

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 844**

21 Número de solicitud: 201790052

51 Int. Cl.:

A61L 31/16 (2006.01)

A61L 31/08 (2006.01)

C08B 37/10 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

10.06.2016

30 Prioridad:

11.06.2015 US 62/174,308

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.06.2018

71 Solicitantes:

ATTWILL MEDICAL SOLUTIONS INC. (100.0%)
379 Hess Street South
L8P 3R2 Hamilton CA

72 Inventor/es:

BERRY, Leslie Roy y
CHAN, Anthony Kam Chuen

74 Agente/Representante:

ARPE FERNÁNDEZ, Manuel

54 Título: **Dispositivos médicos, sistemas y métodos que utilizan composiciones de anti-trombina heparina.**

57 Resumen:

Se describen productos sanitarios, sistemas y métodos para el tratamiento de afecciones, que utilizan conjugados de antitrombina-heparina. Por ejemplo, los productos sanitarios pueden revestirse con antitrombina-heparina (ATH) con el resultado de una reducción en la trombogenicidad. Igualmente, pueden tratarse diversas afecciones con ATH.

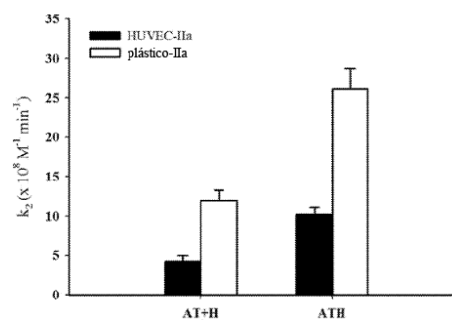


FIG. 1A

DESCRIPCIÓN

Dispositivos médicos, sistemas y métodos que utilizan composiciones de anti-trombina heparina.

5

Antecedentes

La coagulación es el proceso mediante el cual la sangre pasa del estado líquido a un estado de gel. Esto forma parte de la hemostasis, o el proceso mediante el cual el organismo
10 detiene la pérdida de sangre a través de los vasos sanguíneos dañados. Aunque la coagulación es una función conocida del organismo humano, la coagulación puede dar lugar a arduos problemas durante procedimientos médicos como la cirugía y la cateterización intravenosa o intra-arterial. Una parte considerable de la población también puede experimentar trastornos de coagulación, en cuyo caso la presencia de coágulos de sangre no deseados supone un grave
15 riesgo para la salud.

Los procedimientos invasivos, como el bypass cardiopulmonar (BPC), generan enormes cantidades de micro-émbolos de fibrina que pueden alojarse en el cerebro y provocar disfunciones cognitivas a largo plazo. El BPC se lleva a cabo en todo el mundo para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. La utilización del BPC en el área pediátrica
20 representa una operación especializada y sensible. Cada año se practican en Canadá unas 750 operaciones pediátricas, siendo de 7.500 la cifra correspondiente a los EE.UU. o a Europa. Si se incluyen las operaciones practicadas en adultos, todos los años se practican más de 800.000. El coste estimado de una sola operación de BPC en Canadá es de más de \$10.000. En la actualidad, la heparina es el medicamento utilizado en el BPC y su coste anual es de
25 aproximadamente \$50/BPC, o lo que es lo mismo, \$40.000.000 anuales. La heparina no puede impedir que los tromboembolismos se desplacen hacia el cerebro durante el BPC, lo que se encuentra asociado a la disfunción cognitiva, tanto crónica como aguda. Los tromboembolismos también constituyen un factor de riesgo para otras muchas cirugías invasivas. La hemorragia descontrolada tras el BPC es una de las principales fuentes de preocupación a la hora de
30 atender a estos pacientes de alto riesgo.

El tromboembolismo venoso (TEV) es otro problema asociado a la coagulación sanguínea no deseada. Cada año, el TEV afecta a 1-2 de cada 1000 personas, generalmente en forma de trombosis venosa profunda (TVP) de la pierna, o de embolismo pulmonar (EP). La tasa de incidencia aumenta de 1 caso cada 10.000, en el caso de los individuos menores de 40 años, a 1 de cada 100 en el de los mayores de 60 años. Cada año desarrollan TVP aproximadamente 1 millón de personas en los EE.UU., y otras 500.000 desarrollan EP, resultando mortal en un 30% de los casos. En general, aproximadamente dos terceras partes de todos los casos de TEV requieren hospitalización. En un estudio realizado entre 66.000 pacientes con cáncer neutropénico en adultos, la tasa de mortalidad entre los pacientes hospitalizados era sustancialmente más elevada entre aquellos que desarrollaron TEV (14,85%) en comparación con lo que no lo desarrollaron (7,98%). El TEV también se considera responsable del 46,3% de todas las muertes posteriores a una intervención quirúrgica por cáncer. En el Reino Unido, el Gobierno ha calculado que se producen más de 25.000 muertes cada año provocadas por TEV, una cifra superior a la de la suma del número de fallecimientos provocados por cáncer de mama, VIH, y accidentes de tráfico. Está previsto que aumente el número de casos de TEV, debido al envejecimiento de la población en general y a la mayor exposición a factores de riesgo, como la cirugía, los anticonceptivos orales, los viajes de larga distancia y unos niveles de obesidad más elevados.

La deficiencia de plasminógeno es un trastorno muy conocido, que hace que unos niveles reducidos de plasminógeno causen el desarrollo de pseudo-membranas en las superficies de las mucosas. Uno de estos problemas es la conjuntivitis leñosa. La conjuntivitis leñosa es otro ejemplo de una enfermedad en la que se da una coagulación peligrosa. Los pacientes pediátricos que presentan una mutación que provoca una deficiencia de plasminógeno homocigótico tienen como expresión fenotípica una membrana sobre sus ojos (conjuntivitis leñosa) provocada por la coagulación, que causa la formación de coágulos de fibrina. Estas lesiones oculares pseudo-membranosas pueden provocar problemas oculares crónicos, que pueden resultar graves, hasta el punto de una pérdida de visión prácticamente completa. En 2003, se describieron más de 100 casos de niños de todo el mundo que padecían esta afección, pero en los últimos años se han identificado muchos más. El tratamiento actual consiste en raspados frecuentes de la córnea. No obstante, estas manipulaciones quirúrgicas no ofrecen un alivio duradero, y el remodelado de las capas de la superficie epitelial puede causar daños permanentes que afecten a la función ocular. El avance de la enfermedad a largo plazo, aun cuando se efectúe esta retirada física intermitente, puede provocar en los niños

