación en la mezcla de plasma. Posteriormente se presenta la serie específica de experimentos.

[0059] Relaciones de concentración-respuesta de CORM-2 y iCORM-2 con los parámetros del modelo de duración del coágulo (MDC). Plasma normal se expuso a CORM-2 0, 25, 50, 100 o 200 μM (n = 4 por concentración). Muestras de plasma adicionales se expusieron a iCORM-2 25, 50 ó 100 μM (n = 4 por concentración). Las muestras se sometieron a análisis de MDC como se describe posteriormente.

[0060] Comparación de los efectos de CORM-2 y iCORM-2 sobre los parámetros de MDC en plasma normal. Dados los resultados de los experimentos anteriormente mencionados, muestras de plasma normal adicionales se expusieron a 0 ó 100 μM de CORM-2 o iCORM-2 (n = 4 por condición de muestra adicional, n = 8 por condición para análisis finales). Las muestras se sometieron a análisis de MDC como se describe posteriormente.

[0061] Evaluación de los efectos de CORM-2 sobre los parámetros de MDC en plasmas deficientes en FXIII, PAI-1, IFAT y α_2-antiplasmina. Se realizaron estos experimentos para esclarecer las funciones desempeñadas por enzimas antifibrinolíticas durante la modulación de la fibrinólisis mediada por CORM-2. Muestras de los diversos plasmas deficientes se expusieron a 0 ó 100 μM de CORM-2 (n = 8 por condición). Las muestras se sometieron a análisis de MDC como se describe posteriormente.

[0062] Análisis del modelo de duración del coágulo. Como se describe en el Ejemplo 1, mezclas de muestras de plasma se dispusieron en una copa desechable en un sistema de hemostasia THROMBELASTOGRAPH® controlado por ordenador (modelo 5000, Haemoscope Corp., Niles, IL), con adición de $CaCl_2$ como la última etapa para iniciar la coagulación. Los datos se recogieron hasta que se produjo el tiempo de lisis del coágulo. Se determinaron las siguientes variables a 37 ºC: *Tiempo de crecimiento del coágulo* (TCC, tiempo desde la amplitud del coágulo de 2 mm [102 dinas/cm^2] hasta que se logra la máxima fortaleza, en s); *tiempo de lisis del coágulo* (TLC, tiempo desde cuando se observó la máxima fortaleza hasta la amplitud de 2 mm, en s); y *duración del coágulo* (DC, la suma de TCC y TLC). Se determinaron parámetros basados en el módulo elástico adicionales previamente descritos (Nielsen y col. 2006) y se muestran en la Figura 2. Además de la nomenclatura descrita en el Ejemplo 1, los siguientes términos se definen como sigue: *Tiempo hasta la máxima velocidad de lisis* (TMVL, el intervalo de tiempo (s) medido desde el tiempo de máximo fortaleza hasta el tiempo cuando la velocidad de disgregación del coágulo es máximo); *máxima velocidad de lisis* (MVL, la máxima velocidad de disgregación del coágulo observada (-dinas/cm^2/s)); *área de lisis del coágulo* (ACL, el área total bajo la curva de velocidad durante la disgregación del coágulo (-dinas/cm^2), que representa la cantidad de fortaleza del coágulo perdida durante la disgregación del coágulo). Como este modelo implica fibrinólisis completa, la GTT es equivalente al ACL, de manera que ACL no se presentó ya que no proporciona información adicional.

[0063] Análisis estadísticos. Los datos se presentan como la mediana (1º, 3º cuartiles). Todas las condiciones descritas se representaron con n = 8 experimentos, ya que n = 6-8 normalmente proporciona potencia estadística >0,8 en análisis similares (Ejemplo 1; Nielsen y col. 2005; Nielsen y col. 2006; Nielsen y col. 2004). Se realizaron análisis no lineales y lineales y ajuste de curva de los diversos efectos de las concentraciones de CORM-2 sobre variables del MDC con software comercialmente disponible (SigmaPlot 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA). Los análisis de los efectos de CORM-2 y iCORM-2 sobre las variables de MDC en plasma normal se realizaron con análisis unifactorial de Kruskal-Paredis de la varianza de órdenes, mientras que se usaron pruebas del orden de Mann-Whitney para evaluar los efectos de CORM-2 sobre las variables de MDC en los diversos tipos de plasma inmunoempobrecido/congénitamente deficiente (SigmaSta 3.1, Systat Software, Inc., San Jose, CA). La representación gráfica de los datos se generó con software comercialmente disponible (SigmaPlot 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA; CorelDRAW 12.0, Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Canadá; Origin 7.5, OriginLab Corp., Northampton, MA). Un valor de p de <0,05 se consideró significativo.

Resultados

[0064] Relaciones de concentración-respuesta de CORM-2 y iCORM-2 con parámetros de MDC. Como se muestra en las Figuras 3-5, CORM-2 potenció la aparición y velocidad de formación de trombos de un modo dependiente de la concentración. Además, la fortaleza del coágulo también aumentó por CORM-2 en un modo dependiente de la concentración. Con respecto a la fibrinólisis, CORM-2 atenuó significativamente la aparición de fibrinólisis y aumentó moderadamente la velocidad de fibrinólisis. La suma de estos efectos fue la potenciación de TCC, TLC y DC como se observa en la Figura 5. Las curvas específicas de parámetros de MDC que describen la relación entre la concentración de CORM-2 y la cinética de crecimiento/disgregación de trombos se muestran en la Tabla 2.

[0065] La exposición a iCORM produjo una notable potenciación de la fibrinólisis dependiente de la concentración. Los resultados de los experimentos con muestras de iCORM 100 μM se presentan en la Tabla 3.

[0066] Comparación de los efectos de CORM-2 y iCORM-2 sobre los parámetros de MDC en plasma normal. Como se muestra en la Figura 6 y la Tabla 3, CORM-2 100 μM disminuyó significativamente el tiempo hasta la aparición de la coagulación, potenció la velocidad de crecimiento (120 %) y fortaleza del coágulo (113 %) y retardó la aparición de fibrinólisis (258 %) en comparación con muestras no expuestas a CORM-2. La suma de estos acontecimientos cinéticos mediados por CORM-2 fue un aumento significativo en TCC (126 %), TLC (143 %) y DC (145 %) en comparación con plasma expuesto a CORM-2 0 μM. A diferencia, mientras que la exposición a iCORM-2 100 μM aumentó significativamente la velocidad de formación de trombos y fortaleza del coágulo en comparación con las muestras sin exponer, esta potenciación de la cinética de coagulación fue notablemente inferior a la observada con CORM-2. Además, la exposición a iCORM-2 disminuyó significativamente la aparición de fibrinólisis (el 46 %) y aumentó la velocidad de fibrinólisis (el 107 %), siendo el efecto de la suma una notable disminución en TLC y DC. Dados estos resultados, solo CORM-2 se utilizó en los experimentos posteriormente descritos para evaluar los efectos de CO sobre la fibrinólisis en ausencia de proteínas antifibrinolíticas clave.

[0067] Evaluación de los efectos de CORM-2 sobre los parámetros de MDC en plasmas deficientes en FXIII, PAI-1, IFAT y α_2-antiplasmina. Los efectos de CORM-2 sobre la formación/disgregación de trombos en los diversos plasmas deficientes se representan en las Figuras 7-10 y las Tablas 4-5. En plasma deficiente en FXIII (Tabla 4, Figura 7), al igual que en plasma normal, la exposición a CORM-2 potenció significativamente la velocidad de formación del coágulo, fortaleza del coágulo y prolongó la aparición de fibrinólisis en comparación con plasma sin exponer. A pesar de un aumento en MVL, muestras expuestas a CORM-2 tuvieron un TLC significativamente mayor. Tomados conjuntamente, la magnitud de la potenciación de la coagulación mediada por CORM-2 y la atenuación de la fibrinólisis en plasma deficiente en FXIII fue similar a la observada en plasma normal.

[0068] En plasma deficiente en PAI-1 (Tabla 4, Figura 8), los efectos de la exposición a CORM-2 sobre la velocidad de crecimiento del coágulo y fortaleza del coágulo fueron significativos, pero no tan notables como los observados en plasma normal. Similarmente, mientras que la aparición de fibrinólisis se aumentó significativamente por CORM-2 con una prolongación concomitante del TLC en plasma deficiente en PAI-1, estos cambios no fueron tan sorprendentes como los observados en plasma normal expuesto a CORM-2.

[0069] En plasma deficiente en IFAT (Tabla 5, Figura 9), la exposición a CORM-2 aumentó significativamente la velocidad de crecimiento y fortaleza de los trombos, pero a un grado mucho menor que el observado en plasma normal. Similarmente, las apariciones de fibrinólisis y TLC se prolongaron significativamente en plasma deficiente en IFAT por CORM-2, pero a un grado más pequeño que el observado en plasma normal. En resumen, pareció que PAI-1 e IFAT tuvieron importancia similar a la atenuación de la fibrinólisis mediada por CORM-2.

[0070] Finalmente, en plasma deficiente en α_2-antiplasmina (Tabla 5, Figura 10), la exposición a CORM-2 tuvo efectos muy limitados. Con respecto al crecimiento del coágulo, solo la velocidad de formación del coágulo aumentó significativamente el 35 %. En cuanto a la fibrinólisis, la exposición a CORM-2 prolongó significativamente el TLC solo el 23 %, sin ningún cambio significativo en TMVL. En general, DC aumentó significativamente solo el 14 % tras la exposición a CORM-2 en plasma deficiente en α_2-antiplasmina. Tomados conjuntamente, cuando estos datos se compararon con todos los otros tipos de plasma, los efectos mediados por CORM-2 sobre la cinética de formación/disgregación de coágulos fueron más dependientes de la actividad de α_2-antiplasmina que de cualquier otra proteína antifibrinolítica probada.

Tabla 2. Ecuaciones de ajuste de curva que describen la relación de parámetros de MDC con concentraciones de CORM-2.

Parámetro	Categoría de la ecuación	Ecuación
TMVGT	Exponencial modificada	$TMVGT=138+47,2^{(-0,06[CORM-2])}+0,07[CORM-2]$
MVGT	Sigmoide	$MVGT=295/(1+e^{-(([CORM-2]-24,0)/38,5)})$
GTT	Sigmoide	$GTT=295/(1+e^{-(([CORM-2]-15,6)/38,8)})$
TMVL	Sigmoide	$TMVL=1343/(1+e^{-(([CORM-2]-32,5)/11,4)})$
MVL	Regresión lineal	$MVL=-1,63-(0,002[CORM-2])$
TCC	Sigmoide	$TCC=488/(1+e^{-(([CORM-2]-14,8)/27,1)})$
TLC	Sigmoide	$TLC=1908/(1+e^{-(([CORM-2]-27,2)/20,8)})$
DC	Sigmoide	$DC=2397/(1+e^{-(([CORM-2]-25,0)/22,3)})$

TMVGT = tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos (s); MVGT = máxima velocidad de generación de trombos (dinas/cm^2/s); GTT = generación total de trombos (dinas/cm^2); TMVL = tiempo hasta la máxima velocidad de lisis (s); MVL = máxima velocidad de lisis (-dinas/cm^2/s); TCC = tiempo de crecimiento del coágulo (s); TLC = tiempo de lisis del coágulo (s); DC = duración del coágulo (s); [CORM-2] = μM de CORM-2 presente.

Tabla 3. Valores de MDC en plasma normal tras la a exposición CORM-2 o iCORM-2

	CORM-2 0 µM	CORM-2 100 µM	iCORM-2 100 µM
TMVGT	185 (182, 188)	155 (140, 172)*	185 (172, 200)†
MVGT	4,4 (4,0, 4,8)	9,7 (8,2, 11,1)*	5,3 (5,1, 5,5)*†
GTT	132 (126, 140)	281 (266, 290)*	156 (142, 168)*†
TMVL	340 (228, 402)	1218 (974, 1370)*	182 (168, 202)*†
MVL	-1,5 (-1,7, -1,3)	-1,9 (-2,2, -1,8)*	-3,1 (-3,4, -2,9)*†
TCC	225 (218, 232)	508 (490, 575)*	225 (210, 235)†
TLC	728 (582, 752)	1768 (1578, 2085)*	385 (368, 420)*†
DC	950 (787, 985)	2325 (2152, 2530)*	612 (582, 655)*†

Los datos se presentan como la mediana (1º, 3º cuartiles). *P<0,05 frente a CORM-2 0 µM, †P<0,05 frente a CORM-2 100 µM.

Tabla 4. MDC en plasma deficiente en FXIII y PAI-1 tras la exposición a CORM-2

	Plasma deficiente en FXIII		Plasma deficiente en PAI-1	
CORM-2	-	+	-	+
TMVGT	185 (178, 192)	195 (190, 205)	158 (145, 160)	160 (155, 168)
MVGT	1,1 (1,0, 1,2)	5,8 (4,8, 6,6)*	7,2 (6,8, 7,8)	9,4 (8,4, 10,2)*
GTT	39 (33, 43)	160 (130, 177)*	168 (152, 180)	228 (205, 242)*
TMVL	252 (242, 312)	855 (648, 1068)*	418 (330, 595)	750 (632, 775)*
MVL	-0,4 (-0,5, -0,4)	-1,0 (-1,2, -0,9)*	-2,0 (-2,6, -1,8)	-2,2 (-2,4, -1,8)
TCC	192 (175, 212)	820 (652, 908)*	290 (238, 358)	500 (438, 588)*
TLC	572 (505, 618)	1460 (1245, 1698)*	682 (568, 808)	1070 (905, 1210)*
DC	775 (682, 820)	2258 (962, 2660)*	1000 (790, 1170)	1565 (1410, 1780)*

Los datos se presentan como la mediana (1º, 3º cuartiles). + CORM-2 = concentración 100 µM. *P<0,05 frente a exposición a CORM-2.

Tabla 5. MDC en plasma deficiente en IFAT y α_2-antiplasmina tras la exposición a CORM-2

	Plasma deficiente en IFAT		Plasma deficiente en α_2-antiplasmina	
CORM-2	-	+	-	+
TMVGT	172 (168, 180)	175 (170, 185)	162 (160, 165)	160 (158, 162)
MVGT	4,3 (4,0, 4,4)	6,1 (5,9, 6,6)*	7,5 (7,1, 8,5)	10,1 (9,3, 10,3)*
GTT	100 (96, 104)	142 (140, 157)*	202 (191, 226)	231 (220, 250)
TMVL	415 (348, 435)	612 (592, 690)*	62 (58, 68)	68 (60, 82)
MVL	-1,3 (-1,4, -1,2)	-1,4 (-1,6, -1,3)	-10,4 (-11,2, -9,5)	-10,0 (-10,9, -9,3)
TCC	272 (240, 305)	410 (392, 458)*	175 (170, 192)	188 (175, 205)
TLC	662 (558, 718)	932 (912, 995)*	155 (155, 165)	190 (175, 210)*
DC	965 (790, 995)	370 (1320, 1450)*	332 (322, 355)	378 (348, 410)*

Los datos se presentan como la mediana (1º, 3º cuartiles). + CORM-2 = concentración 100 µM. *P<0,05 frente a exposición a CORM-2.

Discusión

[0071] CORM-2, en un modo dependiente de la concentración, potencia la formación del coágulo en plasma y atenúa la fibrinólisis. Estos fenómenos parecen accionarse por CO ya que, a diferencia de la potenciación de la coagulación observada con iCORM-2 en ausencia de tPA (Ejemplo 1), iCORM-2 parece, de alguna forma, potenciar la fibrinólisis mediada por tPA. Así, en un entorno fibrinolítico, es CO, y no la molécula de vehículo, la que es responsable del crecimiento del coágulo potenciado y la fibrinólisis atenuada. Esto es particularmente interesante, porque parece que CO y iCORM-2 modifican la formación de la matriz de coágulos en dos formas diferentes tanto potenciando la velocidad de formación como la fortaleza del coágulo, pero el CO solo convierte la matriz menos vulnerable a la fibrinólisis mediada por tPA.

[0072] Con respecto al (a los) mecanismo(s) por los que el CO atenúa la fibrinólisis, los datos indican que hay una jerarquía de importancia cuando se consideran las funciones desempeñadas por las proteínas antifibrinolíticas consideradas. Sin ligarse a teoría, los hallazgos sugieren que esencialmente no hubo función desempeñada por el FXIII, una función relativamente equivalente y moderada desempeñada por PAI-1 e IFAT, y una función crítica desempeñada por α_2-antiplasmina en la diminución de la fibrinólisis mediada por CORM-2.

Ejemplo 3. Efectos de agentes liberadores de monóxido de carbono sobre la formación de fibras de fibrina de diámetro grueso

Materiales y procedimientos

[0073] Protocolo de formación de trombos. Se utilizó plasma normal reunido (George King Bio-Medical, Overland Park, KS) anticoagulado con citrato de sodio para la experimentación. Como se describe en los Ejemplos 1 y 2, el lote de plasma tuvo un tiempo de protrombina (TP) de 12,7 segundos, un tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) de 29,6 segundos y una concentración de fibrinógeno superior a 250 mg/dl. También se obtuvo plasma deficiente en factor XIII (FXIII) anticoagulado con citrato de sodio del mismo vendedor. El volumen final para todas las mezclas de muestras de plasma posteriormente descritas fue 359,4 µl. La composición de la muestra consistió en 326 µl de plasma, 10 µl de factor tisular (0,1 % de concentración final en 0,9 % de NaCl; Diagnostica Stago, Asnières, Francia), 3,6 µl de sulfóxido de dimetilo (DMSO) o DMSO con CORM-2 (concentración final 100 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 20 µl de $CaCl_2$ 200 mM. Se eligió esta concentración de CORM-2 debido a que se esperaba que la concentración de CO liberado estuviera en los intervalos de medio a inferior usados en experimentos *ex vivo, in vitro* y basados en células previamente informados (Motterlini y col. 2002, Megias y col. 2007, Chlopicki y col. 2006). Por tanto, se liberan 0,75 M de CO de cada mol de CORM-2, con una semivida de liberación del CO de 1 min una vez dispuesto en disolución acuosa a pH=7,4 a una temperatura de 37 ºC (Motterlini y col. 2005). Se dispusieron mezclas de muestras de plasma en un tubo de plástico cerrado durante 15 min en un baño de agua a 37 ºC.

[0074] Preparación de muestras de microscopía electrónica y protocolo de examen. Tras la incubación de 15 min, los trombos se dispusieron en el fijador 2,5 % de glutaraldehído/1 % de paraformaldehído en tampón fosfato de Sorenson 0,1 M a pH 7,2 durante 3 días. Las porciones de las muestras se diseccionaron en secciones planas de 3 mm x 2 mm x 1 mm y se aclararon en dH_2O durante la noche (O/N). Las muestras se lavaron con dH_2O tres veces consecutivamente durante 10 min seguido de osmicación con 1 % de OsO_4 a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad durante 1,5 h. La osmicación se realizó para la penetración superficial y se procesó por empuje para la penetración interna en un microondas Pelco Biowave 80W (Redding, CA) durante 90 s en un ciclo de 3 minutos apagado seguido de 90 s encendido. Entonces, las muestras se aclararon tres veces en dH_2O seguido de una tinción con 1 % de acetato de uranilo en conjunto durante 4 horas a TA con tres aclarados posteriores en dH_2O. Las etapas de deshidratación en alcohol consistieron en 25 %, 50 %, 70 %, 95 %, 100 % (dos veces) y 2 deshidrataciones finales en óxido de propileno (OP). Todas las muestras se sometieron posteriormente a microondas a 150 W durante 45 s. Entonces, las muestras se infiltraron previamente con Polybed 812 (EMS, Hatfield, PA) a 1:1 de resina/OP, se sometieron a microondas durante 4,5 min a 350 W y luego se lavaron en OP. Entonces, las muestras se infiltraron de nuevo usando Polybed 812 fresco O/N en un rotador de tejidos. Las muestras se sometieron a otro lavado en OP, se expusieron a Polybed 812 fresco durante 6 horas y se dispusieron en un molde de incorporación y se polimerizaron a 65 ºC durante 18 horas. Las muestras se sacaron del horno, se enfriaron pasivamente hasta ta y se cortaron usando un cuchillo de diamante (Diatome Ultra EMS Hatfield, PA) sobre un ultramicrótomo (Leica Ultracut UCT, Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL). Las secciones se cortaron a 0,1 micrómetros de espesor y se dispusieron sobre rejillas de 100 de malla de cobre (EMS Hatfield, PA). Se adquirieron imágenes usando un JEOL 1200 TEM (Peabody, MA) usando una cámara digital AMT (Advanced Microscope Technologies, Danvers, MA). Se examinaron dos regiones de cada trombo, con fotografías de cada región tomadas a 5000; 15.000; 30.000; y 60.000 veces de aumento. Las fotos fueron representativas de múltiples vistas de cada región.