afectados un menor desarrollo físico y dificultades en el proceso de aprendizaje. De este modo, aparte del importante sufrimiento físico padecido por cada individuo, se trata de un problema muy grave, que afecta enormemente a la salud del niño a lo largo de toda su vida. Sería muy deseable que se concibiese un método no invasivo que preserve la vista de estos pacientes. Se desconoce el número actual de pacientes afectados por la conjuntivitis leñosa. Sin embargo, en un estudio realizado en 1996 se demostró que la prevalencia de la deficiencia de plasminógeno heterocigótico de tipo I era del 0,25% (25 de 9611 sujetos), lo que se corresponde con una prevalencia del compuesto homocigótico/heterocigótico de 1,6 por cada 1.000.000 habitantes. Los tratamientos por vía tópica mediante corticosteroides, hialuronidasa y antibióticos han tenido un éxito variable. Normalmente, suele llevarse a cabo una intervención quirúrgica para extirpar la masa leñosa, pero sirve de poco para impedir la recurrencia del problema, por lo que es necesario repetir el procedimiento.

El Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR) es un trastorno común que implica la existencia de fibrosis pulmonar. Aproximadamente un 1% de todos los niños nacen con un peso inferior a 1.500 gramos, y la gran mayoría padece SDR. Los bebés con un peso inferior a 1.000 gramos en el momento del nacimiento tienen una incidencia muy elevada de SDR, y entre el 50 y el 80% de estos niños fallecen o desarrollan displasia broncopulmonar (DBP). De hecho, el SDR sigue siendo la principal causa de mortalidad y morbilidad entre los recién nacidos prematuros. Aunque el uso de agentes tensioactivos ha reducido la gravedad y ha mejorado ligeramente la tasa de mortalidad causada por SDR en niños prematuros, sigue dándose una importante incidencia de SDR/DBP y de casos graves de DBP. Tanto en el caso de los niños como en el de los adultos, las infecciones, los factores medioambientales y los componentes genéticos pueden provocar episodios agudos de SDR que evolucionen a estados disfuncionales crónicos de la enfermedad, que implican una remodelación del tejido y de las estructuras pulmonares.

El daño pulmonar es una situación que ejerce un gran impacto sobre la calidad de vida, y que puede implicar un significativo riesgo de mortalidad. Las causas subyacentes conocidas de las lesiones pulmonares son consecuencia de factores tanto crónicos como agudos. Recientemente, se piensa de forma cada vez más extendida que los daños mecánicos provocados por un elevado estrés pulmonar contribuyen de forma importante a la aparición de lesiones pulmonares. El tratamiento de respiración asistida mediante ventilación mecánica puede provocar un trauma que fomente el avance de lesiones localizadas en pacientes con SDR agudo. Aunque un volumen tidal bajo puede ofrecer unos mejores resultados, la

mortalidad sigue resultando inaceptablemente elevada. De hecho, los ventiladores pueden provocar directamente daños pulmonares por sí mismos, y los informes están destacando actualmente los marcadores biológicos de las lesiones pulmonares asociadas a la ventilación. Tras las causas básicas que llevan a daños clínicos en los pulmones, se está dando una

5 creciente concienciación de las asociaciones con nuevos mecanismos de interbloqueo. Desde hace muy poco está comprobándose cada vez más que la coagulación, desencadenada por una lesión pulmonar inicial, contribuye al desarrollo de una inflamación pulmonar y de fibrosis en casos de SDR agudo. El aumento del factor tisular (FT) es un marcador asociado al desarrollo del SDR. Durante algún tiempo se ha sabido que la deposición de fibrina alveolar

10 puede predisponer a los bebés a complicaciones relacionadas con la DBP, aunque los daños relacionados con la fibrina durante el SDR/DBP no resultan siempre obvios, debido a su rápida separación del pulmón. No obstante, aún en ausencia de coágulos de fibrina entrecruzada, unos bajos niveles de productos de monómeros de fibrina interfieren con la función tensioactiva y coadyuvan a la remodelación de la superficie alveolar y a la fibrosis causada por la

15 acumulación de fibroblastos. De forma parecida, se están admitiendo las relaciones entre las lesiones pulmonares inducidas por la ventilación y la coagulación. Una vez más, se sugiere que el aumento de la expresión del FT causado por la agresión ventilatoria es uno de los factores que contribuyen a las complicaciones causadas por trombos, y que provocan un aumento de los daños pulmonares. De hecho, el tratamiento de ventilación con un elevado volumen tidal puede

20 causar coagulación pulmonar y sistémica asociada al FT en neonatos.

La coagulación sanguínea también puede provocar problemas con los dispositivos que se encuentran en contacto con la sangre, como los catéteres y stents. Estos dispositivos tienden a sufrir fallos provocados por la trombosis inducida por la superficie. La coagulación es un importante problema clínico con los catéteres de acceso venoso central. Los catéteres se

25 utilizan para extraer sangre y administrar medicamentos a numerosos pacientes afectados por diversos problemas que requieren acceso venoso frecuente y a largo plazo. En condiciones ideales, debería ser posible dejar un catéter colocado durante meses o incluso años, pero los catéteres se caracterizan por su proclividad hacia los coágulos. De hecho, en el caso de los niños, la mayoría de las trombosis están relacionadas con los catéteres. Por ejemplo, un 89%

30 de las trombosis venosas y arteriales en neonatos implican la presencia de un catéter intravascular, y un 78% de las trombosis aórticas en niños están relacionadas con los catéteres. Un estudio llegaba a la conclusión de que la presencia de un catéter constituía el mayor factor de riesgo de trombosis en niños. En total, de los pacientes de todas las edades a los que se

aplican catéteres venosos, hasta un 26% sufren complicaciones trombóticas relacionadas con el catéter. Aunque el mecanismo de la trombosis inducida por la superficie no se ha llegado a elucidar por completo, se cree que la absorción de la proteína tiene lugar muy poco después de que la superficie entre en contacto con la sangre, y está seguida por una adherencia y activación de las plaquetas, así como de los leucocitos, lo que tiene como consecuencia en último término la formación de un coágulo. Los trombos formados en el interior del lumen de un catéter hacen que el catéter resulte inservible para la extracción de la sangre o la administración de líquidos y medicamentos. Los coágulos que se forman en la parte exterior del catéter pueden provocar una trombosis venosa profunda y embolización, y puede dañar la integridad del vaso, con los consiguientes dolores e inflamación. Ambas situaciones provocan incomodidad al paciente, alteran el cuidado médico del paciente y hacen que sean necesarios más recursos para su atención. El tratamiento de un catéter obstruido requiere una terapia trombolítica o la sustitución del catéter. El resultado es una mayor incomodidad e inconveniencia para el paciente, así como un mayor coste del tratamiento.