Resultados

[0075] Efectos de CORM-2 en plasma normal. La ultraestructura de trombos en plasma normal expuestos a tanto CORM-2 0 como 100 µM se representan a poco aumento en la Figura 11 y a gran aumento en la Figura 12. A poco aumento hubo una reducción en la formación de fibra gruesa tras la exposición a CORM-2. Al mayor aumento no hubo diferencia sorprendente en la arquitectura de fibra delgada observada. Estas observaciones también se hicieron en vistas de aumento intermedio.

[0076] Efectos de CORM-2 en plasma deficiente en FXIII. La ultraestructura de trombos en plasma deficiente en FXIII expuestos a tanto CORM-2 0 como 100 µM se representa a poco aumento en la Figura 13 y a gran aumento en la Figura 14. A poco aumento hubo una reducción en la formación de fibra gruesa acoplada con el potenciado contenido de fibra fina tras la exposición a CORM-2. La ultraestructura del trombo de plasma normal no expuesto a CORM-2 (Figura 11, panel A) pareció muy similar al coágulo de plasma deficiente en FXIII expuesto a CORM-2 (Figura 13, panel B). Al mayor aumento hubo un aumento en la arquitectura de fibra delgada observada en trombo en plasma deficiente en FXIII tras la exposición a CORM-2. Estas observaciones en deficiente en FXIII también se observaron en vistas de aumento intermedio.

Discusión

[0077] La exposición a CORM-2 atenúo la formación de fibra gruesa en tanto plasma normal como deficiente en

FXIII. Por tanto, CORM-2 potenció la formación de fibra fina en plasma deficiente en FXIII. Cuando se consideraron juntos, los cambios mediados por CORM-2 en el tipo de fibra explican las diferencias viscoelásticas observadas en los Ejemplos 1 y 2, dado que la formación de fibra fina potenció la fortaleza del coágulo y disminuyó la vulnerabilidad fibrinolítica. Los cambios mediados por CORM-2 en la formación de fibra fina fueron los más evidentes en plasma deficiente en FXIII, especialmente a gran aumento (Figura 14) con respecto a plasma normal (Figura 12). Estos datos mostraron que CORM-2/CO promovió un cambio en la ultraestructura del trombo de acuerdo con la potenciada velocidad de formación, elevada fortaleza y mejorada fortaleza fibrinolítica de trombos expuestos a CORM-2 como se describe en los Ejemplos 1 y 2.

Ejemplo 4. Efectos de agentes liberadores de monóxido de carbono sobre la velocidad de crecimiento de trombos y fortaleza en plasmas deficientes en hemofilia A, hemofilia B y factor VII

Materiales y procedimientos

[0078] Se obtuvo plasma deficiente (<1 % de actividad normal) en factor VIII (FVIII; 11 individuos), factor IX (FIX; 5 individuos) o factor VII (FVII; 4 individuos) de donantes anónimos (George King Bio-Medical, Overland Park, KS) y se anticoaguló con citrato de sodio. El volumen final para todas las mezclas de muestras de plasma posteriormente descritas fue 359,4 ml. La composición de la muestra consistió en 326 ml de plasma, 10 ml de factor tisular (0,1 % de concentración final en 0,9 % de NaCl; Diagnostica Stago, Asnières, Francia), 3,6 ml de sulfóxido de dimetilo (DMSO) o DMSO con CORM-2 (100 mmoles de concentración final; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y 20 ml de 200 mmoles de $CaCl_2$. Se eligió esta concentración de CORM-2 debido a que se esperaba que la concentración de monóxido de carbono liberada estuviera en los intervalos de medio a inferior usados en el Ejemplo 1 y experimentos *ex vivo, in vitro* y basados en células previamente informados (Motterlini y col. 2002; Megias y col. 2007; Chlopicki y col. 2006). Por tanto, se liberan 0,75 moles de monóxido de carbono de cada mol de CORM-2, con una semivida de liberación del monóxido de carbono de 1 min una vez dispuesto en disolución acuosa a pH=7,4 a una temperatura de 37 ºC (Motterlini y col. 2005). Mientras que la CORM-2 se descompone lentamente en DMSO, se añadió DMSO al compuesto seco justo antes de la colocación en la mezcla de plasma.

[0079] Se dispusieron mezclas de muestras de plasma en una copa desechable en un sistema de hemostasia THROMBELASTOGRAPH® controlado por ordenador (modelo 5000; Haemoscope Corp., Niles, IL), con adición de $CaCl_2$ como la última etapa para iniciar la coagulación. Los datos se recogieron hasta que la fortaleza del coágulo se estabilizó (amplitud máxima). Las siguientes variables descritas en el Ejemplo 1 se determinaron a 37 ºC: *Tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos* (TMVGT, el intervalo de tiempo (s) observado antes de la máxima velocidad de crecimiento del coágulo); *máxima velocidad de generación de trombos* (MVGT, la máxima velocidad de crecimiento del coágulo observada (dinas/cm^2/s)); *generación total de trombos* (GTT, el área total bajo la curva de velocidad durante el crecimiento del coágulo (dinas/cm^2), que representa la cantidad de fortaleza del coágulo generado durante el crecimiento del coágulo).

[0080] Análisis estadísticos. Cada respuesta de parámetro tromboelastográfica individual a la exposición a CORM-2 se mostró gráficamente, y los datos derivados de la cohorte deficiente en FVIII también se presentaron como media ± DE. Se uso una prueba de la t de Student para datos emparejados para analizar los efectos de la exposición a CORM-2 en individuos deficientes en FVIII. Se presentaron los resultados de los grupos deficientes en FIX y FVII, pero no se analizaron estadísticamente secundarios al pequeño número de individuos en cada cohorte. Adicionalmente, los datos se compararon con resultados obtenidos con plasma normal reunido (George King Bio-Medical) bajo circunstancias experimentales idénticas (Ejemplo 1). El lote de plasma tuvo un tiempo de protrombina de 12,7 s, un tiempo de tromboplastina parcial activada de 29,6 s y una concentración de fibrinógeno superior a 250 mg/dl. Los análisis estadísticos y la representación gráfica de los datos se generaron con software comercialmente disponible (SigmaPlot 11.0; Systat Software Inc., San Jose, California; CorelDRAW 12.0; Corel Corp., Ottawa, Ontario, Canadá). Un valor de p inferior a 0,05 se consideró significativo.

Resultados

[0081] Efectos de moléculas liberadoras de monóxido de carbono-2 en plasma deficiente en factor VIII. No hubo diferencia significativa en valores de TMVGT entre muestras expuestas a 0 mmoles (4,3 ± 2,2 min) y 100 mmoles (4,0 ± 2,3 min) de CORM-2. Sin embargo, los valores de MVGT aumentaron de 2,7 ± 1,4 dinas/cm^2/s en muestras no expuestas a CORM-2 a 5,0 ± 2,7 dinas/cm^2/s después de la exposición a 100 mmoles de CORM-2. Los valores de GTT aumentaron de 156 ± 46 dinas/cm^2 en muestras no expuestas a CORM-2 a 232 ± 56 dinas/cm^2 después de la exposición a 100 mmoles de CORM-2. Las respuestas individuales a la exposición a CORM-2 se muestran en la Fig. 15. CORM-2 potenció la velocidad de formación y fortaleza de los coágulos.

[0082] Efectos de la molécula liberadora de monóxido de carbono-2 en plasma deficiente en factor IX. Como se muestra en la Fig. 16, la exposición a CORM-2 disminuyó el valor de TMVGT de cinco muestras individuales de plasma probadas. Con respecto a MVGT, cuatro de cinco individuos tuvieron un aumento en la velocidad de formación del coágulo tras la exposición a CORM-2, pero un individuo demostró una pequeña disminución en MVGT. Todas las muestras de plasma individuales demostraron un aumento en GTT tras la exposición a CORM-2.

[0083] Efectos de la molécula liberadora de monóxido de carbono-2 en plasma deficiente en factor VII. Como se representa en la Fig. 17, la exposición a CORM-2 produjo un aumento en TMVGT en todos los individuos probados. En cambio, la exposición a CORM-2 produjo un aumento en MVGT y GTT en todos los donantes deficientes en plasma en FVII. Así, la exposición a CORM-2 retardó paradójicamente la aparición de la máxima velocidad de crecimiento del coágulo pero, sin embargo, potenció la velocidad de formación y fortaleza de los coágulos.

Discusión

[0084] CORM-2 potenció la coagulación en plasma obtenido de donantes anónimos deficientes en FVIII, FIX y FVII. Al igual que con plasma normal o deficiente en factor XIII (Ejemplo 1), CORM-2 potenció la velocidad de formación y fortaleza de plasma deficiente en FVIII, FIX y FVII. Además de servir de 'prueba de concepto' de que CORM-2 podría usarse como agente hemostático para tratar hemorragia relacionada con hemofilia, estos datos respaldaron la conclusión de que el monóxido de carbono/CORM-2 modifica el fibrinógeno antes de la polimerización mediada por trombina. La CORM-2 libera monóxido de carbono con una semivida de 1 min, y como se observa en las Figuras 15-17, la potenciación de la velocidad de formación y aumento en la fortaleza asociados a CORM-2 se produjeron más de 20 semividas después de la exposición al compuesto. Dado que el monóxido de carbono difunde rápidamente a través del plasma, estos datos respaldan el concepto de que el monóxido de carbono liberado de CORM-2 modifica el fibrinógeno para mejorar la cinética de coagulación. En resumen, CORM-2 generalmente mejoró la velocidad de formación y fortaleza en los plasmas deficientes probados.

Ejemplo 5. Efectos de agentes liberadores de monóxido de carbono en plasma de rata y conejo

Materiales y procedimientos

[0085] Dos conjuntos de dos ratas macho no consanguíneas Sprague Dawley se anestesiaron con ketamina y xilazina y se extrajo sangre mediante punción cardíaca, se reunió en dos lotes y se anticoaguló 1:9 con 3,2 % de citrato de sodio. Dos conejos blancos de Nueva Zelanda macho se sedaron con acepromazina y se recogió sangre mediante la artería central de la oreja y se anticoaguló similarmente. La sangre se centrifugó a 3000xg durante 15 min, y el plasma se guardó en dos lotes hasta que se analizó. El volumen final para mezclas de muestras de plasma tromboelastográficas fue 359,6 µl. La composición de la muestra consistió en 316 µl de plasma; 10 µl de reactivo de factor tisular (0,1 % de concentración final en dH_2O; Instrumentation Laboratory, Lexington, MA); 10 µl de dH_2O o activador del plasminógeno tipo tisular (tPA, 580 U/µg, Genentech, Inc., San Francisco, CA) para una actividad final de 2000 U/ml para plasma de rata o 300 UI/ml para plasma de conejo; 3,6 µl de sulfóxido de dimetilo (DMSO) o DMSO con CORM-2 (concentración final 100 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); y 20 µl de $CaCl_2$ 200 mM. La actividad de tPA para cada especie se determinó con datos piloto para obtener la lisis reproducible en el plazo de 15 min. No hubo lisis apreciable en plasma de rata a 100, 300 o 1000 U/ml de tPA. Se dispusieron mezclas de muestras de plasma en una copa desechable en un sistema de hemostasia THROMBELASTOGRAPH® controlado por ordenador (modelo 5000, Haemoscope Corp., Niles, IL), con adición de $CaCl_2$ como la última etapa para iniciar la coagulación. En experimentos sin tPA se recogieron datos hasta que la fortaleza del coágulo (máxima amplitud) fue estable. En experimentos con tPA, los datos derivados de las segundas muestras de plasma de conejo se recogieron durante 60 min mientras que los datos obtenidos con las segundas muestras de plasma de rata se recogieron durante 15 min. Las variables tromboelastográficas se determinaron a 39 ºC como se describe previamente en los Ejemplos 1, 2 y 4. Los datos se compararon estadísticamente con la prueba de la t de Student para datos independientes.

Resultados

[0086] Como se muestra en la Tabla 6, la exposición a CORM-2 aumentó significativamente la velocidad de formación y fortaleza de los coágulos en plasma de rata y conejo con o sin adición de tPA. Con respecto a la lisis, la exposición a CORM-2 inhibió completamente la lisis en plasma de rata. A diferencia, la exposición a CORM-2 prolongó significativamente la aparición de lisis y disminuyó significativamente la tasa de lisis en plasma de conejo. Un par representativo de tromboelastogramas con y sin la exposición a CORM-2 en plasma de rata y conejo tras la adición de tPA se muestra en la Figura 18.

Tabla 6. Valores tromboelastográficos en plasma de rata y conejo

	CORM-2 0 µM	CORM-2 100 µM	Cambio de porcentaje
Rata (n=4 experimentos, sin tPA)			
TMVGT	1,5±0,0	1,5 ± 0,1	0 %
MVGT	11,4 ± 0,7	14,7 ± 0,6*	29 %
GTT	188 ± 6	230 ± 6*	23 %
Conejo (n=7 experimentos, sin tPA)			
TMVGT	2,7 ± 0,4	2,8 ± 0,1	5 %
MVGT	9,5 ± 1,1	13,9 ± 2,9*	46 %
GTT	232 ± 29	290 ± 35*	25 %

	CORM-2 0 µM	CORM-2 100 µM	Cambio de porcentaje
Rata (n=4 experimentos, 2000 U/ml de tPA)			
TMVGT	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,1	0 %
MVGT	11,4 ± 0,7	14,7 ± 0,6*	29 %
GTT	188 ± 6	230 ± 6*	23 %
TMVL	0,9 ± 0,0	Sin lisis	-----
MVL	-11,2 ± 1,0	0,0 ± 0,0*	-100 %
ACL	117 ± 11	0 ± 0*	-100 %
Conejo (n=4 experimentos, 300 U/ml de tPA)			
TMVGT	2,5 ± 0,0	2,8 ± 0,1*	8 %
MVGT	9,4 ± 0,3	14,2 ± 1,4*	52 %
GTT	109 ± 2	237 ± 8*	118 %
TMVL	1,2 ± 0,0	2,6 ± 0,5*	110 %
MVL	-6,6 ± 0,2	-2,5 ± 0,4*	-63 %
ACL	101 ± 2	196,3 ± 25*	94 %

Los datos se presentan como media ± DE. TMVGT = tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos (min); MVGT = máxima velocidad de generación de trombos (dinas/cm^2/s); GTT = generación total de trombos (dinas/cm^2); TMVL = tiempo hasta la máxima velocidad de lisis (min); MVL = máxima velocidad de lisis (-dinas/cm^2/s); ACL = área bajo la curva de la lisis (-dinas/cm^2). *P<0,05 frente a CORM-2 0 µM.

[0087] En conclusión, tanto el plasma de rata como de conejo mostró tanto respuestas procoagulantes como antifibrinolíticas a la exposición a CORM-2. La respuesta plasmática del conejo a CORM-2 en presencia de tensión fibrinolítica fue más similar a la observada con seres humanos (Ejemplo 2) con respecto a la respuesta observada en plasma de rata.

Ejemplo 6. Efectos de agentes liberadores de monóxido de carbono en muestras de plasma recogidas de sujetos expuestos a warfarina

Materiales y procedimientos

[0088] Se utilizó plasma normal reunido (George King Bio-Medical, Overland Park, KS) anticoagulado con citrato de sodio para la experimentación. El lote de plasma tuvo un tiempo de protrombina de 12,8 segundos, valor de relación normalizada internacional (RNI) de 1,0, un tiempo de tromboplastina parcial activada de 29,4 segundos y una concentración de fibrinógeno de 310 mg/dl. El plasma anticoagulado con citrato de sodio procurado de donantes anónimos tratados con warfarina también se obtuvo del mismo vendedor. En la primera serie de experimentos que implican la exposición de plasma a CORM-2 sin exposición simultánea a activador del plasminógeno tipo tisular (tPA, 580 U/µg, Genentech, Inc., San Francisco, CA), los valores de RNI de las muestras de donante fueron 1,5, 1,9 (2 donantes), 2,0 (2 donantes), 2,1, 2,2 (2 donantes), 2,4, 3,6, 4,0 y 5,4. En la segunda serie de experimentos que implican exposición a tPA, los valores de RNI de muestras de plasma fueron 1,5, 2,0 (2 donantes), 2,1, 2,4, 3,6, 4,0 y 5,4.

[0089] Composición de la muestra de plasma de experimentos sin adición de tPA. El volumen final para todas las mezclas de muestras de plasma posteriormente descritas fue 359,6 µl. La composición de la muestra consistió en 326 µl de plasma, 10 µl de reactivo de factor tisular (0,1 % de concentración final en dH_2O; Instrumentation Laboratory, Lexington, MA), 3,6 µl de sulfóxido de dimetilo (DMSO) o DMSO con CORM-2 (concentración final 100 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 20 µl de 200 mM $CaCl_2$. La disolución madre de factor tisular se mantuvo sobre hielo antes de uso y se volvió a preparar cada dos horas. La concentración de CORM-2 usada fue la asociada al máximo efecto sobre la coagulación y fibrinólisis en este sistema (Ejemplo 2). Se añadió DMSO a CORM-2 seca justo antes de la colocación en la mezcla de plasma. Se realizaron seis experimentos por duplicado con plasma normal reunido con o sin CORM-2 añadida, mientras que el plasma obtenido de los sujetos tratados con warfarina se sometió a experimentos individuales con o sin la exposición a CORM-2.

[0090] Composición de la muestra de plasma de experimentos con adición de tPA. Como en la serie de experimentos sin adición de tPA, el volumen final de mezclas de muestras de plasma fue 359,6 µl. La composición de la muestra consistió en 316 µl de plasma; 10 µl de reactivo de factor tisular (0,1 % de concentración final); 3,6 µl de DMSO sin o con CORM-2 (concentración final 100 µM); 10 µl de tPA diluido con tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 7,4) para una actividad final de 100 UI/ml; y 20 µl de $CaCl_2$ 200 mM. Al igual que con el reactivo de factor tisular, la disolución madre de tPA se mantuvo sobre hielo antes de uso y se volvió a preparar cada dos horas. Se realizaron seis experimentos por duplicado con plasma normal reunido con o sin CORM-2 añadida, mientras que el plasma obtenido de sujetos tratados con warfarina se sometió a experimentos individuales con o sin exposición a CORM-2.

[0091] Análisis del modelo de duración del coágulo. Se dispusieron mezclas de muestras de plasma en una copa desechable en un sistema de hemostasia THROMBELASTOGRAPH® controlado por ordenador (modelo 5000, Haemoscope Corp., Niles, IL), con adición de $CaCl_2$ como la última etapa para iniciar la coagulación. En la primera serie de experimentos no se añadió tPA y se recogieron datos hasta que la fortaleza del coágulo (máxima amplitud) fue estable. En la segunda serie de experimentos en la que se añadió tPA se recogieron datos hasta que se produjo el tiempo de lisis del coágulo. Se determinaron las siguientes variables a 37 ºC dependiendo de si tPA estaba o no presente en la mezcla de reacción: *Tiempo de crecimiento del coágulo* (TCC, tiempo desde la amplitud del coágulo de 2 mm [102 dinas/cm^2] hasta que se logra la máxima fortaleza, en s), *tiempo de lisis del coágulo* (TLC, tiempo desde cuando se observó la máxima fortaleza hasta la amplitud de 2 mm, en s) y *duración del coágulo* (DC, la suma de TCC y TLC). Se determinaron parámetros basados en el módulo elástico adicionales previamente descritos en los Ejemplos 1-4. La nomenclatura usada para describir estos fenómenos es la siguiente: *Tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos (TMVGT):* Éste es el intervalo de tiempo (s) observado antes de la máxima velocidad de crecimiento del coágulo. *Máxima velocidad de generación de trombos (MVGT):* Ésta es la máxima velocidad de crecimiento del coágulo observada (dinas/cm^2/s). *Generación total de trombos (GTT):* Ésta es el área total bajo la curva de velocidad durante el crecimiento del coágulo (dinas/cm^2), que representa la cantidad de fortaleza del coágulo generado durante el crecimiento del coágulo. *Tiempo hasta la máxima velocidad de lisis (TMVL):* Éste es el intervalo de tiempo (s) medido desde el tiempo de máxima fortaleza hasta el tiempo cuando la velocidad de disgregación del coágulo es máximo. *Máxima velocidad de lisis (MVL):* Éste es la máxima velocidad de disgregación del coágulo observado (-dinas/cm^2/s). *Área de lisis del coágulo (ACL):* Ésta es el área total bajo la curva de velocidad durante la disgregación del coágulo (-dinas/cm^2), que representa la cantidad de fortaleza del coágulo perdida durante la disgregación del coágulo. Como este modelo implica fibrinólisis completa, la GTT es equivalente al ACL, de manera que ACL no se presentó ya que no proporciona información adicional.

[0092] Análisis estadísticos. Los datos obtenidos de plasma normal reunido se presentan como media ± DE. Los análisis de los efectos de CORM-2 sobre las variables tromboelastográficas obtenidas de plasma normal reunido se realizaron usando pruebas de la t de Student para datos independientes bilaterales. Un valor de p de <0,05 se consideró significativo. La representación gráfica de los datos tromboelastográficos derivados de plasma de sujetos tratados con warfarina se generó con software comercialmente disponible (SigmaPlot 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA). No se realizaron análisis estadísticos de datos obtenidos de sujetos tratados con warfarina dados los múltiples valores de RNI probados.

Resultados

[0093] Experimentos sin adición de tPA. Como se muestra en la Tabla 7, la exposición de plasma normal a CORM-2 disminuyó el tiempo hasta la máxima velocidad de crecimiento del coágulo, aumentó la tasa del crecimiento del coágulo y aumentó la fortaleza del coágulo. El valor medio para cada parámetro derivado de este conjunto de datos se representa por una barra horizontal en la Figura 19.

[0094] Los datos derivados de sujetos con valores de RNI de 1,5-5,4 se muestran en la Figura 19. En el panel A, la exposición a CORM-2 se asoció a cambios en TMVGT del -50 % al 20 % de valores del nivel inicial. De interés, todos los valores de TMVGT fueron superiores a los valores medios de plasma normal. En el panel B, todos excepto un sujeto (RNI 1,5) tuvieron un aumento en MVGT del 40 % al 577 % de valores del nivel inicial. Se obtuvieron resultados casi idénticos del sujeto con RNI 1,5 cuando se probó una segunda muestra de plasma. Aunque estos aumentos fueron impresionantes, es importante observar que solo un sujeto (RNI 2,2) tuvo un aumento en el valor de MVGT secundario a la exposición a CORM-2 que fue similar al observado con plasma normal. Como se muestra en el panel C, la exposición a CORM-2 aumentó los valores de GTT en todos, excepto un sujeto (RNI 1,5), con valores elevados del 42 % al 180 % de valores del nivel inicial. A diferencia de los datos de MVGT, la mayoría de los sujetos tuvo un aumento de normal a supernormal en la fortaleza del coágulo en respuesta a la exposición a CORM-2.

[0095] Experimentos con adición de tPA. En presencia de tPA, CORM-2 no disminuyó significativamente TMVGT, pero aumentó MVGT y GTT de un modo similar al observado en ausencia de tPA (Tabla 7). El tiempo hasta la aparición de la máxima velocidad de lisis aumentó con CORM-2, mientras que paradójicamente la máxima velocidad de lisis también se potenció. Sin embargo, todas las fases de la duración del coágulo aumentaron por la exposición a CORM-2, produciendo un trombo de mayor vida. Al igual que con el conjunto de datos previo, el valor medio para cada parámetro derivado de plasma normal expuesto a tPA se representa por una barra horizontal en las Figuras 20-22.

[0096] Como se observa en la Figura 20, panel A, los valores de TMVGT variaron del -10 % al 6 % de los valores del nivel inicial tras la exposición a CORM-2, superando los valores de todos los sujetos tratados con warfarina los valores medios en plasma normal. Como se muestra en el panel B, todos los sujetos (incluyendo aquel con RNI 1,5) tuvieron un aumento en los valores de MVGT del 30 % al 116 % de los valores del nivel inicial en respuesta a la exposición a CORM-2. Sin embargo, en todos los casos, los valores en plasma del sujeto para MVGT fueron inferiores a los observados con plasma normal. Con respecto a la fortaleza del coágulo, como se observa en el panel B, todos los sujetos tuvieron un aumento del 94 % al 161 % de los valores del nivel inicial en respuesta a la adición

de CORM-2. Finalmente, 4 de 8 sujetos (RNI 1,5, 2,0, 2,1) tuvieron un aumento en la fortaleza del coágulo después de la exposición a CORM-2 que superó el valor medio de plasma normal.

[0097] Con respecto a los cambios mediados por CORM-2 en fibrinólisis, como se observa en la Figura 21, panel A, todos los sujetos tuvieron un retardo en la aparición de la máxima velocidad de fibrinólisis, aumentando los valores del 60 % al 242 % en comparación con el nivel inicial. Sin embargo, todos excepto un sujeto (RNI 2,1) tuvieron valores de TMVL muy por debajo de aquellos del plasma normal, indicativo de fibrinólisis potenciada. Similarmente, como se muestra en el panel B, la MVL se potenció en todos los sujetos con valores elevados del 11-181 % de los valores del nivel inicial. En general, los valores de MVL de plasma del sujeto fueron superiores a plasma normal.

[0098] En cuanto a los parámetros de la duración del coágulo, como se observa en la Figura 22, panel A, el tiempo de crecimiento del coágulo se prolongó del 84 % al 184 % de los valores del nivel inicial tras la adición de CORM-2. Cinco de ocho sujetos (RNI 1,5, 2,0, 2,1, 4,0, 5,4) tuvieron un aumento superior al normal en TCC en respuesta a CORM-2. Con respecto al tiempo de lisis del coágulo, la exposición a CORM-2 aumentó los valores en plasma del sujeto del 74 % al 149 % del nivel inicial; sin embargo, solo un sujeto (RNI 2,1) tuvo una respuesta a CORM-2 que superó el valor medio del plasma normal. La duración del coágulo aumentó en todos los sujetos con la exposición a CORM-2 como se muestra en el panel C. Todos excepto un sujeto (RNI 2,1) tuvieron un valor de DC superior al observado con plasma normal.

Tabla 7. Valores tromboelastográficos en plasma normal tras la exposición a CORM-2.

	CORM-2 0 µM	CORM-2 100 µM	Porcentaje de cambio
Sin tPA			
TMVGT	2,38 ± 0,05	2,26 ± 0,03*	-5 %
MVGT	7,4 ± 0,5	15,0 ± 2,4*	102 %
GTT	168 ± 6	285 ± 38*	70 %
tPA (100 U/ml)			
TMVGT	2,20 ± 0,07	2,14 ± 0,05	-2 %
MVGT	7,7 ± 0,6	15,2 ± 1,3*	97 %
GTT	138 ± 5	284 ± 27*	106 %
TMVL	11,27 ± 2,10	22,92 ± 1,93*	103 %
MVL	-1,4 ± 0,3	-2,4 ± 0,5*	68 %
TCC	4,42 ± 1,05	7,00 ± 0,94*	58 %
TLC	16,02 ± 2,46	32,07 ± 3,15*	100 %
DC	20,43 ± 2,73	39,07 ± 2,82*	91 %

Los datos se presentan como media ± DE. tPA = activador del plasminógeno tipo tisular; TMVGT = tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos (min); MVGT = máxima velocidad de generación de trombos (dinas/cm^2/s); GTT = generación total de trombos (dinas/cm^2); TMVL = tiempo hasta la máxima velocidad de lisis (min); MVL = máxima velocidad de lisis (-dinas/cm^2/s); TCC = tiempo de crecimiento del coágulo (min); TLC = tiempo de lisis del coágulo (min); DC = duración del coágulo (min). *P<0,005 frente a CORM-2 0 µM.

Discussion

[0099] La exposición a CORM-2 potenció la coagulación y disminuyó la vulnerabilidad fibrinolítica en plasma obtenida de sujetos crónicamente anticoagulados con warfarina. Con respecto a la coagulación en muestras obtenidas de estos sujetos, la exposición a CORM-2 tuvo el mayor efecto sobre la fortaleza del coágulo y tiempo de crecimiento, con efectos positivos pero menores sobre la velocidad de crecimiento del coágulo, aparición de lisis y tiempo de lisis del coágulo. La tasa de lisis aumentó en plasma normal por CORM-2 como se describe en el Ejemplo 2, sugiriendo que, cuando las defensas antifibrinolíticas son finalmente atravesadas, las relaciones tridimensionales de polímeros de fibrina favorecen la disgregación mediada por plasmina. Sin embargo, en plasma de sujeto normal y anticoagulado, el aumento mediado por CORM-2 en la fortaleza del coágulo y prolongación de la aparición de fibrinólisis mediante eficiencia mejorada de enzimas antifibrinolíticas (por ejemplo, inhibidor del activador del plasminógeno 1) pareció compensar los efectos de la elevada MVL como se muestra en el Ejemplo 2. Los valores de TMVL y TLC de sujetos tratados con warfarina fueron relativamente más pequeños que los valores de plasma normal. La exposición a CORM-2 mejoró la coagulación y atenuó la fibrinólisis en plasma obtenido de sujetos tratados con warfarina, pero estos efectos fueron generalmente de menos magnitud que los observados en plasma normal.

Ejemplo 7. Efectos de agentes liberadores de monóxido de carbono sobre la cinética de coagulación dependiente de fibrinógeno y la actividad de protrombina

Materiales y procedimientos

[0100] Tipos de plasma, proteínas purificadas y compuestos. Se utilizó plasma deficiente en protrombina (George King Bio-Medical, Overland Park, KS) anticoagulado con citrato de sodio para la experimentación referente a los efectos de CORM-2 sobre la protrombina. La protrombina purificada (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN) que tuvo el 95 % de pureza (10,4 mg/ml, 11,1 U/mg, suspensa en Tris-HCl 20 mM en NaCl 0,1 M a pH 7,4) se usó para la experimentación. Se usó plasma deficiente en fibrinógeno (Affinity Biologicals, Inc., Ancaster, Ontario, Canadá) anticoagulado con citrato de sodio en experimentos que investigaban los efectos de CORM-2 sobre el fibrinógeno. Este plasma tuvo una concentración de fibrinógeno de 15 mg/dl, una actividad de protrombina de 0,91 U/ml, un tiempo de protrombina de >120 s y un tiempo de tromboplastina parcial activada de >180 s. El fibrinógeno purificado (Enzyme Research Laboratories), que fue el >95 % coagulable a una concentración de 43,5 mg/ml (disuelto en citrato de sodio 20 mM-HCl a pH 7,4), se utilizó en experimentos con plasma deficiente en fibrinógeno. La CORM-2 y el sulfóxido de dimetilo (DMSO) se obtuvieron de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

[0101] Exposición de protrombina purificada a CORM-2. Con el fin de determinar si la exposición previa de protrombina a CORM-2 potenciaría la cinética de coagulación en plasma deficiente en protrombina, 396 µl de disolución de protrombina pura se combinaron con 4 µl de tanto DMSO como CORM-2 en DMSO para una concentración final de CORM-2 0 ó 100 µM. Esta disolución se incubó durante 5 min a 37 ºC antes de añadirse a plasma deficiente en protrombina para análisis tromboelastográficos. Un volumen de 3,1 µl de disolución incubada se añadió a la mezcla de reacción final posteriormente presentada para una actividad de protrombina final de 1 U/ml. La concentración final de CORM-2 en la muestra de mezcla de plasma fue <10 µM, una concentración que no afecta los valores de la cinética de coagulación en este sistema (Ejemplos 1 y 2).

[0102] Exposición de fibrinógeno purificado a CORM-2. Iban a realizarse experimentos con exposición previa de fibrinógeno purificado a CORM-2 de un modo similar al descrito con protrombina. Sin embargo, la CORM-2 en DMSO no era soluble ni en disolución de fibrinógeno puro ni en disolución de fibrinógeno diluida hasta tres veces. La CORM-2 añadida formó un precipitado blanco-amarillo bajo estas condiciones. Por tanto, se generó una relación de concentración-respuesta entre diversas concentraciones de fibrinógeno con o sin la adición de CORM-2 como se expone brevemente posteriormente.

[0103] Experimentos de plasma deficiente en protrombina. El volumen final para los experimentos que implican plasma deficiente en protrombina fue 359,1 - 360,7 µl. En experimentos que implican la exposición previa de protrombina a CORM-2 0 ó 100 µM (n=7 por concentración), la muestra consistió en 326 µl de plasma deficiente en protrombina, 3,1 µl de disolución de protrombina, 10 µl de reactivo de factor tisular (0,1 % de concentración final en dH_2O; Instrumentation Laboratory, Lexington, MA) y 20 µl de $CaCl_2$ 200 mM. En experimentos que implican la simple adición de CORM-2 (control positivo) a los reactantes, la mezcla de muestra consistió en 324 µl de plasma deficiente en protrombina, 3,1 µl de disolución de protrombina, 3,6 µl de DMSO o CORM-2 en DMSO (concentración de CORM-2 final 0 ó 100 µM, n=8 por concentración), 10 µl de reactivo de factor tisular (0,1 % de concentración final) y 20 µl de $CaCl_2$ 200 mM.

[0104] Experimentos de plasma deficiente en fibrinógeno. En estos experimentos, el volumen de mezcla de muestras de plasma final fue 358,6 µl. La composición de la muestra consistió en 260 µl de plasma deficiente en fibrinógeno, 65 µl de disolución de fibrinógeno puro y dH_2O para generar concentraciones de fibrinógeno discretas posteriormente descritas, 3,6 µl de DMSO o CORM-2 en DMSO (concentración de CORM-2 final 0 ó 100 µM, n=4 por concentración de fibrinógeno), 10 µl de reactivo de factor tisular (0,1 % de concentración final) y 20 µl de $CaCl_2$ 200 mM. Las concentraciones de fibrinógeno estudiadas fueron 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 800 mg/dl.

[0105] Monitorización tromboelastográfica. Se dispusieron mezclas de muestras de plasma en una copa desechable en un sistema de hemostasia THROMBELASTOGRAPH® controlado por ordenador (modelo 5000, Haemoscope Corp., Niles, IL), con adición de $CaCl_2$ como la última etapa para iniciar la coagulación. Los datos se recogieron hasta que se estabilizó la fortaleza del coágulo. Las siguientes variables previamente descritas (Ejemplos 1-3) se determinaron a 37 ºC: *Tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos (TMVGT):* Éste es el intervalo de tiempo (s) observado antes de la máxima velocidad de crecimiento del coágulo. *Máxima velocidad de generación de trombos (MVGT):* Ésta es la máxima velocidad de crecimiento del coágulo observada (dinas/cm^2/s). *Generación total de trombos (GTT):* Ésta es el área total bajo la curva de velocidad durante el crecimiento del coágulo (dinas/cm^2), que representa la cantidad de fortaleza del coágulo generado durante el crecimiento del coágulo.

[0106] Análisis estadísticos. Los datos obtenidos de experimentos que implican plasma deficiente en protrombina se presentan como media ± DE. Normalmente, n = 6-8 proporciona potencia estadística >0,8 en análisis similares (Ejemplos 1 y 2). Los análisis de los efectos de CORM-2 sobre las variables tromboelastográficas se realizaron

usando pruebas de la t de Student bilaterales para datos independientes. Un valor de p de <0,05 se consideró significativo. La representación gráfica de los datos tromboelastográficos derivados de experimentos con plasma deficiente en fibrinógeno se generó con software comercialmente disponible (SigmaPlot 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA). Las ecuaciones del modelo cinético de coagulación se derivaron con el mismo software. La diferencia entre los valores medios de MVGT o GTT en muestras expuestas a CORM-2 0 ó 100 μM se determinaron y expresaron como diferencia de porcentaje secundaria a la exposición a CORM-2 en los experimentos de plasma deficiente en fibrinógeno. Estos datos se representan gráficamente con Origin 7.5, OriginLab Corp., Northampton, MA.

Resultados

[0107] Experimentos de plasma deficiente en protrombina. Como se muestra en la Tabla 8, el pretratamiento de protrombina purificada con CORM-2 no cambió significativamente la cinética de coagulación en plasma deficiente en protrombina con respecto a protrombina expuesta a vehículo de DMSO solo. A diferencia, la adición de CORM-2 a plasma deficiente en protrombina mezclado con protrombina purificada produjo una notable potenciación de los valores de MVGT y GTT en comparación con la adición de vehículo solo.

[0108] Experimentos de plasma deficiente en fibrinógeno. Como se representa en las Figuras 23 y 24, la generación de concentraciones de fibrinógeno progresivamente mayores en plasma deficiente en fibrinógeno produjeron un aumento sigmoide en los valores de MVGT y GTT. La adición de CORM-2 produjo una respuesta sigmoide diferente de MVGT y GTT a concentraciones de fibrinógeno crecientes. Aunque los valores de MVGT y GTT fueron similares entre muestras expuestas a CORM-2 0 ó 100 μM en los extremos del intervalo de concentración de fibrinógeno probados (por ejemplo, 100 y 800 mg/dl), hubo una separación entre las dos condiciones dentro del intervalo medio de valores de concentración de fibrinógeno. Con respecto a TMVGT, no hubo diferencia perceptible entre muestras expuestas a CORM-2 0 ó 100 μM durante todo el intervalo de concentraciones de fibrinógeno probadas. Hubo una correlación lineal con concentraciones de fibrinógeno crecientes con un aumento de valores de TMVGT observado; en muestras expuestas a CORM-2 0 μM el intervalo de valores fue 2,83-4,75 min, mientras que en muestras expuestas a CORM-2 100 μM el intervalo de valores fue 2,83-4,00 min. La Tabla 9 muestra las ecuaciones de ajuste individuales, coeficientes de determinación y significancia estadística de las correlaciones anteriormente mencionadas.

[0109] La Figura 25 muestra el aumento relativo en los valores de MVGT y GTT con respecto al intervalo de concentración de fibrinógeno utilizado. La potenciación mediada por CORM-2 de la cinética de MVGT y GTT tuvo "forma de campana", con un aumento aproximado del 30 % a >80 % en ambos parámetros observados dentro del intervalo normal de concentración de fibrinógeno. MVGT y GTT se optimizaron a una concentración de fibrinógeno de 300 mg/dl, con un aumento de >80 % en ambos parámetros secundarios a la exposición a CORM-2.