La sustitución de un catéter venoso central (CVC) es un procedimiento muy invasivo que hace que los pacientes experimenten dolores y tengan que sufrir estancias hospitalarias prolongadas, y que impide a los médicos disponer de tiempo suficiente para atender a otros pacientes, por causa de la cirugía sustitutiva. La atención al paciente también se degrada, ya que los tratamientos se interrumpen o cancelan debido al fallo de sus CVC. Los coágulos que se forman en los CVCs también pueden disgregarse y viajar a través del torrente sanguíneo hacia otras partes del organismo, causando graves complicaciones. Por lo tanto, estos coágulos pueden conducir a una prolongada estancia hospitalaria, a la interrupción del tratamiento esencial a los pacientes, a disfunciones neurocognitivas e incluso a la muerte.

Es de esperar que el envejecimiento de la población tenga como resultado un aumento de la incidencia de las enfermedades arteriales coronarias, insuficiencias cardíacas y accidentes cerebro-vasculares. Por lo tanto, también se espera que aumenten los problemas provocados por enfermedades relacionadas con la coagulación, la formación no deseada de coágulos en productos sanitarios y la coagulación durante las intervenciones médicas, lo que acarreará una pesada carga financiera para el sector de la sanidad.

Breve descripción de las figuras

La figura 1A es un gráfico de los valores de la constante de segundo orden (k_2) para la inhibición de IIa por parte de ATH y el conjugado AT + H no covalente, según los ejemplos de la presente invención.

La figura 1B es un gráfico de los valores de la constante de segundo orden (k_2) para la inhibición de Xa por parte de ATH y el conjugado AT + H no covalente, según los ejemplos de la presente invención.

La figura 2 es un gráfico que muestra el tiempo de retardo de la inhibición de la formación de fibrina inducida por IIa provocada por ATH y AT + H en presencia de endotelio, según los ejemplos de la presente invención..

La figura 3A es un gráfico que muestra el tiempo de retardo de la inhibición de la formación de fibrina inducida por IIa ligada al heparán sulfato (HS), según los ejemplos de la presente invención.

La figura 3B es un gráfico que muestra el tiempo de retardo de la inhibición de la formación de fibrina inducida por IIa ligada a la trombomodulina (TM), según los ejemplos de la presente invención.

La figura 4A es un gráfico que muestra el tiempo de coagulación de muestras de plasma procedente de ratas tratadas con una solución tampón de PBS intrapulmonar, con y sin un elevado volumen de ventilación mecánica durante una hora, según los ejemplos de la presente invención.

La figura 4B es un gráfico que muestra el tiempo de coagulación de muestras de plasma procedente de ratas tratadas con ATH intrapulmonar, con y sin un elevado volumen de ventilación mecánica durante una hora, según los ejemplos de la presente invención.

La figura 5 muestra inmunotransferencias de medios celulares incubados con una solución tampón (de control) o con ATH, según los ejemplos de la presente invención.

Cabe señalar que las figuras no constituyen sino meros ejemplos de diversas realizaciones, y no pretenden establecer limitación alguna al alcance de la presente tecnología.

Descripción detallada

A continuación se hará referencia a una serie de ejemplos de realización, y se utilizará un lenguaje específico para describirlos. No obstante, ha de entenderse que ello no pretende introducir limitación alguna en el alcance de la invención. Cualesquiera alteraciones y modificaciones adicionales de las características de la invención que se describen en el

presente documento, así como las aplicaciones adicionales de los principios de la tecnología que aquí se describen, y que podrían ocurrírsele a cualquier experto en la técnica que se encuentre en posesión de esta invención, han de considerarse incluidas dentro del alcance de la invención. Asimismo, antes de pasar a revelar y describir las realizaciones específicas, ha de entenderse que dicha revelación no se limita al proceso y materiales específicos que se describen en el presente documento, ya que pueden variar en cierta medida. También ha de entenderse que la terminología usada en este documento se utiliza tan sólo con el fin de describir unas realizaciones específicas, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que viene definida exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas y otras equivalentes a las mismas.

A la hora de describir y reivindicar la presente tecnología se utilizará la siguiente terminología.

Las formas en singular, “un,” y “el” incluyen las referencias al plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Así pues, por ejemplo, la referencia a “un aditivo” incluye referencias a uno o más de dichos componentes, “una solución” incluye referencias a uno o más de dichos materiales, y “una fase de mezcla” se refiere a una o más de dichas fases.

Tal y como se utiliza en el presente documento, “sustancial” cuando se usa en referencia a una cantidad de un material, o a una característica específica del mismo, se refiere a una cantidad suficiente para conseguir el efecto que pretende conseguir dicho material o característica. El grado exacto de desviación permisible puede depender en ocasiones del contexto específico.

Tal y como se utiliza en el presente documento, “aproximadamente” se refiere a un grado de desviación basado en el error experimental característico de la propiedad específica identificada. La latitud inherente al término “aproximadamente” dependerá del contexto específico y de la propiedad concreta, y podrá ser fácilmente percibida por cualquier experto en la técnica. El término “aproximadamente” no pretende expandir ni limitar el grado de equivalentes que en otro caso podrían asignarse a un valor específico. Además, a menos que se indique otra cosa, el término “aproximadamente” incluye expresamente “exactamente,” en línea con lo que se comenta más abajo en relación con rangos y datos numéricos.

Las concentraciones, dimensiones, cantidades y otras magnitudes numéricas pueden adoptar en este documento un formato de rango. Ha de entenderse que dicho formato de rango se utiliza exclusivamente por fines de conveniencia y brevedad, y que ha de interpretarse de forma flexible, a fin de que incluya no sólo los valores numéricos explícitamente indicados como

límites del rango, sino también la totalidad de los valores numéricos individuales o sub-rangos incluidos en dicho rango, como si se enumerase explícitamente cada uno de los valores numéricos y sub-rangos. Por ejemplo, un rango que oscile desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 200 habrá de interpretarse de forma que incluya no sólo los límites explícitamente enumerados de 1 y 200, sino también magnitudes individuales, como 2, 3, 4, y sub-rangos, como de 10 a 50, de 20 a 100, etc.