Tabla 8. Valores de coagulación tromboelastográfica en plasma deficiente en protrombina

	CORM-2 0 μM	CORM-2 100 μM
Experimentos de exposición previa a CORM-2		
TMVGT	1,83 ± 0,00	2,15 ± 0,56
MVGT	4,96 ± 0,28	4,65 ± 0,99
GTT	86 ± 4	88 ± 3
Experimentos de adición de CORM-2		
	CORM-2 0 μM	**CORM-2 100 μM**
TMVGT	1,87 ± 0,07	1,85 ± 0,04
MVGT	5,74 ± 0,35	9,17 ± 0,36*
GTT	97 ± 4	152 ± 7*

Los datos se presentan como media ± DE. TMVGT = tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos (min); MVGT = máxima velocidad de generación de trombos (dinas/cm^2/s); GTT = generación total de trombos (dinas/cm^2). *P<0,05 frente a CORM-2 0 μM.

Tabla 9. Ecuaciones del ajuste de curva que describen la correlación de parámetros tromboelastográficos con concentraciones de fibrinógeno sin o con exposición a CORM-2

CORM-2 0 μM			
Parámetro	**Ecuación**	**R^2**	**Valor de p**
TMVGT	TMVGT=2,84+(0,00161 X [fibrinógeno])*	0,71	<0,001
MVGT	MVGT=-19,8/(1+e$^{(-([\text{fibrinógeno}]-423)/83,5)}$)**	0,94	<0,0001
GTT	GTT=-768/(1+e$^{(-([\text{fibrinógeno}]-456)/73,0)}$)**	0,94	<0,0001

CORM-2 100 µM

Parámetro	Ecuación	R^2	Valor de p
TMVGT	TMVGT=2,95+(0.00098 X [fibrinógeno])*	0,52	<0,001
MVGT	$MVGT=-22,7/(1+e^{(-([fibrinogeno]-364)/-65,2)})$**	0,92	<0,0001
GTT	$GTT=-849/(1+e^{(-([fibrinogeno]-376)/58,5)})$**	0,94	<0,0001

* Categoría de ecuación: Regresión lineal; ** Categoría de ecuación: Sigmoide; TMVGT = tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos (min); MVGT = máxima velocidad de generación de trombos (dinas/cm^2/s); GTT = generación total de trombos (dinas/cm^2); [fibrinógeno] = concentración de fibrinógeno en mg/dl.

Discusión

[0110] La exposición previa a CORM-2 no potenció la cinética de coagulación mediada por protrombina en plasma; en su lugar, solo la adición de CORM-2 a plasma deficiente en protrombina mezclado con protrombina produjo valores de MVGT y GTT potenciados. Además, la CORM-2 modifica el fibrinógeno como sustrato para trombina. Específicamente, la relación con "forma de campana" de MVGT y GTT potenciadas con CORM-2 con concentración de fibrinógeno respalda fuertemente la noción de que CORM-2 está potenciando el fibrinógeno como sustrato en este sistema de plasma. Expresado de otra forma, los efectos de CORM-2 sobre el fibrinógeno requieren una concentración de fibrinógeno mínima para que tenga efectos observables, mientras que los efectos mediados por CORM-2 a una concentración fija se ensombrecieron posteriormente por grandes concentraciones de fibrinógeno (con factor XIII unido). Así, sea cual sea el efecto que CORM-2 está teniendo sobre el fibrinógeno a una concentración de 800 mg/dl, ese efecto es ocultado en el efecto mucho mayor de la reticulación del polímero de fibrina mediado por el factor XIII que está compitiendo cinéticamente con efectos de CORM-2 sobre el fibrinógeno.

Ejemplo 8. Efectos de agentes liberadores de monóxido de carbono sobre la coagulación y fibrinólisis en plasma diluido

Materiales y procedimientos

[0111] Plasma y expansores del volumen. Se utilizó plasma normal reunido (George King Bio-Medical, Overland Park, KS) anticoagulado con citrato de sodio para la experimentación. El lote de plasma tuvo un tiempo de protrombina de 12,8 segundos, valor de relación normalizada internacional de 1,0, un tiempo de tromboplastina parcial activada de 29,4 segundos y una concentración de fibrinógeno de 310 mg/dl. Los expansores del volumen probados fueron 0,9 % de NaCl (Abbott Laboratories, North Chicago, Ill; también designado CS) y 6 % de hidroxiletilalmidón (HES) en 0,9 % de NaCl (VOLUVEN®, peso molecular promedio 130 kDa, grado de sustitución 0,4, relación de sustitución C2:C6 11,2; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Alemania; también denominado VOL).

[0112] Composición de la muestra de plasma de experimentos de respuesta a la dilución. El volumen final para todas las mezclas de muestras de plasma posteriormente descritas fue 359,6 µl. La composición de la muestra consistió en 326 µl de plasma/expansor del volumen, 10 µl de reactivo de factor tisular (0,1 % de concentración final en dH_2O; Instrumentation Laboratory, Lexington, MA), 3,6 µl de sulfóxido de dimetilo (DMSO) o DMSO con CORM-2 (concentración final 100 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 20 µl de $CaCl_2$ 200 mM .La disolución madre de factor tisular se mantuvo sobre hielo antes de uso y se volvió a preparar cada dos horas. La concentración de CORM-2 usada fue la asociada al máximo efecto sobre la coagulación y fibrinólisis en este sistema (véase el Ejemplo 2). Se añadió DMSO a CORM-2 seca justo antes de la colocación en la mezcla de plasma. El plasma se diluyó al 0 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % con CS o VOL (n=4 por condición).

[0113] Composición de la muestra de plasma de experimentos con adición de activador del plasminógeno tipo tisular. Como en la primera serie de experimentos, el volumen final de las mezclas de muestras de plasma fue 359,6 µl. La composición de la muestra consistió en 316 µl de plasma/expansor del volumen, 10 µl de reactivo de factor tisular (0,1 % de concentración final), 3,6 µl de DMSO sin o con CORM-2 (concentración final 100 µM), 10 µl de activador del plasminógeno tipo tisular (tPA, 580 U/µg, Genentech, Inc., San Francisco, CA) diluido con tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 7,4) para una actividad final de 100 UI/ml y 20 µl de $CaCl_2$ 200 mM. Al igual que con el reactivo de factor tisular, la disolución madre de tPA se mantuvo sobre hielo antes de uso y se volvió a preparar cada dos horas. El plasma se diluyó al 0 % o 30 % con CS o VOL (n=8 por condición).

[0114] Análisis del modelo de duración del coágulo (MDC). Se dispusieron mezclas de muestras de plasma en una copa desechable en un sistema de hemostasia THROMBELASTOGRAPH® controlado por ordenador (modelo 5000, Haemoscope Corp., Niles, IL), con adición de $CaCl_2$ como la última etapa para iniciar la coagulación. En la primera serie de experimentos no se añadió tPA, de manera que los datos se recogieron hasta que fue estable la fortaleza del coágulo (máxima amplitud). En la segunda serie de experimentos en la que se añadió tPA se recogieron datos hasta que se produjo el tiempo de lisis del coágulo. Se determinaron las siguientes variables a 37 ºC dependiendo de si tPA estaba o no presente en la mezcla de reacción: *Tiempo de crecimiento del coágulo* (TCC, tiempo desde la amplitud del coágulo de 2 mm [102 dinas/cm^2] hasta que se logra la máxima fortaleza, en s), *tiempo de lisis del*

coágulo (TLC, tiempo desde cuando se observó la máxima fortaleza hasta la amplitud de 2 mm, en s) y *duración del coágulo* (DC, la suma de TCC y TLC). Se determinaron parámetros basados en el módulo elástico adicionales y la nomenclatura usada para describir estos fenómenos es la siguiente: *Tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos (TMVGT):* Éste es el intervalo de tiempo (s) observado antes de la máxima velocidad de crecimiento del coágulo. *Máxima velocidad de generación de trombos (MVGT):* Ésta es la máxima velocidad de crecimiento del coágulo observada (dinas/cm^2/s). *Generación total de trombos (GTT):* Éste es el área total bajo la curva de velocidad durante el crecimiento del coágulo (dinas/cm^2), que representa la cantidad de fortaleza del coágulo generado durante el crecimiento del coágulo. *Tiempo hasta la máxima velocidad de lisis (TMVL):* Éste es el intervalo de tiempo (s) medido desde el tiempo de la máxima fortaleza hasta el tiempo cuando la velocidad de disgregación del coágulo es máximo. *Máxima velocidad de lisis (MVL):* Ésta es la máxima velocidad de disgregación del coágulo observado (-dinas/cm^2/s). *Área de lisis del coágulo (ACL)*:Ésta es el área total bajo la curva de velocidad durante la disgregación del coágulo (-dinas/cm^2), que representa la cantidad de fortaleza del coágulo perdida durante la disgregación del coágulo. Como este modelo implica fibrinólisis completa, GTT es equivalente al ACL, de manera que ACL no se presentó ya que no proporciona información adicional.

[0115] Análisis estadísticos. Los datos obtenidos de plasma normal reunido no expuesto a tPA se representaron gráficamente con software comercialmente disponible (SigmaPlot 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA) y el modelado cinético de datos tromboelastográficos se realizó con el mismo software. Los análisis de los efectos de hemodilución y CORM-2 sobre las variables de MDC obtenidas de plasma normal reunido se realizaron usando análisis unifactorial de Kruskal-Paredis de la varianza con prueba a posteriori de Student-Newman-Keuls. Estos datos se representaron como la mediana y el 1º-3º cuartiles. Estos análisis se realizaron con el mismo software comercialmente disponible (SigmaPlot 11.0). Un valor de p de <0,05 se consideró significativo.

Resultados

[0116] Experimentos de respuesta a la dilución. Los datos de estos experimentos se muestran en las Figuras 26 y 27, con las ecuaciones y coeficientes cinéticos derivados de la determinación representados en la Tabla 10. Con respecto a TMVGT, hubo una tendencia significativa a reducir en valor con dilución progresiva independientemente de la condición, con un intervalo de 2,8 a 1,9 min en las muestras expuestas a CS y un intervalo de 2,8 a 2,0 min en las muestras expuestas a VOL.

[0117] A diferencia de TMVGT, como se observa en la Figura 26, la exposición a CORM-2 aumentó MVGT el 75 % en muestras sin diluir. Como se representa en el panel A de la Figura 26, los valores de MVGT no disminuyeron antes de que las muestras de plasma se diluyeran el 40 % y el 50 % con CS (disminución del 14 % y 32 % en comparación con muestras sin diluir). Las muestras diluidas con CS y expuestas a CORM-2 tuvieron valores de MVGT el 40-50 % superiores a las muestras de la misma dilución no expuestas a CORM-2, con la excepción de muestras diluidas al 50 % que tuvieron valores de MVGT elevados solo el 12 % con la exposición a CORM-2. La exposición a CORM-2 produjo valores supranormales de MVGT en muestras diluidas con CS con la excepción de muestras diluidas al 50 %. A diferencia de las muestras diluidas con CS, el plasma diluido con VOL demostró una disminución inmediatamente progresiva en valores de MVGT como se muestra en la Figura 26, panel B. El veinte por ciento, 30 %, 40 % y 50 % de dilución con VOL produjo valores de MVGT del 52 %, 39 %, 26 % y 17 % de los valores de muestras sin diluir, respectivamente. La exposición de plasma diluido con VOL a CORM-2 mejoró los valores de MVGT, produciendo el 20 %, 30 %, 40 % y el 50 % de valores de dilución de MVGT del 93 %, 67 %, 60 % y el 22 % de muestras sin diluir, respectivamente. En resumen, la exposición a CORM-2 produjo valores supranormales de MVGT en plasma diluido con CS, pero solo pudo compensar parcialmente las disminuciones mediadas por VOL en valores de MVGT.

[0118] Similar a MVGT, como se observa en la Figura 27, la exposición a CORM-2 aumentó GTT el 59 % en muestras sin diluir. Como se representa en el panel A de la Figura 27, la dilución de plasma con CS el 20 %, 30 %, 40 % y 50 % produjo valores de GTT del 87 %, 73 %, 63 % y el 50 % de valores de muestras sin diluir. La exposición a CORM-2 aumentó los valores de GTT de muestras diluidas con CS entre el 31 %-54 %, con fortaleza del coágulo supranormal observada hasta que el plasma se diluyó al 40 %. A diferencia de las muestras diluidas con CS, el plasma diluido con VOL demostró una disminución más progresiva en valores de GTT como se muestra en la Figura 27, panel B. El veinte por ciento, 30 %, 40 % y el 50 % de dilución con VOL produjo valores de GTT del 49 %, 35 %, 22 % y el 13 % de valores de muestras sin diluir, respectivamente. La exposición de plasma diluido con VOL a CORM-2 mejoró los valores de GTT, produciendo el 20 %, 30 %, 40 % y el 50 % de valores de dilución de GTT del 76 %, 50 %, 45 % y el 17 % de muestras sin diluir, respectivamente. En resumen, la exposición a CORM-2 produjo valores de GTT supranormales en plasma diluido con CS, pero solo pudo compensar marginalmente las disminuciones mediadas por VOL en valores de GTT.

[0119] Experimentos con adición de tPA. Las comparaciones de los efectos de la exposición a CORM-2 en plasma sin diluir y diluido tras la tensión fibrinolítica se muestran en la Tabla 11. La exposición a CORM-2 produjo crecimiento más rápido, coágulos más fuertes que requirieron más tiempo para formarse y disolverse bajo todas las condiciones. Sin embargo, el plasma diluido con VOL formó el crecimiento más lento, coágulos más débiles que requirieron menos tiempo para formarse y se fibrinolisaron más rápidamente. Específicamente, los trombos en

plasma diluido con VOL duraron aproximadamente un tercio más que el plasma sin diluir, con solo el 31 % del MVGT y el 25 % de los valores de GTT de plasma sin diluir. Mientras que la exposición a CORM-2 potenció los valores de MDC de plasma diluido con VOL, estos valores fueron todavía inferiores a los observados en muestras sin diluir o diluidas con CS. Con respecto a la cinética fibrinolítica, las muestras diluidas con CS tuvieron menos aumento en MVL y mayores valores de TLC/DC tras la exposición a CORM-2 en comparación con muestras sin diluir.

Tabla 10. Ecuaciones de correlación de parámetros tromboelastográficos y % de dilución sin o con exposición a CORM-2.

Parámetro	Ecuación	R^2	Valor de p
0,9 % de NaCl; sin CORM-2			
TMVGT	TMVGT=2,46+(0,00977 X % de dilución)*	0,63	<0,001
MVGT	MVGT=7,94/(1+e$^{(-(\%\ de\ dilución-55,7)/9,20)}$)**	0,85	<0,0001
GTT	GTT=211/(1+e$^{(-(\%\ de\ dilución-44,3)/-23,1)}$)**	0,96	<0,0001
0,9 % de NaCl; con CORM-2			
TMVGT	TMVGT=2,35+(0,00517 X % de dilución)*	0,33	<0,01
MVGT	MVGT=13,51/(1+e$^{(-(\%\ de\ dilución-47,3)/-11,8)}$)**	0,96	<0,0001
GTT	GTT=344/(1+e$^{(-(\%\ de\ dilución-37,7)/-21,5)}$)**	0,95	<0,0001
6 % de hidroxietilalmidón; sin CORM-2			
TMVGT	TMVGT=2,51+(0,00716 X % de dilución)*	0,59	<0,001
MVGT	MVGT=22,3/(1+e$^{(-(\%\ de\ dilución+16,1)/-24,2)}$)**	0,97	<0,0001
GTT	GTT=517/(1+e$^{(-(\%\ de\ dilución+12,8)/21,4)}$)**	0,98	<0,0001
6 % de hidroxietilalmidón; con CORM-2			
TMVGT	TMVGT=2,39+(0,00659 X % de dilución)*	0,52	<0,001
MVGT	MVGT=38,5/(1+e$^{(-(\%\ de\ dilución+15,7)/24,6)}$)**	0,96	<0,0001
GTT	GTT=2234/(1+e$^{(-(\%\ de\ dilución-+47,4)/-25,0)}$)**	0,97	<0,0001

* Categoría de ecuación: Regresión lineal; ** Categoría de ecuación: Sigmoide; TMVGT = tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos (min); MVGT = máxima velocidad de generación de trombos (dinas/cm^2/s); GTT = generación total de trombos (dinas/cm^2).

Tabla 11. Valores de MDC en plasma tras la dilución y exposición a CORM-2.

	Sin diluir	
CORM-2	-	+
TMVGT	2,2 (2,2, 2,3)	2,1 (2,1, 2,2)*
MVGT	7,4 (6,9, 7,6)	13,9 (13,5, 14,8)*
GTT	145 (135, 152)	285 (272, 290)*
TMVL	7,7 (6,8, 8,6)	17,7 (14,5, 21,5)*
MVL	-1,3 (-1,7, -1,2)	-3,0 (-3,3, -2,4)*
TCC	3,5 (3,4, 3,8)	8,1 (6,4, 8,6)*
TLC	12,2 (11,9, 14,2)	24,3 (19,6, 28,1)*
DC	15,8 (15,3, 17,6)	31,6 (28,4, 35,2)*
	30 % de CS	
CORM-2	-	+
TMVGT	2,0 (2,0, 2,1)†	2,00 (1,9, 2,0)
MVGT	6,5 (5,9, 6,8)†	11,2 (9,4, 11,4)*†
GTT	105 (98, 112)†	206 (192, 212)*†
TMVL	9,6 (7,2, 10,3)	23,4 (21,1, 26,9)*†
MVL	-1,6 (-1,7, -1,4)	-1,9 (-2,2, -1,5)†
TCC	3,6 (3,5, 4,2)	8,0 (7,2, 8,2)*
TLC	11,6 (9,4, 12,4)†	31,5 (28,7, 35,8)*†
DC	15,2 (14,4, 16,0)	38,7 (36,7, 43,0)*†

	30 % de VOL	
CORM-2	-	+
TMVGT	2,1 (2,0, 2,1)†	2,0 (2,0, 2,1)
MVGT	2,3 (2,2, 2,5)†‡	3,8 (3,6, 4,1)*†‡
GTT	36 (34, 38)†‡	62 (58, 68)*†‡
TMVL	2,3 (2,0, 2,4)†‡	5,2 (4,9, 5,9)*†‡
MVL	-0,9 (-1,3, -0,7)†‡	-0,9 (-1,2, -0,8)†‡
TCC	1,6 (1,0, 1,9)†‡	2,2 (1,9, 2,4)*†‡
TLC	3,8 (3,1, 4,4)†‡	8,0 (7,4, 8,2)*†‡
DC	5,2 (4,2, 6,4)†‡	10,0 (9,5, 10,4)*†‡

Los datos se presentan como la mediana (1º, 3º cuartiles); CS = 0,9 % de NaCl; VOL = 6 % de hidroxietilalmidón; - = CORM-2 0 μM; + = CORM-2 100 μM; TMVGT = tiempo hasta la máxima velocidad de generación de trombos (min); MVGT = máxima velocidad de generación de trombos (dinas/cm^2/s); GTT = generación total de trombos (dinas/cm^2); TMVL = tiempo hasta la máxima velocidad de lisis (min); MVL = máxima velocidad de lisis (-dinas/cm^2/s); TCC = tiempo de crecimiento del coágulo (min); TLC = tiempo de lisis del coágulo (min); DC = duración del coágulo (min). *P<0,05 frente a CORM-2 0 μM de la misma condición; †P<0,05 frente a plasma sin diluir con la misma concentración de CORM-2; ‡P<0,05 frente al 30 % de CS con la misma concentración de CORM-2.

Discusión

[0120] La exposición a CORM-2 potenció la coagulación y disminuyó la vulnerabilidad fibrinolítica en trombos en plasma sin diluir y diluido. Dilución equivalente con CS produjo trombos que se formaron más rápidamente, más fuertes, de mayor duración, que aquellos observados con dilución de HES. La cinética de coagulación supranormal a normal y la fortaleza fibrinolítica se mantuvo por la exposición a CORM-2 en plasma tras hasta el 40 % de dilución con CS, pero tan solo el 20 % de dilución con VOL degradó la cinética del crecimiento-disgregación del coágulo a pesar de la presencia de CORM-2.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula liberadora de monóxido de carbono (CORM) para su uso para potenciar la coagulación o reducir la fibrinólisis en un sujeto en necesidad de coagulación potenciada o fibrinólisis reducida, en la que la potenciación o reducción comprende la administración de CORM al sujeto.

2. La CORM de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en la que la CORM se selecciona del grupo que consiste en un dímero de tricarbonildiclororutenio (II), tricarbonilcloro(glicinato)rutenio (II), boranocarbonato de sodio, decacarbonilo de dimanganeso y pentacarbonilo de hierro.

3. La CORM de las reivindicaciones 1 ó 2 para el uso de la reivindicación 1 para administración de una dosis única de la CORM al sujeto.

4. La CORM de la reivindicación 3 para el uso de la reivindicación 1, en la que la dosis comprende de 25 μM a 200 μM de la CORM.

5. La CORM de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el uso de la reivindicación 1, en la que la CORM es para administración en o cerca de un sitio de hemorragia, y/o en la que la CORM es para administración tópica o para administración por inyección local, intravenosa o intramuscular.

6. La CORM de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso de la reivindicación 1, en la que la CORM se formula para administración por un espray en aerosol, una pomada, una venda, un apósito quirúrgico, un relleno de herida, un hisopo, un líquido, una pasta, una crema, una loción, una espuma, un gel, una emulsión, un polvo, hilo dental, un instrumento dental o una aguja.

7. La CORM de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para el uso de la reivindicación 1, en la que la CORM es para co-administración con un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un antibiótico, un anestésico, un analgésico, un antihistamínico, un antimicrobiano, un antifúngico, un antiviral y un agente antiinflamatorio, o para la co-administración con un agente hemostático, un coagulante, una medicación antifibrinolítica, fibrina, trombina, factor VII activado recombinante, concentrado de complejo de protrombina, FEIBA o un factor de coagulación sanguíneo, en la que opcionalmente el factor de coagulación sanguíneo es factor VIII, factor IX, factor XIII o factor de von Willebrand.

8. La CORM de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para el uso de la reivindicación 1, en la que el sujeto tiene una enfermedad o afección asociada a hemorragia, en la que opcionalmente la enfermedad o afección asociada a hemorragia es hemofilia, trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand, telangiectasia hemorrágica hereditaria o coagulación intravascular diseminada o una herida abierta.

9. La CORM de la reivindicación 8 para el uso de la reivindicación 1, en la que la herida abierta se produce por traumatismo o lesión o es debida a un procedimiento quirúrgico.

10. La CORM de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para el uso de la reivindicación 1, en la que el sujeto está sometiéndose a cirugía o hemodilución, o en la que el sujeto tiene la necesidad de formación elevada de coágulos de sangre.

11. La CORM de la reivindicación 10 para el uso de la reivindicación 1, en la que el sujeto está siendo tratado con un anticoagulante, una medicación antiplaquetaria, una antitrombina o una medicación fibrinolítica.

12. Una composición que comprende una CORM y un producto sanguíneo, en la que el producto sanguíneo se selecciona de crioprecipitado o plasma fresco congelado.

13. La composición de la reivindicación 12, en la que la CORM se selecciona del grupo que consiste en dímero de tricarbonildiclororutenio (II), tricarbonilcloro(glicinato)rutenio (II), boranocarbonato de sodio, decacarbonilo de dimanganeso y pentacarbonilo de hierro.

14. La composición de la reivindicación 12 para su uso para tratar un sujeto en necesidad de un producto sanguíneo, en la que el tratamiento comprende administración de la composición al sujeto.

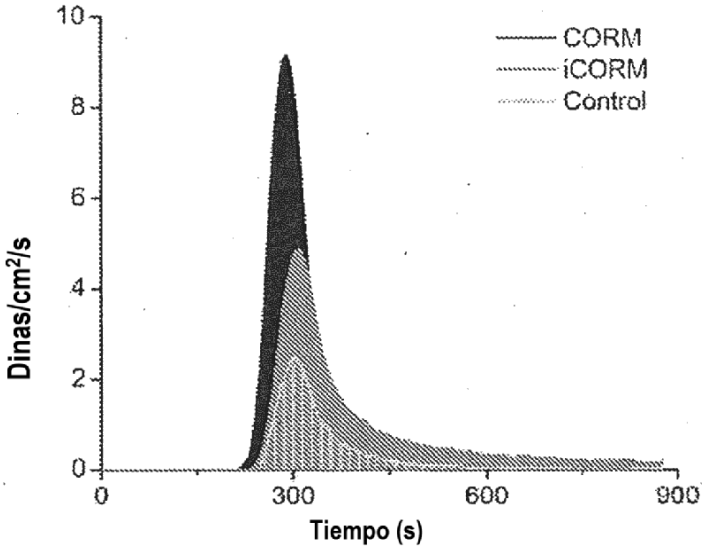

Figura 1

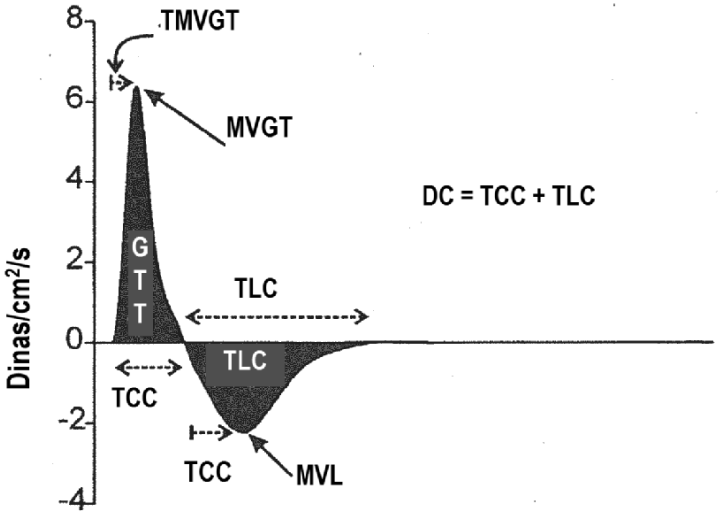

Figura 2

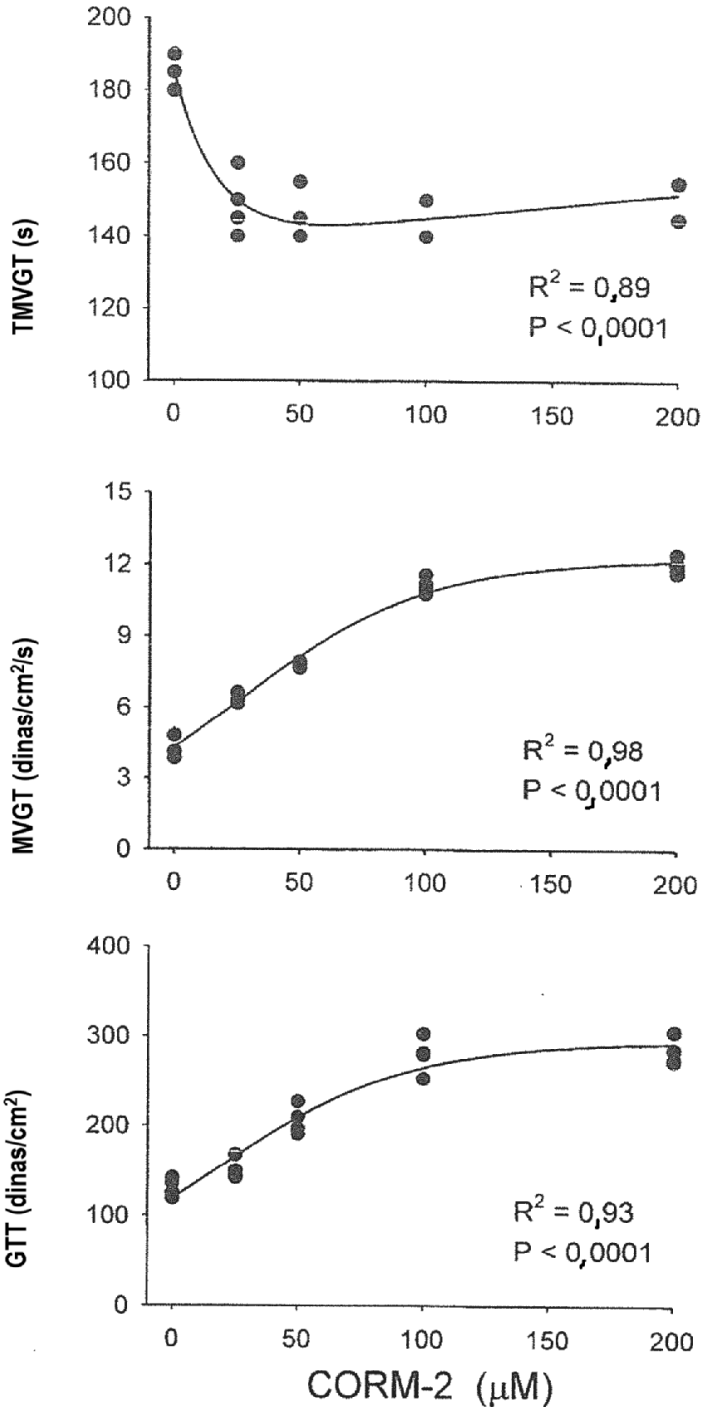
TMVGT (s)
200
180
160
140
120
100
0
50
100
150
200
R² = 0,89
P < 0,0001
MVGT (dinas/cm²/s)
15
12
9
6
3
0
R² = 0,98
P < 0,0001
GTT (dinas/cm²)
400
300
200
100
0
R² = 0,93
P < 0,0001
CORM-2 (μM)

Figura 3

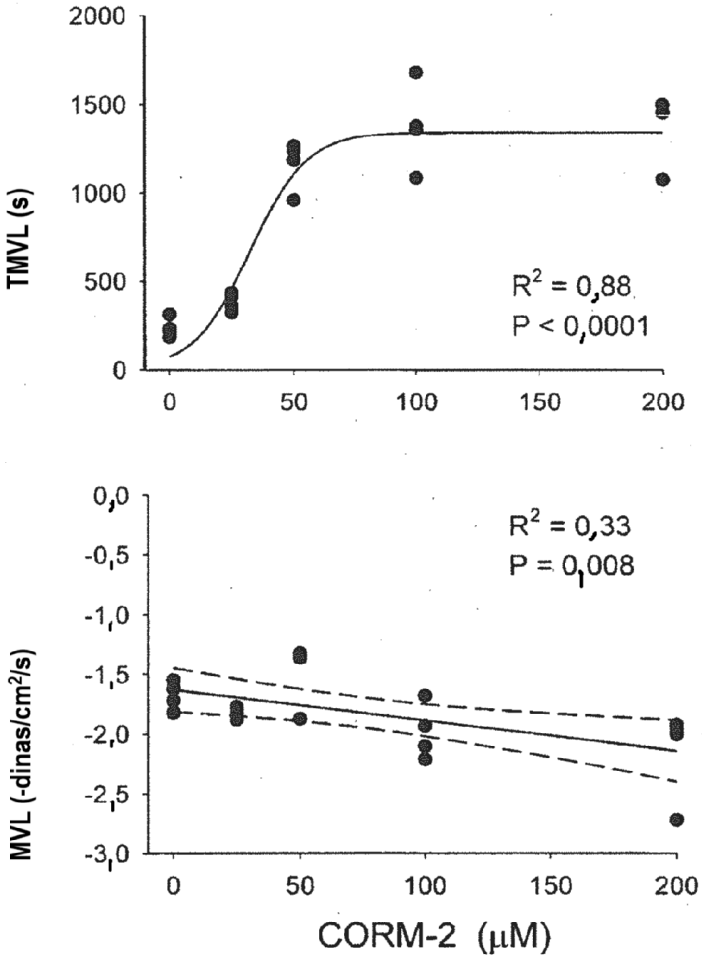
2000
1500
1000
500
0
TMVL (s)
R^2 = 0,88
P < 0,0001
0
50
100
150
200
0,0
-0,5
-1,0
-1,5
-2,0
-2,5
-3,0
MVL (-dinas/cm²/s)
R^2 = 0,33
P = 0,008
0
50
100
150
200
CORM-2 (μM)

Figura 4

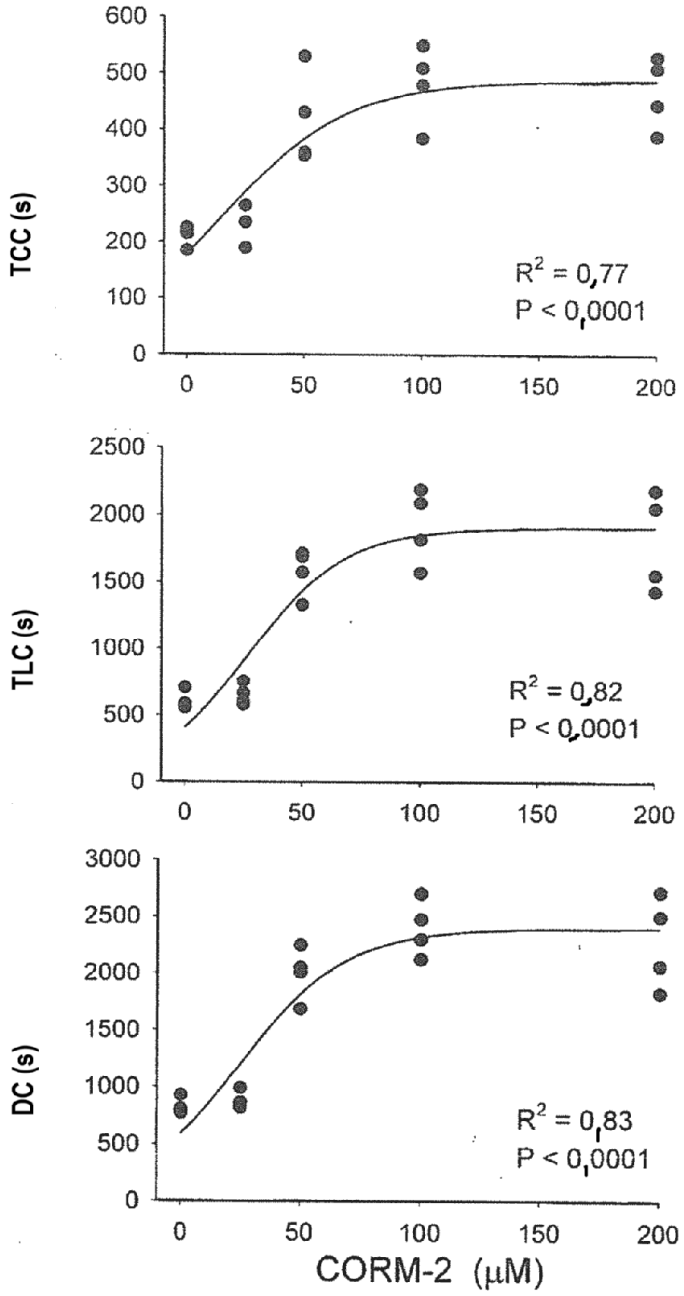
TCC (s)
600
500
400
300
200
100
0
0
50
100
150
200
R^2 = 0,77
P < 0,0001
TLC (s)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
R^2 = 0,82
P < 0,0001
DC (s)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
R^2 = 0,83
P < 0,0001
CORM-2 (μM)