Tal y como se utiliza en el presente documento, una pluralidad de componentes, elementos estructurales, elementos compositivos, y/o materiales puede presentarse por comodidad en una lista común. No obstante, dichas listas habrían de interpretarse como si cada uno de los integrantes de la lista se identificase individualmente como un integrante único y diferenciado. De este modo, no podrá interpretarse que ninguno de los integrantes individuales de dicha lista constituye un equivalente de facto a cualquier otro integrante de la misma lista, basándose exclusivamente en su presentación dentro de un grupo común sin que medie indicación alguna en otro sentido.

Tal y como se utiliza en el presente documento, “hexosa” se refiere a un carbohidrato ($C_6H_{12}O_6$) con seis átomos de carbono. Las hexosas pueden ser aldohexosas, como por ejemplo, glucosa, manosa, galactosa, idosa, gulosa, talosa, alosa y altrosa, cuya forma de cadena abierta contiene un grupo aldehído. Alternativamente, las hexosas pueden ser cetosas, como fructosa, sorbosa, alulosa y tagatosa, cuya forma de cadena abierta contiene un grupo cetona.

Tal y como se utiliza en el presente documento, “ácido urónico” se refiere al ácido carboxílico formado por la oxidación del grupo hidroxilo primario de un carbohidrato, y normalmente reciben su nombre del carbohidrato del que se han obtenido. Por lo tanto, mediante la oxidación del hidroxilo C6 de la glucosa se obtiene ácido glucurónico, con la del hidroxilo C6 de la galactosa se obtiene ácido galacturónico, y mediante la oxidación del hidroxilo C6 de la idosa se obtiene ácido idurónico.

Tal y como se utiliza en el presente documento, “hexosamina” se refiere a un derivado de la hexosa en el que al menos un grupo hidroxilo, normalmente el grupo hidroxilo C2, ha sido sustituido por una amina. La amina puede haber sido opcionalmente alquilada, acilada (por ejemplo, con ácido murámico), normalmente mediante un grupo acetilo, sulfonada (N-sulfatada), sulfonilada, fosforilada, fosfonilada y similares. Entre los ejemplos representativos de las hexosaminas se encuentran la glucosamina, la galactosamina, la tagatosamina, la fructosamina, sus análogos modificados y similares.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "glicosaminoglicano" se refiere a cadenas lineales largamente repetitivas de unidades de disacáridos que contienen una hexosamina y un ácido urónico. Las identidades precisas de la hexosamina y del ácido urónico pueden experimentar grandes variaciones, y en las anteriores definiciones pueden encontrarse ejemplos representativos de cada una. Opcionalmente, el disacárido puede modificarse mediante alquilación, acilación, sulfonación (O- o N-sulfatado), sulfonilación, fosforilación, fosfonilación y similares. El grado de dicha modificación puede variar mucho, y puede encontrarse en un grupo hidroxilo o en un grupo amino. Normalmente, el hidroxilo C6 y la amina C2 están sulfatados. La longitud de la cadena puede ser variable, y el glicosaminoglicano puede tener un peso molecular superior a 200.000 daltons, normalmente de hasta 100.000 daltons, y más normalmente, inferior a 50.000 daltons. Los glicosaminoglicanos pueden encontrarse normalmente como mucopolisacáridos. Entre los ejemplos más representativos se encuentran la heparina, el sulfato de dermatán, el sulfato de heparán, el condroitín-6-sulfato, el condroitín-4-sulfato, el sulfato de queratán, el condroitín, el ácido hialurónico, polímeros que contienen N-acetil monosacáridos (como el ácido N-acetilneuramínico, la N-acetil glucosamina, la N-acetil galactosamina, y el ácido N-acetil murámico) y similares, así como gomas, como la goma arábica, la goma tragacanto y similares.

La "heparina" es un polisacárido sulfatado que en buena medida consiste en una secuencia alternante de ácido hexaurónico y 2-amino-2-desoxi-D-glucosa. La heparina y un compuesto relacionado con ella, el dermatán sulfato, funcionan apropiadamente como anticoagulantes de uso clínico en la prevención de la trombosis y enfermedades relacionadas. Son miembros de la familia de los glicosaminoglicanos, (GAGs), que son cadenas lineales de unidades de disacáridos repetitivos sulfatados que contienen una hexosamina y un ácido urónico. La anticoagulación mediante GAGs (como la heparina y el dermatán sulfato) se lleva a cabo mediante sus catálisis de inhibición de enzimas coagulantes (siendo una de las más importantes la trombina) mediante inhibidores de la serina proteasa (serpinas) como la antitrombina III (denominada simplemente "antitrombina" o "AT" en este documento) y el cofactor II de la heparina (HCII). El enlace de las serpinas por los catalizadores tiene lugar por acción las anteriores, y se produce mediante secuencias específicas a lo largo de la cadena lineal de carbohidratos del glicosaminoglicano (GAG). La heparina actúa uniéndose a la AT mediante una secuencia de pentasacáridos, potenciando de esta forma la inhibición de diversas enzimas coagulantes (en el caso de la trombina, la heparina también se une a la enzima). La heparina también puede potenciar la inhibición de la trombina mediante su enlace con la

serpina HCII. El dermatán sulfato actúa enlazándose específicamente al HCII mediante una secuencia de hexasacáridos, potenciando de este modo tan sólo la inhibición de la trombina. Teniendo en cuenta que los glicosaminoglicanos (especialmente, la heparina) pueden unirse a otras moléculas *in vivo* o perderse del emplazamiento de la acción a causa de diversos mecanismos, resultaría ventajoso mantener a los GAG permanentemente asociados a la serpina mediante un enlace covalente. De forma más detallada, resultaría deseable proporcionar conjugados covalentes de heparina y glicosaminoglicanos semejantes que conservan una elevada actividad biológica (por ejemplo, su actividad anticoagulante) y unas mejores propiedades farmacocinéticas, así como unos métodos sencillos de preparación.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "proteína" incluye, entre otras, las albúminas, globulinas (por ejemplo, inmunoglobulinas), histonas, lectinas, protaminas, prolaminas, glutelinasfosfolipasas, proteínas antibióticas y escleroproteínas, así como proteínas conjugadas, como fosfoproteínas, cromoproteínas, lipoproteínas, glicoproteínas y nucleoproteínas.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "serpina" se refiere a un inhibidor de la serina proteasa, y entre sus ejemplos se encuentran especies como la antitrombina y el cofactor II de la heparina.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "amina" se refiere a aminas primarias, RNH_2 , aminas secundarias, RNH(R') , y aminas terciarias, $\text{RN(R')}(R'')$.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "amino" se refiere al grupo NH o NH_2 .