Figura 5

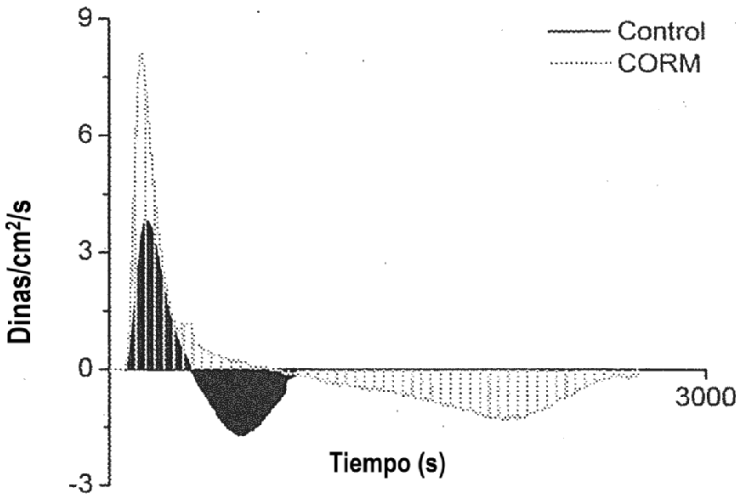

Figura 6

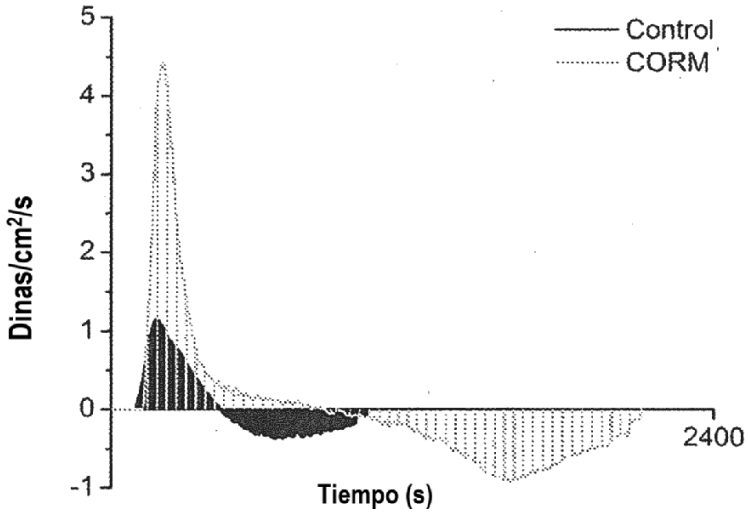

Figura 7

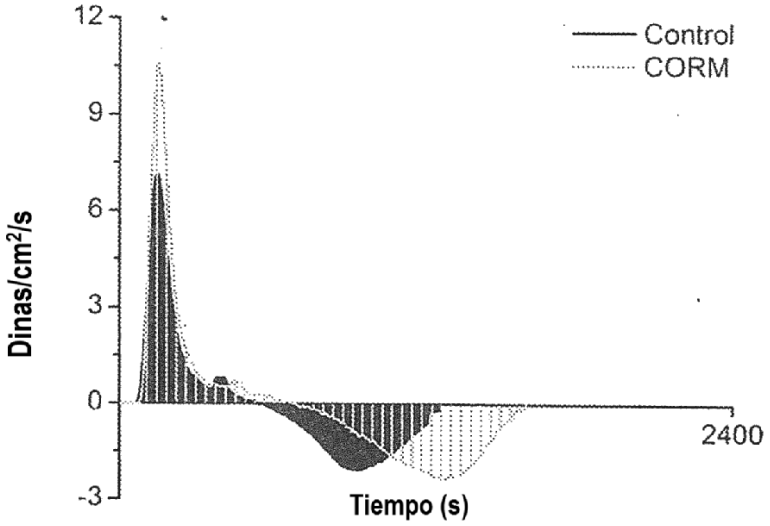

Figura 8

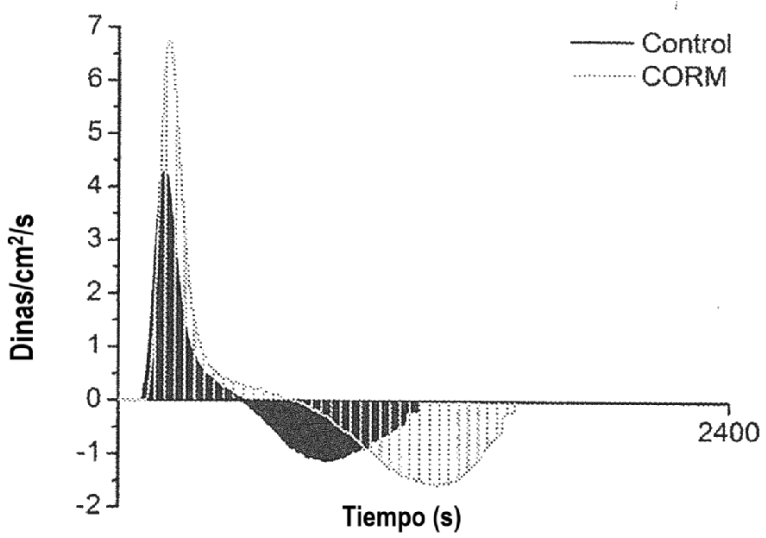

Figura 9

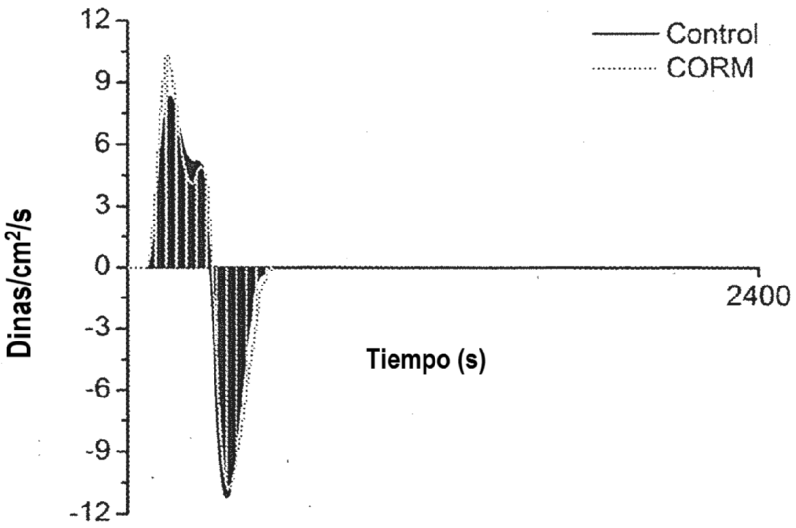

Figura 10

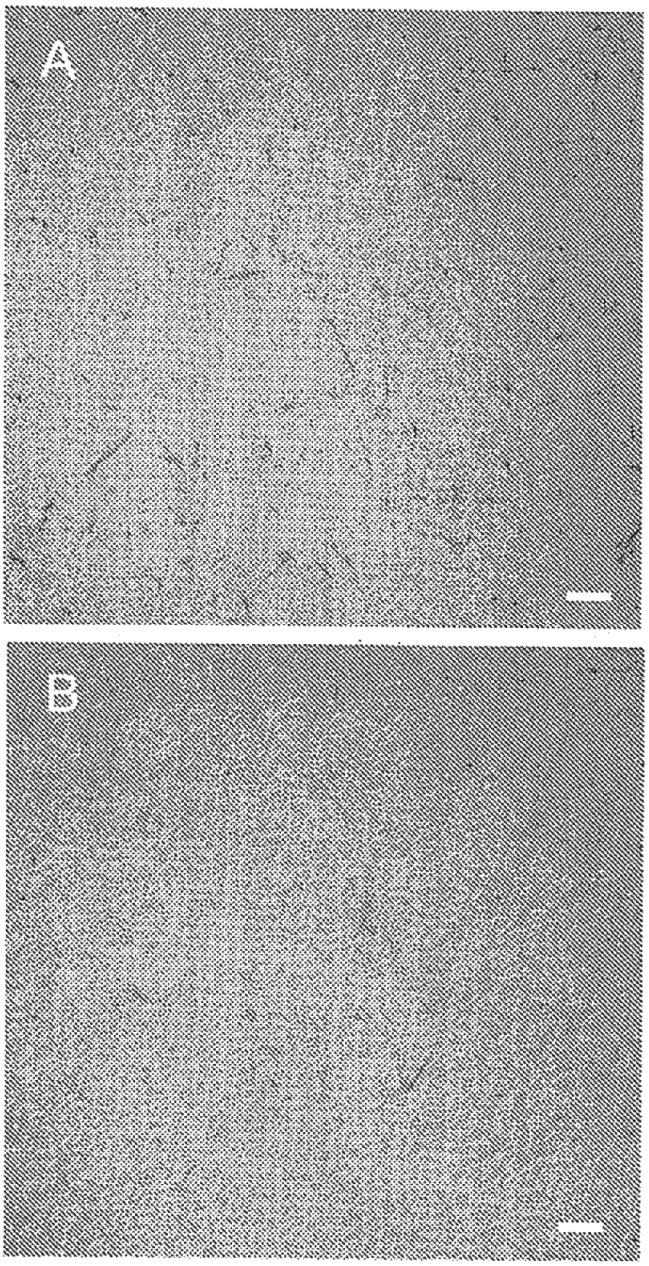

Figura 11

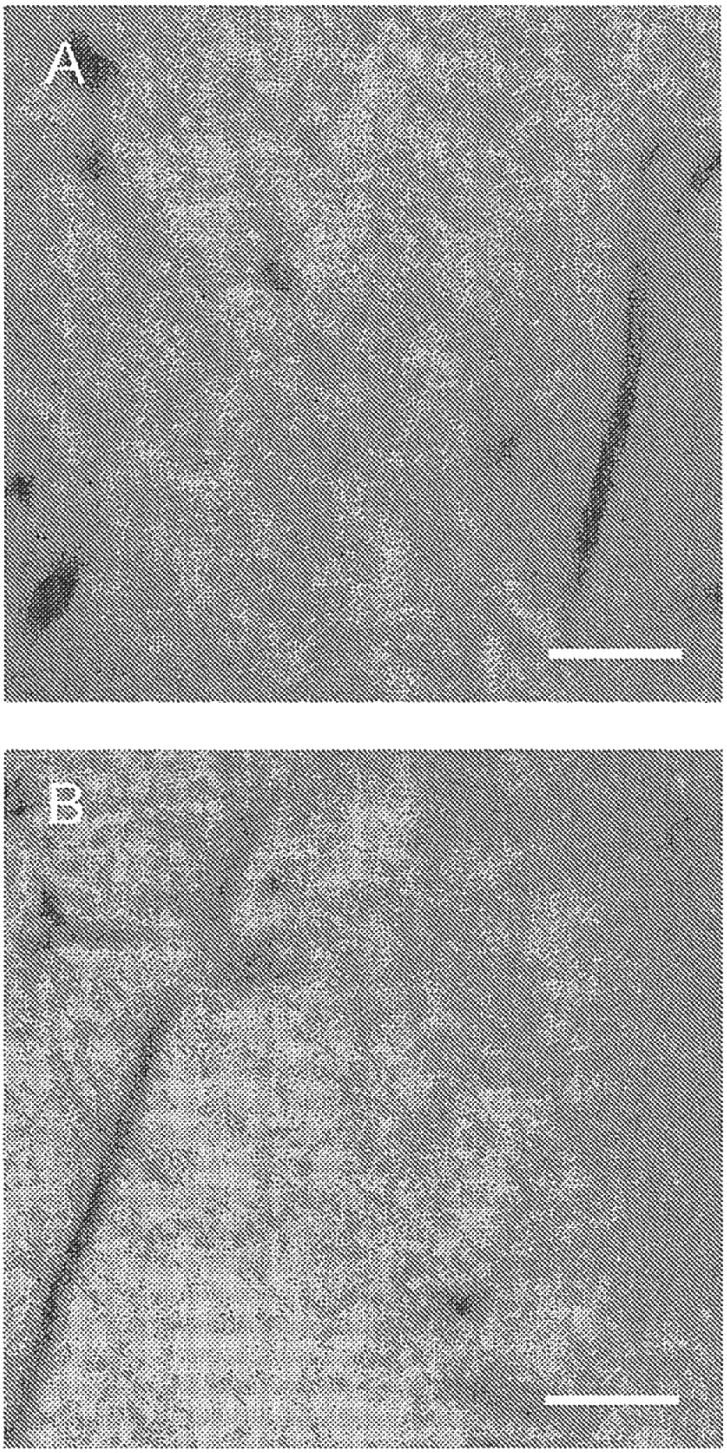

Figura 12

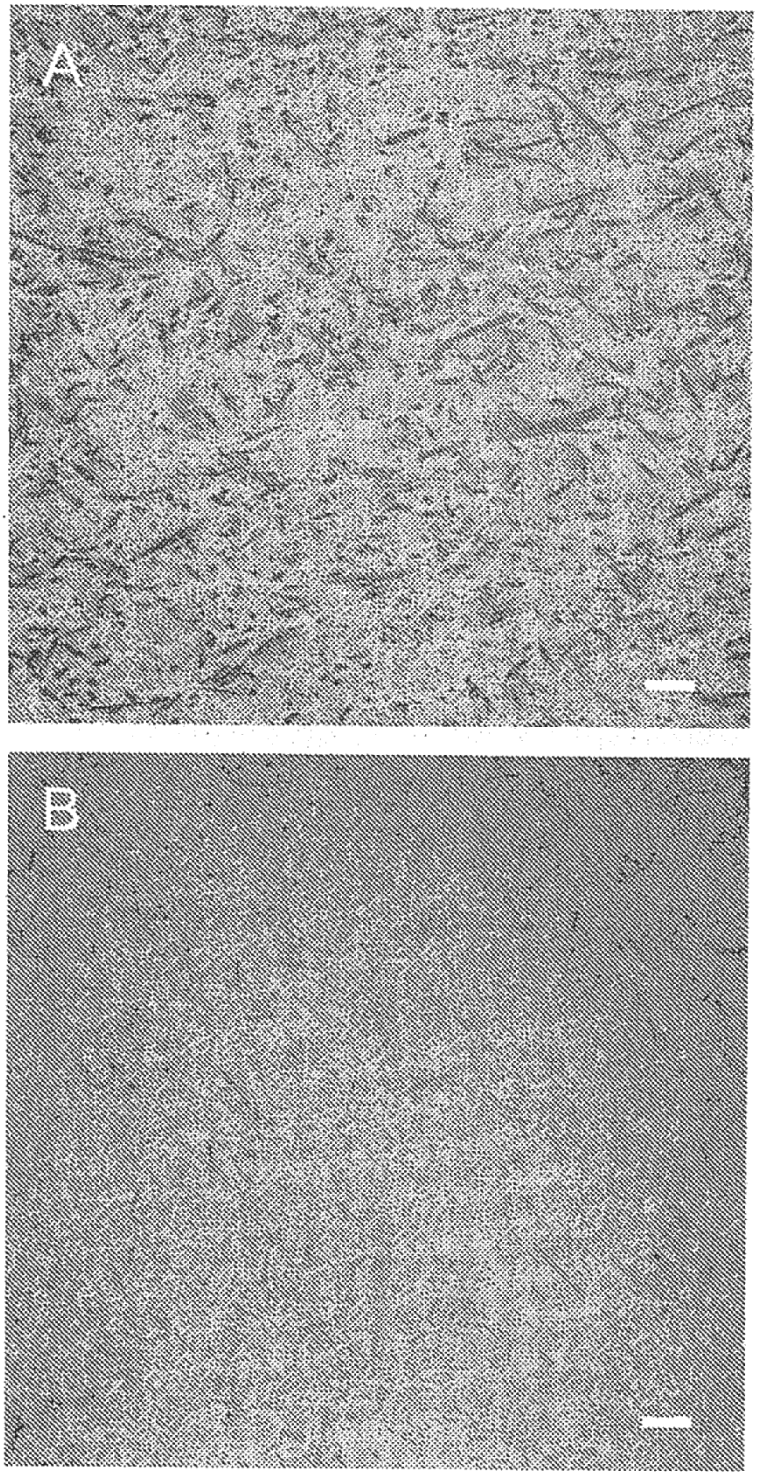

Figura 13

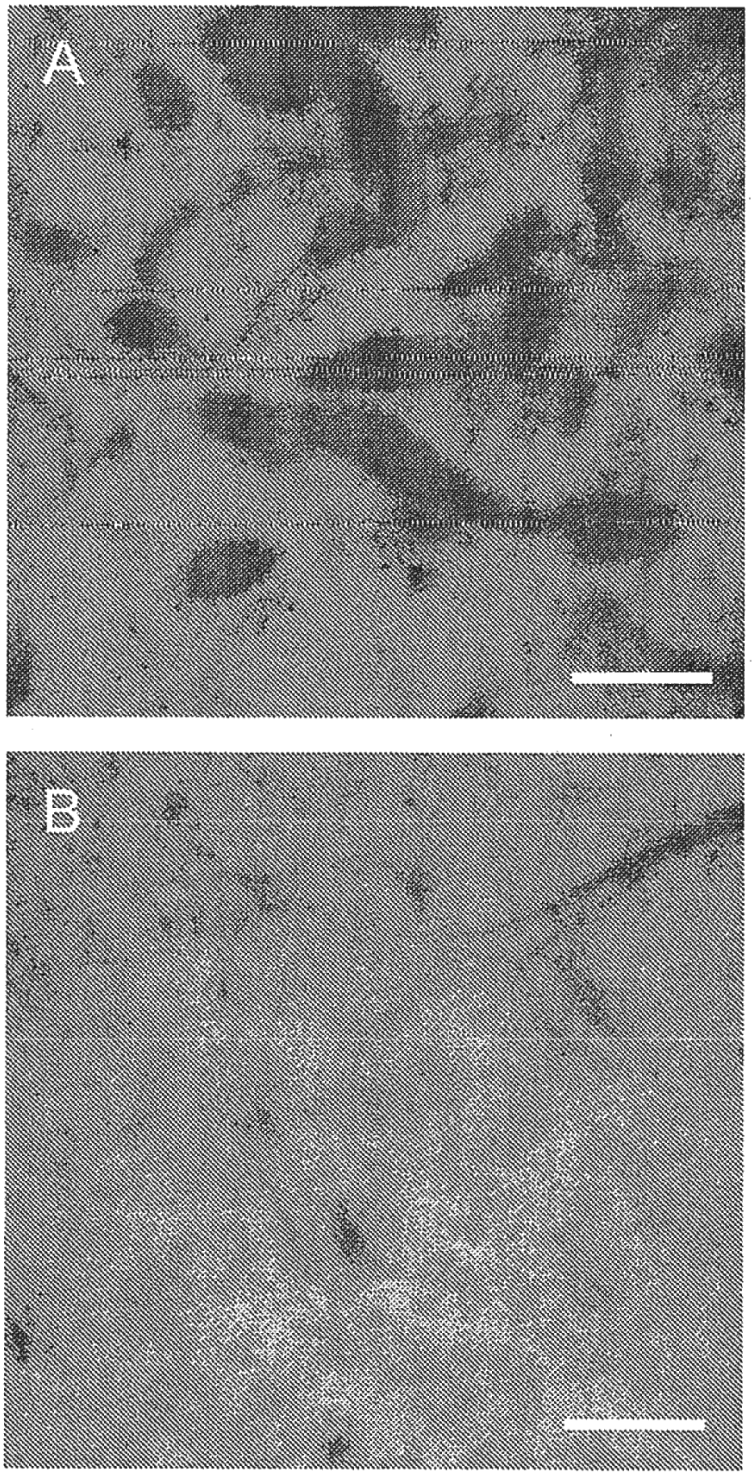

Figura 14

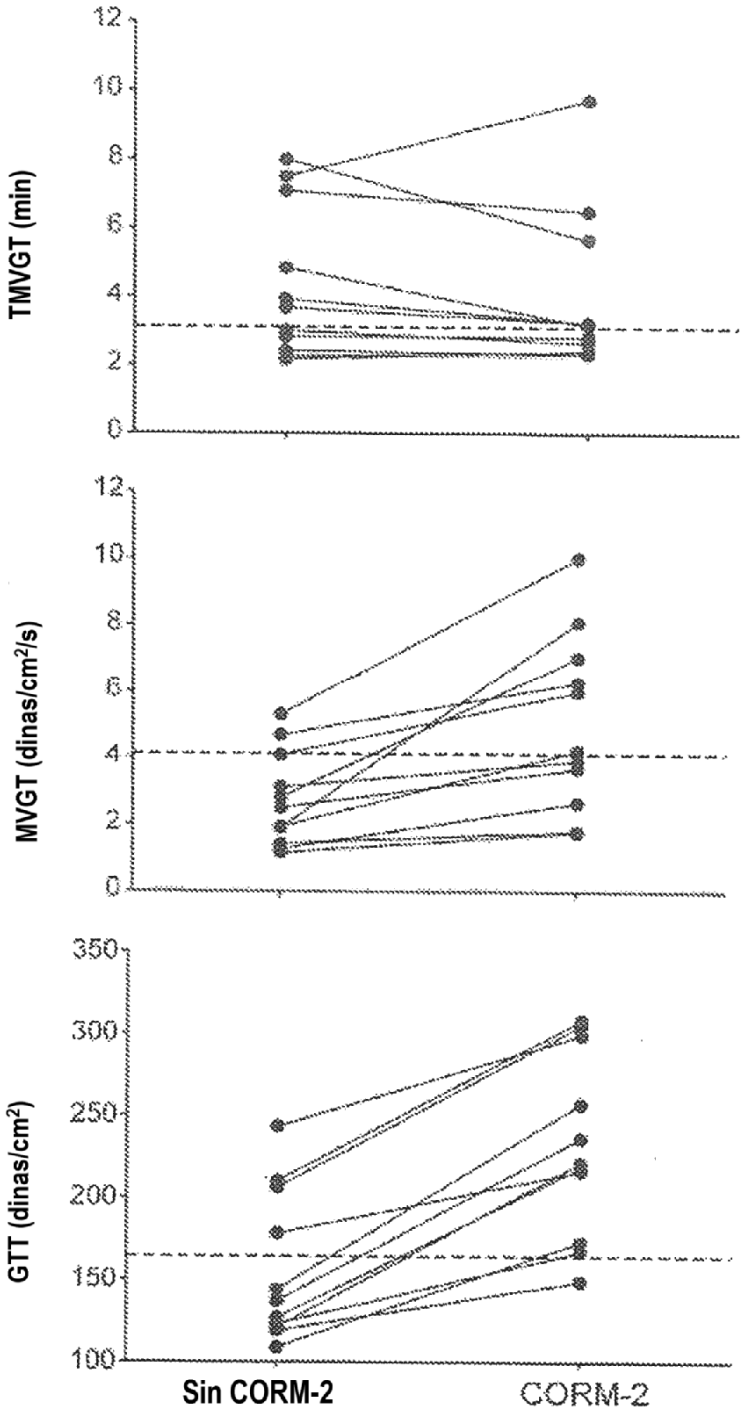
TMVGT (min)
12
10
8
6
4
2
0
MVGT (dinas/cm²/s)
12
10
8
6
4
2
0
GTT (dinas/cm²)
350
300
250
200
150
100
Sin CORM-2
CORM-2

Figura 15

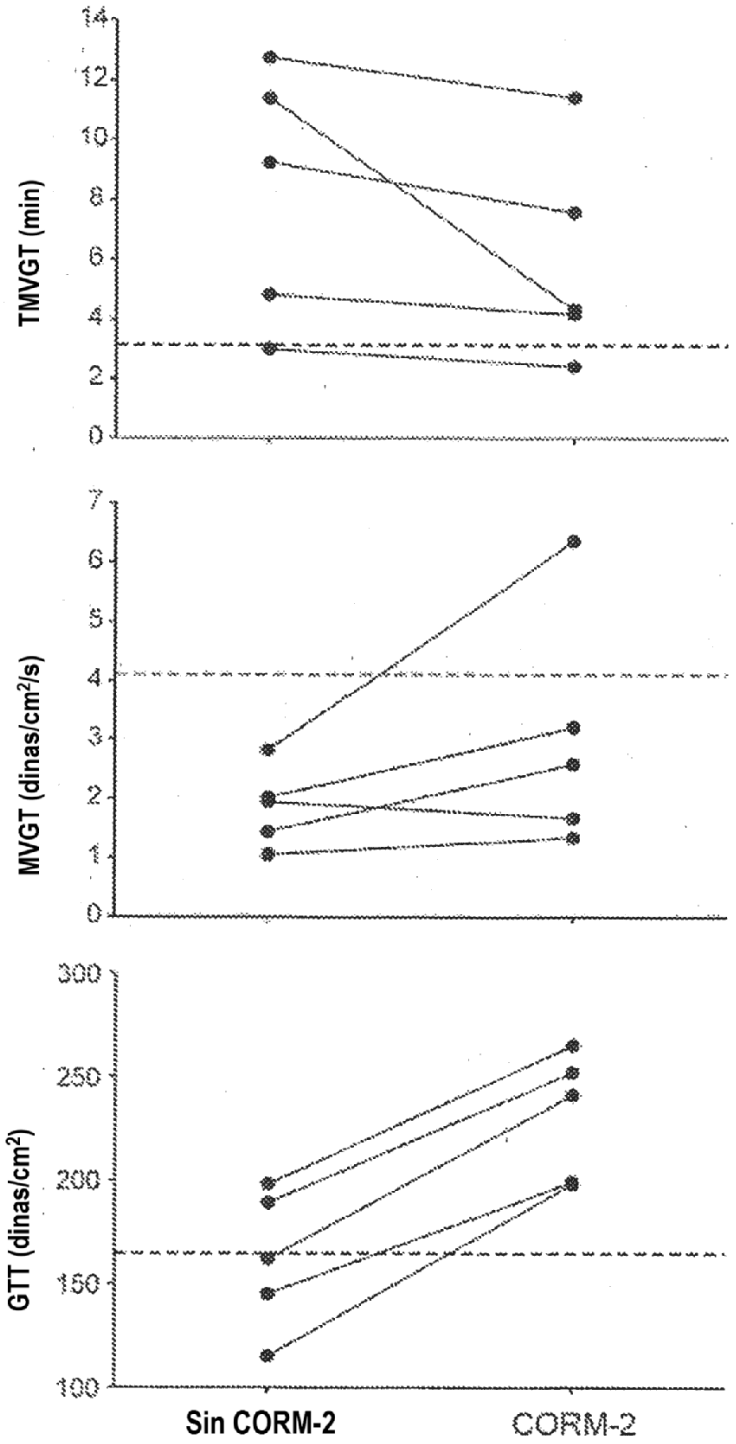
TMVGT (min)
14
12
10
8
6
4
2
0
MVGT (dinas/cm²/s)
7
6
5
4
3
2
1
0
GTT (dinas/cm²)
300
250
200
150
100
Sin CORM-2
CORM-2

Figura 16

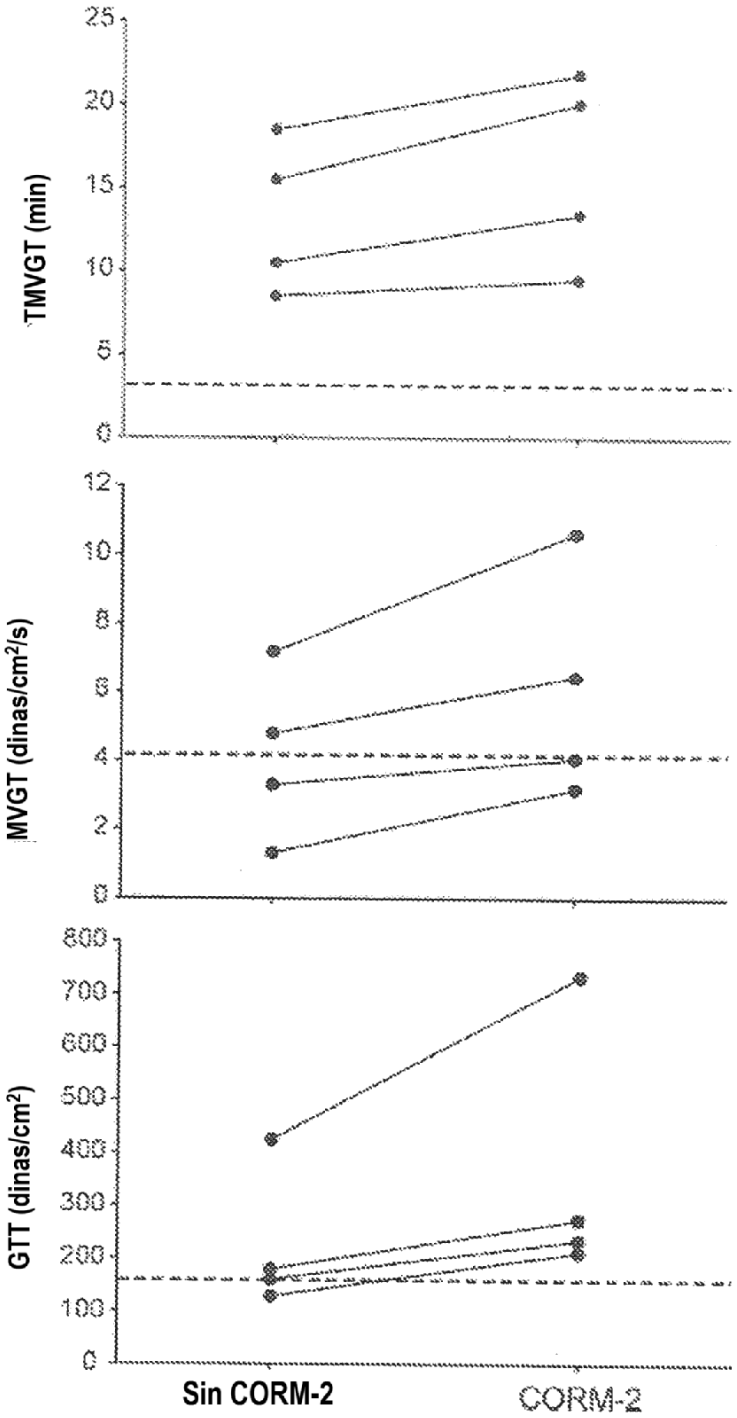
TMVGT (min)
25
20
15
10
5
0
MVGT (dinas/cm²/s)
12
10
8
6
4
2
0
GTT (dinas/cm²)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Sin CORM-2
CORM-2

Figura 17

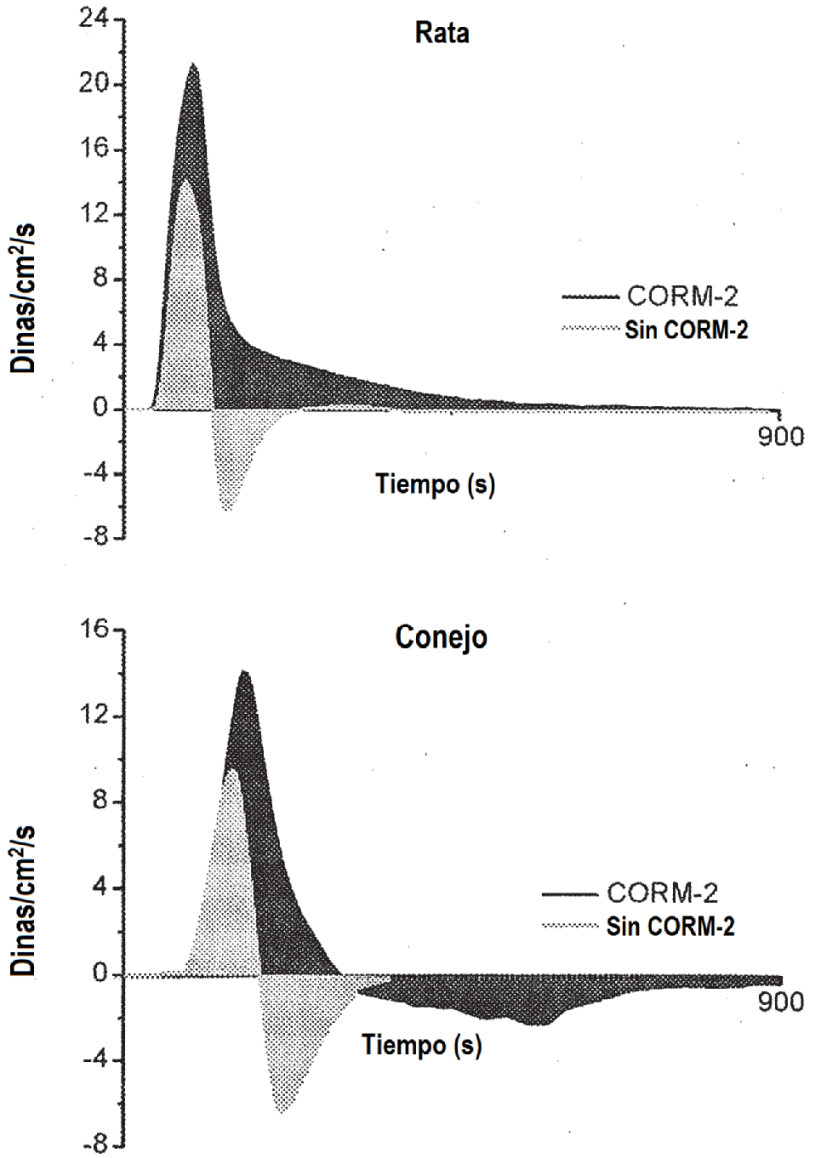
Rata
24
20
16
12
8
4
0
-4
-8
Dinas/cm²/s
CORM-2
Sin CORM-2
900
Tiempo (s)
Conejo
16
12
8
4
0
-4
-8
Dinas/cm²/s
CORM-2
Sin CORM-2
900
Tiempo (s)

Figura 18

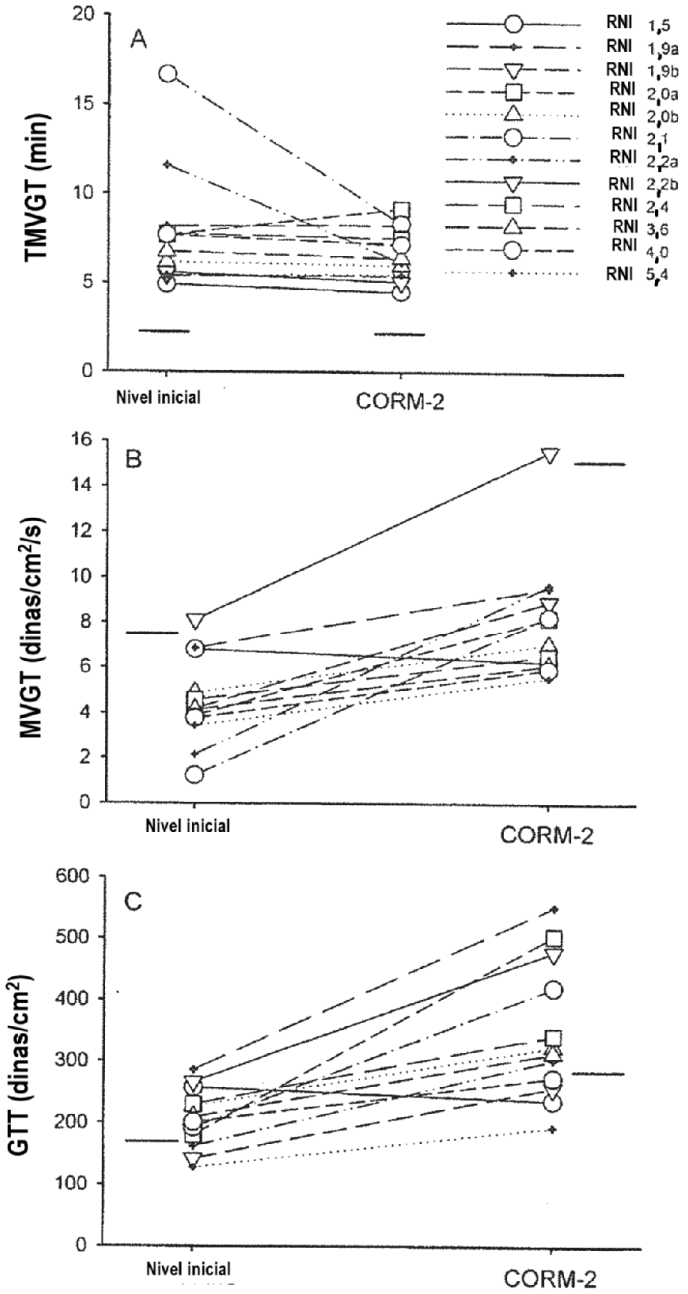
A
TMVGT (min)
20
15
10
5
0
Nivel inicial
CORM-2
RNI 1,5
RNI 1,9a
RNI 1,9b
RNI 2,0a
RNI 2,0b
RNI 2,1
RNI 2,2a
RNI 2,2b
RNI 2,4
RNI 3,6
RNI 4,0
RNI 5,4
B
MVGT (dinas/cm²/s)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Nivel inicial
CORM-2
C
GTT (dinas/cm²)
600
500
400
300
200
100
0
Nivel inicial
CORM-2

Figura 19

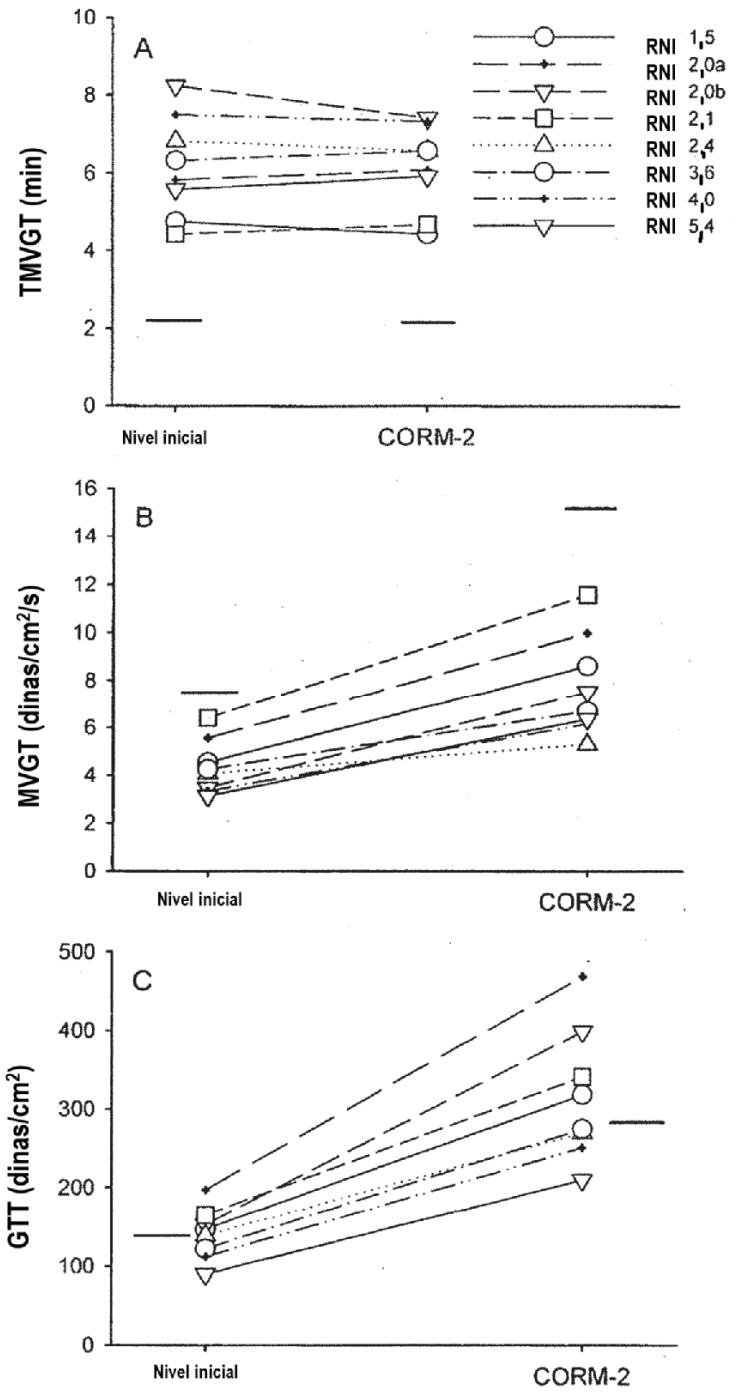
A
TMVGT (min)
10
8
6
4
2
0
Nivel inicial
CORM-2
RNI 1,5
RNI 2,0a
RNI 2,0b
RNI 2,1
RNI 2,4
RNI 3,6
RNI 4,0
RNI 5,4
B
MVGT (dinas/cm²/s)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Nivel inicial
CORM-2
C
GTT (dinas/cm²)
500
400
300
200
100
0
Nivel inicial
CORM-2

Figura 20

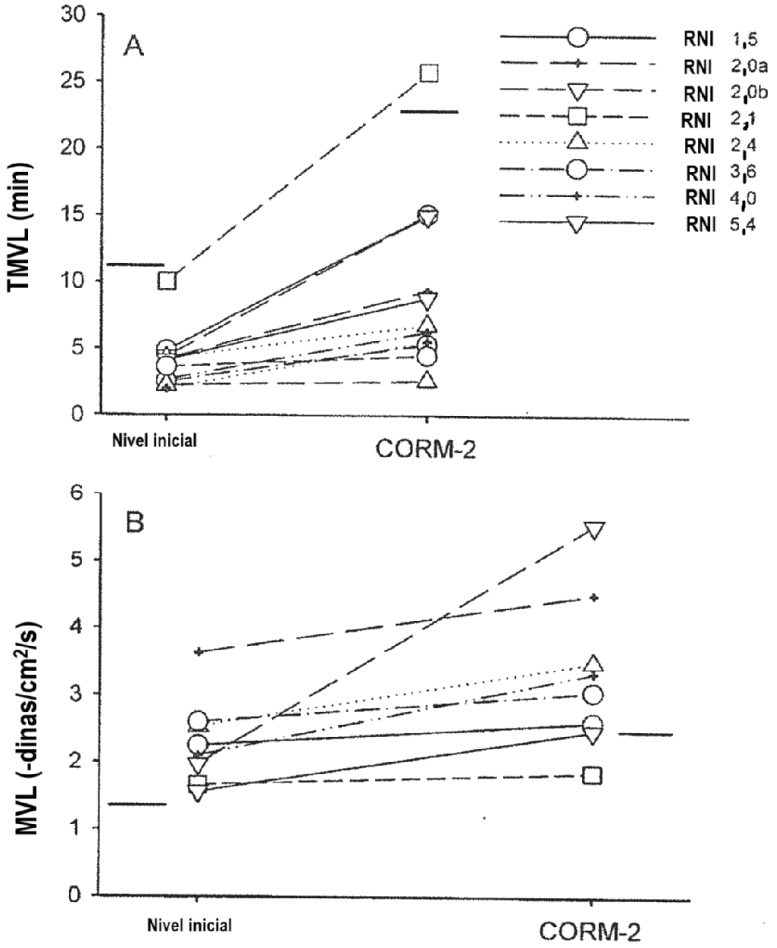
A
TMVL (min)
30
25
20
15
10
5
0
Nivel inicial
CORM-2
RNI 1,5
RNI 2,0a
RNI 2,0b
RNI 2,1
RNI 2,4
RNI 3,6
RNI 4,0
RNI 5,4
B
MVL (-dinas/cm²/s)
6
5
4
3
2
1
0
Nivel inicial
CORM-2