Tal y como se utiliza en el presente documento, "imina" se refiere al grupo C=N y a sus sales.

Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos "tratamiento" de una condición y/o de una enfermedad en un mamífero, significa: la prevención de dicha condición o enfermedad, es decir, evitar cualquier tipo de síntomas clínicos de la enfermedad; inhibición de la condición o enfermedad, es decir, detener el desarrollo o el avance de los síntomas clínicos; y/o aliviar la condición o enfermedad, es decir, provocar el retroceso de los síntomas clínicos. Tratamiento también incluye la utilización de las composiciones según la presente invención asociadas a un procedimiento médico, administrándose antes, durante o después de dicho procedimiento médico.

De acuerdo con la información preliminar descrita anteriormente, la presente invención se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento de las afecciones que implican coagulación. En un ejemplo, un método de revestimiento de una superficie polimérica con un

conjugado de antitrombina-heparina puede incluir el poner en contacto la superficie polimérica con una solución del conjugado de antitrombina-heparina. El conjugado de antitrombina-heparina puede revestir directamente la superficie de poliuretano sin ningún grupo ligante entre el conjugado de antitrombina-heparina y la superficie polimérica.

5 En otro ejemplo, un producto sanitario con una reducida trombogenicidad puede incluir una superficie polimérica revestida con un conjugado de antitrombina-heparina sin grupos ligantes entre el conjugado de antitrombina-heparina y la superficie polimérica.

10 En un ejemplo adicional, un método de revestimiento de una superficie polimérica de un producto sanitario mediante liofilización puede incluir la puesta en contacto de la superficie polimérica del producto sanitario con una solución de antitrombina-heparina que comprenda un conjugado de antitrombina-heparina y un disolvente, en ausencia de grupos ligantes. De ese modo, el exceso de solución de antitrombina-heparina puede eliminarse de la superficie polimérica dejando que se seque. A continuación puede evaporarse el disolvente de la superficie polimérica, en un vacío al menos parcial.

15 Un ejemplo adicional implica un método de tratamiento de una afección médica mediante la inhibición de la trombogénesis en un mamífero. El método puede incluir la administración al mamífero de una dosis de un conjugado de antitrombina-heparina, en la que al menos un 98% de las cadenas de heparina del conjugado de antitrombina-heparina tienen un peso molecular superior a 3.000 daltons.

20 En otro ejemplo, un método de tratamiento de la conjuntivitis leñosa en un mamífero puede incluir la administración de una dosis de un conjugado de antitrombina-heparina en uno de los ojos del mamífero.

25 En otro ejemplo adicional, un método de tratamiento de una lesión causada a un mamífero por la ventilación mecánica puede incluir la administración de una dosis de un conjugado de antitrombina-heparina en el pulmón lesionado del mamífero.

 En un ejemplo adicional, un método de tratamiento de la gingivitis leñosa en un mamífero puede incluir la administración de una dosis de un conjugado de antitrombina-heparina en las encías del mamífero.

30 En un ejemplo independiente, una solución de lavado y sellado de un catéter intravenoso o intra-arterial puede incluir un conjugado de antitrombina-heparina.

 Otro ejemplo se refiere a un método para el mantenimiento de la permeabilidad de un catéter. El método puede incluir la inserción de un catéter en una vena o arteria de un paciente, de forma que se abra una abertura interior del catéter en el interior de la vena o arteria,

abriéndose una abertura exterior del catéter en el exterior del paciente. Puede inyectarse en el catéter una solución que contenga un conjugado de antitrombina-heparina a través de la abertura exterior del catéter. A continuación, la abertura exterior del catéter puede precintarse, de forma que al menos una parte de la solución que comprende el conjugado de antitrombina-heparina permanezca en el interior del catéter.

En otro ejemplo adicional, una composición para el tratamiento de coágulos de sangre puede incluir antitrombina, heparina, y fibrina. Al menos un 50 % en peso de la heparina puede conjugarse con antitrombina para la obtención de un conjugado de antitrombina-heparina. Al menos una porción de la fibrina puede adherirse al conjugado de antitrombina-heparina.

En otro ejemplo, un método para el tratamiento de una afección o enfermedad puede incluir la administración, a un mamífero que lo precise, de un conjugado de antitrombina-heparina preparado de acuerdo con los ejemplos de la tecnología actual. De forma más detallada, estos tratamientos pueden llevarse a cabo mediante la administración de los conjugados de heparina y antitrombina de la presente invención a un paciente, como un ser humano, que necesite dicho tratamiento. Las afecciones y enfermedades que pueden ser tratadas mediante la utilización de las composiciones de conjugados que se describen en el presente documento incluyen los infartos de miocardio y una gran variedad de estados tromboticos. Entre estos se encuentran los depósitos de fibrina en el caso del síndrome de dificultad respiratoria neonatal, el síndrome de dificultad respiratoria en adultos, carcinoma primario del pulmón, linfomas no-Hodgkins, alveolitis fibrosante, y transplantes de pulmón, por nombrar tan sólo unos cuantos. Igualmente, mediante la presente invención pueden tratarse los estados de deficiencia adquirida de AT, como el síndrome de dificultad respiratoria neonatal, la deficiencia inducida por la L-asparaginasa, la deficiencia inducida por un bypass cardiopulmonar, la sepsis o los estados de deficiencia congénita de AT. En el caso de la deficiencia congénita de AT, pueden producirse complicaciones tromboticas que representen una amenaza para la vida, con unos niveles de AT inferiores a 0,25 Unidades/ml en heterocigotos que requieran AT más heparina, en hasta 1 o 2 niños al año en los EE.UU. Las afecciones y enfermedades tratadas mediante la presente invención incluyen aquellas que se caracterizan por un exceso de generación o actividad de la trombina. A menudo se producen estas condiciones cuando el paciente se ha visto expuesto a un trauma, por ejemplo en el caso de los pacientes quirúrgicos. Los traumas provocados por las heridas o la cirugía generan daños vasculares y la activación secundaria de la coagulación de la sangre. Estos efectos no deseables pueden darse tras una intervención de cirugía general u ortopédica, cirugía

ginecológica, cirugía cardíaca o vascular, u otros procedimientos quirúrgicos. Un exceso de trombina también puede complicar la evolución de enfermedades naturales, como la arterioesclerosis, lo que puede ser causa de ataques cardíacos, accidentes cerebro-vasculares o gangrena de los miembros. Por lo tanto, los métodos y composiciones de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento, la prevención o la inhibición de diversas complicaciones cardiovasculares, incluyendo angina inestable, infarto de miocardio agudo (ataque cardíaco), accidentes cerebro-vasculares (ictus), embolismos pulmonares, trombosis venosa profunda, trombosis arterial, etc. Las composiciones y métodos de la invención se pueden utilizar para reducir o prevenir la coagulación durante la diálisis y reducir o prevenir la coagulación intravascular durante los procedimientos quirúrgicos a corazón abierto. De forma más detallada, en algunos aspectos de la invención, se facilitan métodos y composiciones para prevenir o inhibir la generación de trombina o su actividad en pacientes con un mayor riesgo de desarrollo de trombos, a causa de afecciones médicas que perturban la hemostasis (por ejemplo, enfermedad arterial coronaria, arterioesclerosis, etc.). En otro aspecto, se facilitan métodos y composiciones para pacientes que sufran un mayor riesgo de desarrollar un trombo con posterioridad a un procedimiento médico, como cirugía cardíaca, cirugía vascular o intervenciones coronarias percutáneas. En una realización, se utilizan los métodos y composiciones de la presente invención para procedimientos quirúrgicos de bypass cardiopulmonar. Las composiciones se pueden administrar antes, durante y después de dicho procedimiento.

Volviendo ahora al conjugado de antitrombina-heparina utilizado en las composiciones y tratamientos que se describen en la presente invención, el conjugado de antitrombina-heparina aporta diversas ventajas como anti-trombótico frente a la heparina.

El conjugado de antitrombina-heparina (ATH) puede prepararse mediante una unión covalente de cadenas de heparina a la antitrombina (AT). La heparina contiene enlaces terminales de aldosa que coexisten en equilibrio entre las formas hemiacetal y aldehído. La heparina puede conjugarse con la antitrombina mediante la reducción de la base de Schiff simple formada espontáneamente entre el aldehído de la aldosa terminal de la heparina y un amino lisil o N-terminal de la antitrombina. La heparina queda sin modificarse (sin reducir sus actividades) con anterioridad a la conjugación, y se une en un emplazamiento específico en uno de los extremos de la molécula sin ningún grupo de activación no bloqueado ni intercambio de enlaces de la antitrombina.

Normalmente, la reacción se lleva a cabo a un pH de entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 9, o de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 8, o incluso de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8. La reacción tiene lugar por lo general en medio acuoso. No obstante, los medios orgánicos, y especialmente los disolventes orgánicos hidrófilos polares, como los alcoholes, éteres, formamidas y similares se pueden utilizar en unas proporciones de hasta aproximadamente un 40% para aumentar la solubilidad o reactividad de los reactivos, si fuese necesario. También pueden utilizarse amortiguadores no nucleófilos, como fosfato, acetato, bicarbonato y similares.

Las iminas formadas por la condensación de las aminas de la AT con los residuos de la heparina de la aldosa terminal pueden reducirse y obtenerse las correspondientes aminas. Esta reducción puede llevarse a cabo simultáneamente con la formación de la imina o con posterioridad a esta. Puede utilizarse una amplia gama de agentes reductores, con agentes reductores de los hidruros, siendo ejemplos específicos útiles el borohidruro de sodio o el cianoborohidruro de sodio. En general, puede utilizarse cualquier agente reductor que no reduzca los enlaces disulfuro.

Alternativamente, si no se desea la reducción de la imina intermedia, la imina puede incubarse durante un período de tiempo suficiente, generalmente de un día a un mes, más generalmente de entre 3 días y 2 semanas, a fin de permitir la transposición de Amadori en la amina intermedia. Los residuos de aldosa terminal de la heparina conjugada mediante los métodos descritos en esta invención pueden poseer grupos hidroxilo C2 en el residuo de aldosa terminal, es decir, una fracción 2-hidroxi carbonil que se convierte en una imina 2-hidroxi por condensación con la amina de la AT conjugada con la heparina. En la transposición de Amadori, la imina α -hidroxi (imina en C1, hidroxi en C2) formada por la condensación inicial puede transponerse para formar una α -cetoamina por enolización y reprotonación (ceto en C2, amina en C1). La amina α -carbonil resultante se ve favorecida termodinámicamente con respecto a la imina precursora α -hidroxi, facilitando de este modo un aditivo estable con una mínima interrupción de la cadena heparina. De este modo, la heparina puede conjugarse covalentemente en el C1 del residuo de la aldosa terminal de la heparina para obtener una cadena de AT que contiene aminas mediante un enlace con amina. Pueden formarse complejos covalentes simplemente mezclando heparina y AT en una solución tampón y dejando que se forme espontáneamente una ceto-amina a través de una transposición de Amadori entre el terminal aldosa de la heparina y una lisil-AT o grupo amino N-terminal. De este modo, la transposición de Amadori se puede utilizar para elaborar conjugados de heparina con AT. Este

método de conjugación resulta especialmente útil y sencillo, y minimiza la modificación del glicosaminoglicano, maximizando de este modo el mantenimiento de su actividad biológica.

En algunos casos, el conjugado de antitrombina-heparina puede prepararse utilizando heparina no fraccionada. En otros casos, el conjugado de antitrombina-heparina puede prepararse utilizando heparina de la cual se hayan eliminado las cadenas de heparina de bajo peso molecular. Como ya se sabe, la heparina puede obtenerse con facilidad en forma no fraccionada, que contiene moléculas con una amplia gama de pesos moleculares. Al eliminar la mayor parte o la totalidad de las moléculas de heparina con unos pesos moleculares inferiores a 3.000 daltons con anterioridad a la conjugación de la heparina con la antitrombina, puede mejorarse la actividad del conjugado de antitrombina-heparina. En una realización adicional, las moléculas de heparina con un peso molecular inferior a 5.000 daltons pueden eliminarse en su mayoría o completamente con anterioridad a su conjugación con antitrombina.

Los conjugados de antitrombina-heparina formados utilizando heparina de la que se han eliminado las moléculas de heparina de bajo peso molecular difieren en su composición de otros conjugados de antitrombina-heparina. Las cadenas de heparina de bajo peso molecular pueden eliminarse de la heparina con anterioridad a su reacción con la AT para sintetizar el conjugado de antitrombina-heparina (ATH). Por lo tanto, se eliminan de la ATH las cadenas de heparina de bajo peso molecular conjugadas con la AT.