Figura 21

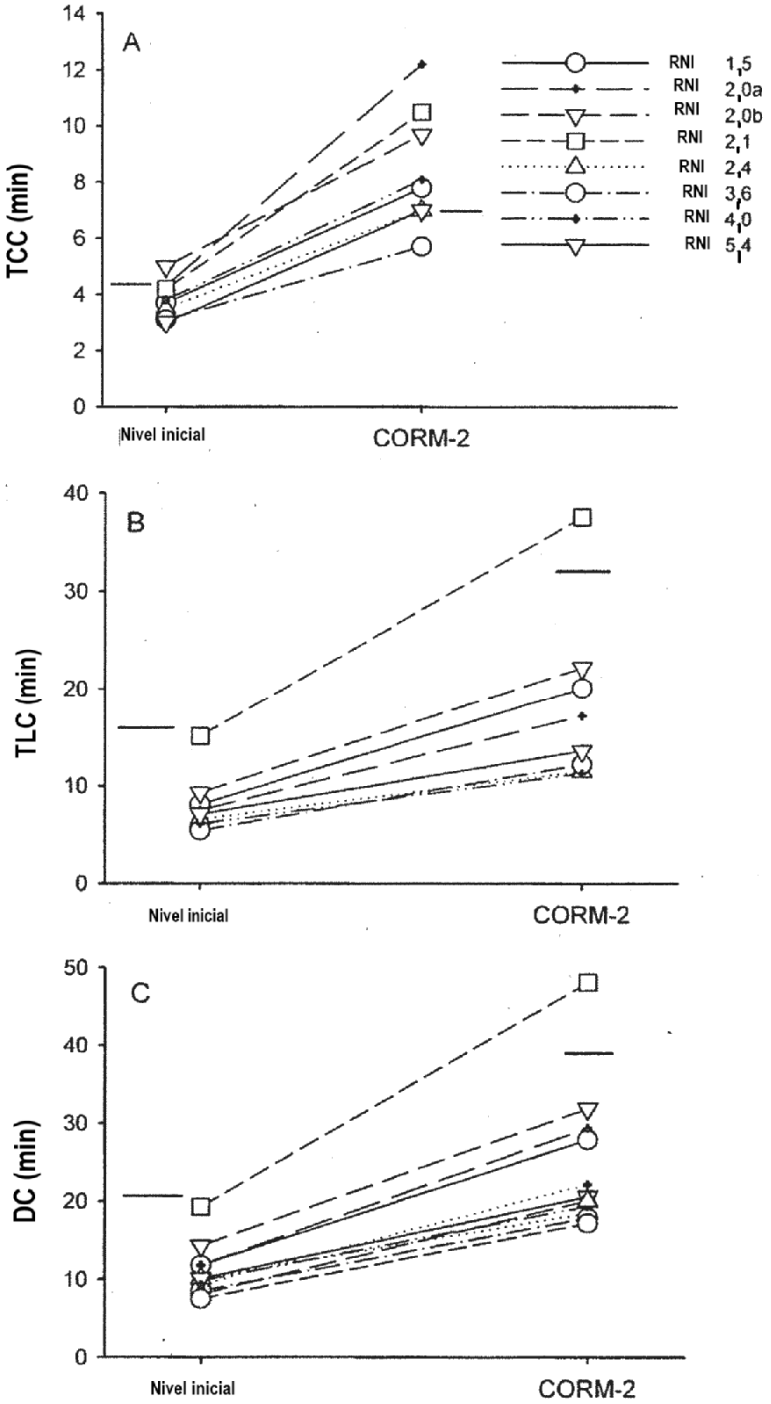
A
TCC (min)
14
12
10
8
6
4
2
0
Nivel inicial
CORM-2
RNI 1,5
RNI 2,0a
RNI 2,0b
RNI 2,1
RNI 2,4
RNI 3,6
RNI 4,0
RNI 5,4
B
TLC (min)
40
30
20
10
0
Nivel inicial
CORM-2
C
DC (min)
50
40
30
20
10
0
Nivel inicial
CORM-2

Figura 22

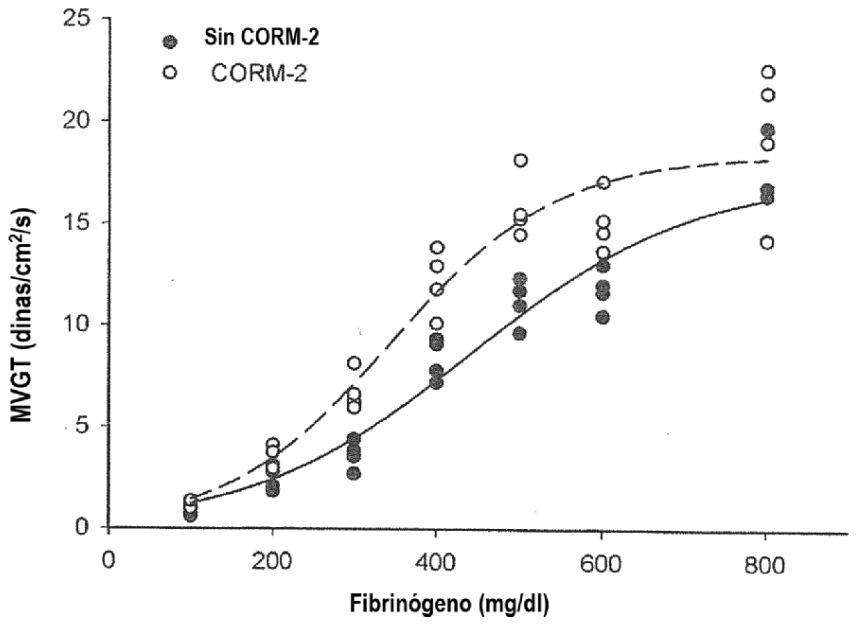

Figura 23

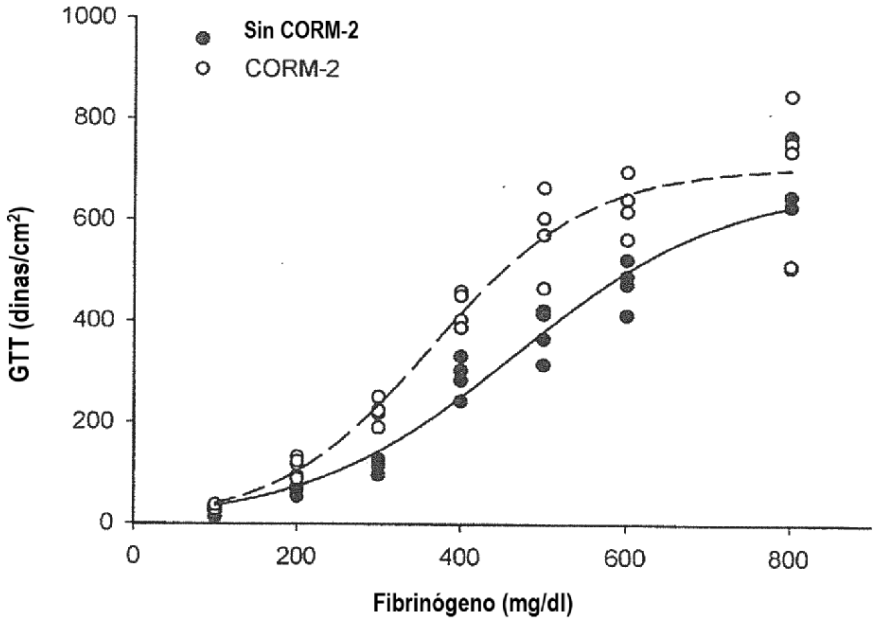

Figura 24

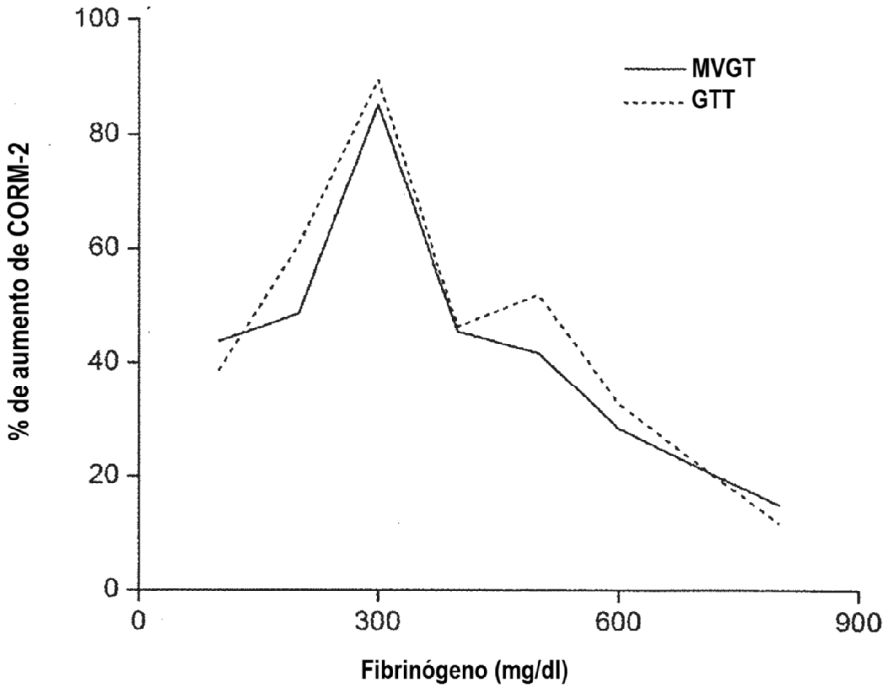
100
80
60
40
20
0
% de aumento de CORM-2
MVGT
GTT
0
300
600
900
Fibrinógeno (mg/dl)

Figura 25

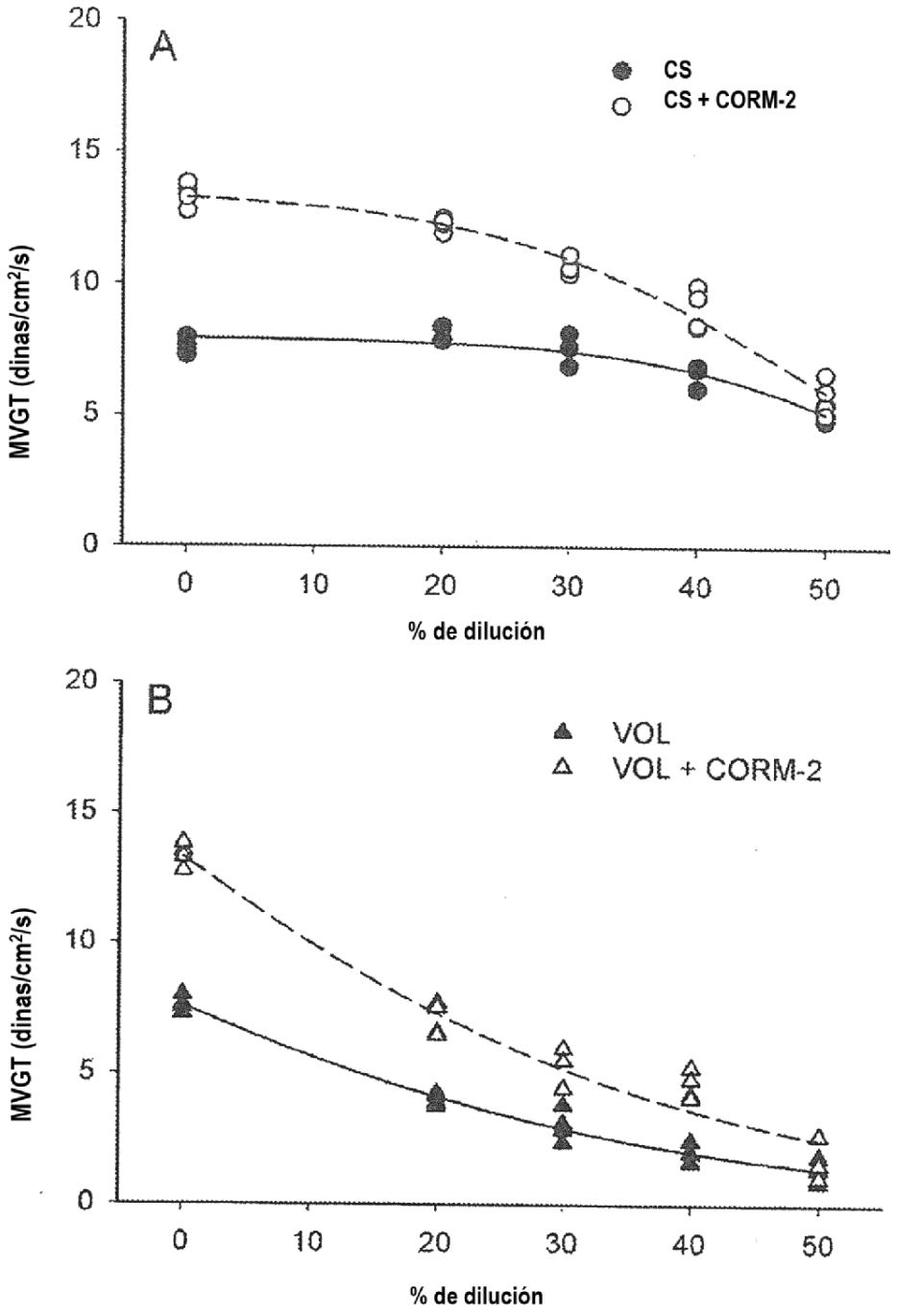
A
CS
CS + CORM-2
MVGT (dinas/cm²/s)
% de dilución
B
VOL
VOL + CORM-2
MVGT (dinas/cm²/s)
% de dilución

Figura 26

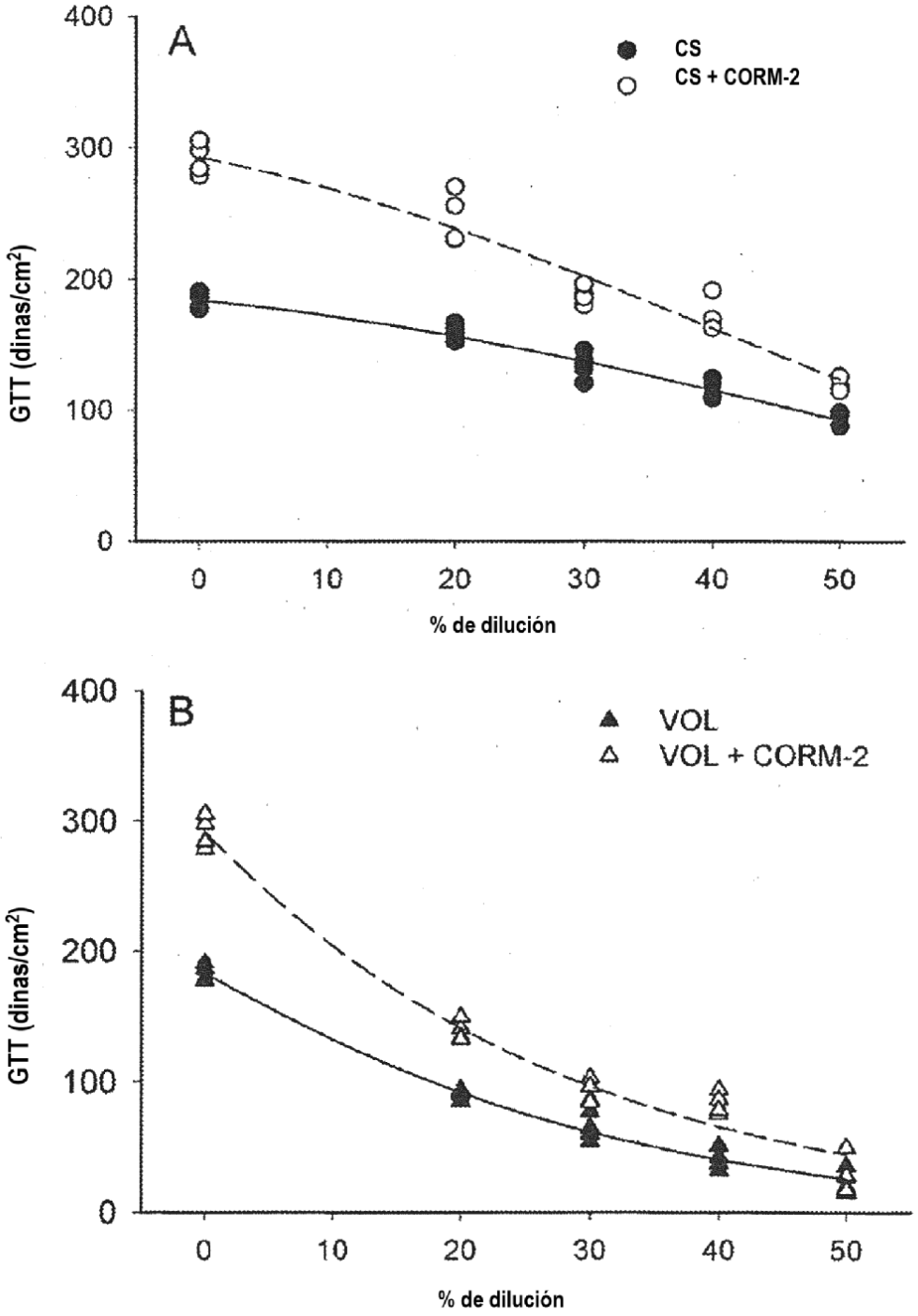
A
CS
CS + CORM-2
GTT (dinas/cm²)
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
% de dilución
B
VOL
VOL + CORM-2
GTT (dinas/cm²)
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
% de dilución

Figura 27

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 61157719 A **[0001]**

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **BRUNE et al.** *Mol Pharmacol,* 1987, vol. 32, 497-504 **[0007]**
- **BRUNE et al.** *Eur. J Biochem,* 1990, vol. 192, 683-688 **[0007]**
- **CHLOPICKI et al.** *Cardiovasc Res,* 2006, vol. 71, 393-401 **[0007] [0050]**
- **TRUE et al.** *Circ Res,* 2007, vol. 101, 893-901 **[0007]**
- **MOTTERLINI et al.** *Circ Res,* 2002, vol. 90, e17-e24 **[0007] [0050]**
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Lippincott, Williams & Wilkins, 2005 **[0017]**
- **STAHL ; WERMUTH.** Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use. Wiley-VCH, 2008 **[0028]**
- **MEGIAS et al.** *Br J Pharm,* 2007, vol. 150, 977-986 **[0050]**
- **DONG et al.** *Eur J Pharmacol,* 2008, vol. 590, 99-104 **[0050] [0051]**
- **MOTTERLINI et al.** *Expert Opin Investig Drugs,* 2005, vol. 14, 1305-1318 **[0050]**
- **NIELSEN et al.** *Acta Anaesthesiol Scand,* 2005, vol. 49, 222-231 **[0051] [0052]**
- **NIELSEN et al.** *Blood Coagul Fibrinolysis,* 2006, vol. 17, 75-81 **[0051] [0052]**