Las cadenas de heparina de bajo peso molecular pueden eliminarse de la heparina disponible comercialmente antes de hacer reaccionar la heparina con la AT para obtener el ATH. De este modo se obtiene un ATH cuya composición difiere de la del ATH formado a partir de la heparina no fraccionada sin eliminar las heparinas de bajo peso molecular antes de su reacción con la AT. Adicionalmente, la formación del ATH a partir de heparina no fraccionada y la posterior eliminación de los conjugados de ATH de bajo peso molecular, no permite obtener el mismo producto que el ATH de la presente invención. Sin tener que aferrarse a ninguna teoría específica, se cree que las cadenas de heparina de bajo peso molecular (como las de menos de 3.000 daltons o menos de 5.000 daltons) compiten con las heparinas de cadena más larga por la conjugación con la AT. Las cadenas de heparina de muy bajo peso molecular tienen una elevada proporción de terminales aldosa que reaccionan con la AT. Por lo tanto, las cadenas de heparina de muy bajo peso molecular tienden a conjugarse con la AT con mayor rapidez, superando a las cadenas de heparina con un mayor peso molecular. No obstante una vez que las cadenas de heparina de muy bajo peso molecular se enlazan a la AT, las cadenas dejan de tener suficientes huecos o longitud para los enlaces de la trombina y el Factor Xa, una

enzima que participa en la cascada de coagulación. La actividad inhibitoria frente al factor Xa y la trombina desciende de forma dramática en el rango de moléculas de heparina de menor peso molecular. De este modo, el ATH formado a partir de estas cadenas de heparina de muy bajo peso molecular tiene esencialmente cero actividad para la prevención de la trombogénesis.

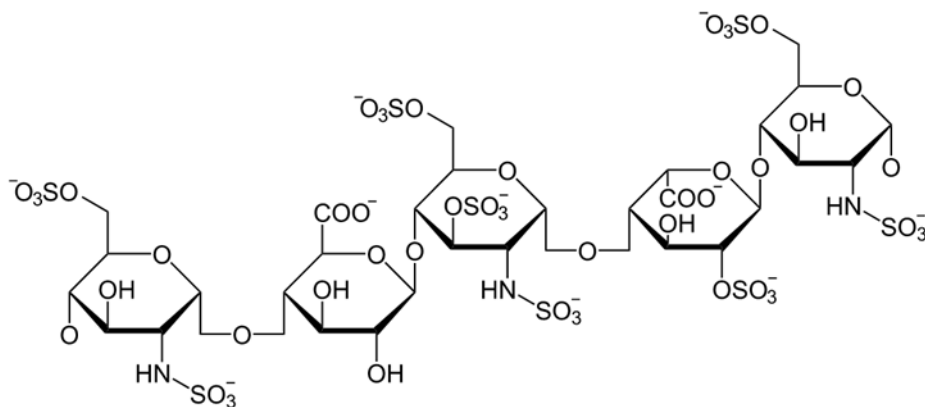
- 5 Aunque la heparina de grado comercial contiene un porcentaje relativamente pequeño de cadenas de heparina de menos de 5.000 Daltons, estas cadenas de heparina de muy bajo peso molecular presentan una reactividad con la AT tan elevada que una cantidad muy importante del ATH formado contiene cadenas de heparina de muy bajo peso molecular.

10 Si no se elimina la heparina de muy bajo peso molecular con anterioridad a la conjugación, habrá una mayor proporción de terminales reactivos en esta población frente a la de la heparina con un peso molecular más elevado, lo que superará al resto de las moléculas de heparina en una proporción variable a lo largo de todo el espectro de pesos moleculares (ya que la proporción de terminales aldosa varía de forma continua a lo largo de toda la gama de pesos moleculares de heparina). Esto puede tener un efecto adverso sobre el ATH final. En
15 primer lugar, el ATH contendrá una significativa población de moléculas de ATH que contengan cadenas de heparina muy pequeñas sin actividad. En segundo lugar, el resto de moléculas de ATH (aparte de este rango de moléculas de ATH de muy bajo peso molecular) contendrá una población de heparina con una reducida proporción de cadenas de heparina situada en unos rangos discretos de pesos moleculares y que tengan menos terminales aldosa para competir
20 con las cadenas inactivas de heparina de bajo peso molecular. Este tipo de heparina baja en aldosa suele tener cadenas mucho más largas, pero no está enteramente definido por una relación directa entre la longitud de las cadenas de heparina y los terminales aldosa necesarios para enlazarse a la AT.

Además, la heparina con al menos 18 unidades de monosacáridos puede ser más eficaz
25 en la inhibición de la trombina. Se utilizan al menos 18 unidades de monosacáridos para unir la antitrombina y la trombina. El mecanismo mediante el cual la heparina se une a la antitrombina y la trombina se denomina mecanismo de plantilla o puente. La heparina puede ejercer su efecto a través de su activación conformacional enlazándose a la AT y convirtiendo de forma alostérica la AT en una forma estructural que es mucho más reactiva frente a las proteasas de
30 la coagulación. Alternativamente, la heparina puede actuar como una plantilla, enlazándose tanto con el inhibidor como con la enzima, localizando de este modo las moléculas para la reacción. En este mecanismo se produce la activación conformacional de la AT mediante la heparina, pero la mejora adicional de la tasa de reacción se obtiene mediante el enlace

simultáneo de la heparina con la enzima, colaborando de este modo al acercamiento del factor de coagulación al inhibidor activado. La longitud mínima específica de la cadena de 18 monosacáridos puede explicar por qué se produce una caída muy brusca en la actividad frente a la trombina dentro de la fracción de heparina con un menor peso molecular. Partiendo de la estructura correspondiente a un ácido urónico monosulfatado-disacárido de glucosamina heparina bisulfatado, es decir, sin el sodio ni otros iones que puedan encontrarse en un formato de sal, el peso molecular de una cadena de 18 sacáridos (9 disacáridos) estaría situado en torno a 4.500 daltons.

Las cadenas de heparina con un peso molecular algo menor pueden resultar útiles para la inhibición del factor Xa. Una secuencia específica de pentasacárido de la heparina puede unirse a la AT y activar la AT para la inhibición del factor Xa. La secuencia de pentasacárido específica está disponible por sí misma como el fármaco "Fondaparinux," pero la secuencia también puede darse en cadenas de heparina. La secuencia de monosacáridos se muestra en la fórmula I:



(I)

De este modo, las cadenas de heparina que contengan menos de 18 monosacáridos que a su vez contengan esta secuencia de pentasacárido pueden ser capaces de activar la AT para inhibir el factor Xa aun cuando las cadenas no sean lo suficientemente largas como para unirse a la AT y la trombina.

En algunos casos, las cadenas de heparina más largas pueden presentar la mayor actividad inhibitoria. No obstante, algunas cadenas de heparina de pesos moleculares medios y bajos pueden presentar unas tasas significativamente menos indeseables de enlace con otras proteínas del plasma y plaquetas. Por lo tanto, estas cadenas de heparina de tipo medio pueden ser más selectivas para la inhibición de la trombina y del factor Xa sin causar efectos

colaterales no deseados, como disfunciones de las plaquetas, al dejar de unirse a las plaquetas y unirse a otros materiales.

El aislamiento del ATH de mayor peso molecular tras la conjugación, para obtener un ATH de cadena muy larga proporciona un producto diferente y menos deseable en comparación con la presente invención, que separa (sustancialmente o en su totalidad) la heparina con anterioridad a la conjugación. Por ejemplo, la proporción de 2 moléculas de pentasacáridos de elevada actividad en esta sub-población puede alterarse a causa de una capacidad diferencial de estas cadenas de elevada actividad para competir por la conjugación con las heparinas de muy bajo peso molecular. Adicionalmente, el aislamiento del ATH de peso molecular elevado tras la conjugación elimina las moléculas de ATH con cadenas de heparina medianas y pequeñas, que también están activas y presentan otras características deseables, como los enlaces reducidos no selectivos con las proteínas del plasma y las plaquetas.

Alternativamente, los intentos de hacer reaccionar con la AT todas las cadenas de heparina con terminales aldosa incrementando la proporción de AT frente a heparina en la mezcla de la reacción no tienen grandes posibilidades de éxito, ya que muchos experimentos han demostrado que se obtiene tan sólo una tasa máxima de conversión de AT en ATH del 60 % en peso, aún cuando el contenido de aldosa de la heparina supere en varias veces las concentraciones prácticas más elevadas. Si se reduce aún más la proporción de heparina frente a la AT disminuirá aún más el rendimiento del ATH, sin ninguna promesa de que vaya a incorporarse al producto la totalidad de las cadenas activas más largas.

En algunas realizaciones, una composición para la prevención de la trombogénesis puede contener ATH obtenido a partir de heparina de grado comercial, de la cual se haya eliminado la práctica totalidad de las cadenas de heparina con un peso molecular inferior a 3.000 daltons (por ejemplo, al menos un 98 % en peso del resto de las cadenas de heparina puede tener un peso molecular superior a 3.000 daltons). En otras realizaciones, las cadenas de heparina con un peso molecular inferior a 5.000 daltons pueden eliminarse sustancial o totalmente. De este modo, el producto ATH puede contener cadenas de heparina cuyo peso molecular oscile entre 3.000 daltons (o 5.000 daltons) y los pesos moleculares más elevados que contiene la heparina comercial. En algunos ejemplos, este rango de pesos moleculares puede oscilar entre 3.000 daltons y 50.000 daltons, o entre 5.000 daltons y 50.000 daltons. En los ejemplos adicionales, al menos una porción de las cadenas de heparina pueden encontrarse en un rango medio de pesos moleculares. Por ejemplo, al menos una porción de las cadenas de heparina del ATH puede tener un peso molecular que oscile entre 3.000 daltons y 30.000

daltons, entre 3.000 daltons y 20.000 daltons, entre 3.000 daltons y 15.000 daltons, entre 3.000 daltons y 10.000 daltons, entre 5.000 daltons y 30.000 daltons, entre 5.000 daltons y 20.000 daltons, entre 5.000 daltons y 15.000 daltons, o entre 5.000 daltons y 10.000 daltons. De este modo, puede eliminarse del ATH la totalidad o la práctica totalidad de las cadenas de heparina cuyo peso molecular sea inferior a 3.000 Daltons o 5.000 Daltons.

Normalmente, la heparina comercial puede contener una serie de cadenas de heparina cuyos pesos moleculares oscilen entre 1.000 daltons o menos y 50.000 daltons o más. La fracción de menor peso molecular, como las cadenas cuyo peso molecular es inferior a 3.000 o 5.000 daltons, pueden eliminarse mediante cualquier método adecuado. Entre algunos de los métodos de eliminación de las cadenas de bajo peso molecular se encuentran la diálisis, la diafiltración, la filtración mediante gel y la electroforesis. La diálisis y la diafiltración pueden llevarse a cabo en condiciones de elevada salinidad. Por ejemplo, entre las condiciones elevadas de salinidad para la diálisis o la diafiltración se encuentran las concentraciones salinas de entre aproximadamente NaCl 1 M y aproximadamente NaCl 4 M. También pueden utilizarse otras sales distintas del NaCl. La elevada concentración salina puede ayudar a que las cadenas pequeñas se desplacen a través de membranas con unos tamaños de poro adecuados. La filtración mediante gel puede llevarse a cabo utilizando unos medios adecuados para la separación de moléculas en función de su tamaño. En un ejemplo concreto, el filtrado mediante gel puede llevarse a cabo en Sephadex® G-200, que es un medio en forma de gel para la separación de moléculas con unos pesos moleculares que oscilan entre 1.000 y 200.000 daltons. La heparina comercial puede filtrarse mediante gel en una columna de gel, y una serie de fracciones se pueden eluir con las primeras fracciones que contienen las cadenas de mayor peso molecular y las posteriores fracciones que contienen unos pesos moleculares gradualmente inferiores. Pueden determinarse los pesos moleculares de la heparina de cada fracción, y pueden agruparse las fracciones que tengan los pesos moleculares deseados. Utilizando este método, pueden excluirse las fracciones que contengan heparina con unos pesos moleculares inferiores al umbral de 3.000 o 5.000 daltons. Si así se desea, las cadenas de heparina que superen un umbral determinado también pueden excluirse. Por ejemplo, las fracciones que contengan heparina con un peso molecular de más de 50.000 daltons, 30.000 daltons, 20.000 daltons, 15.000 daltons, o 10.000 daltons pueden excluirse, si así se desea. Las fracciones agrupadas que posean el rango deseado de pesos moleculares pueden utilizarse entonces para sintetizar el ATH.

Cabe señalar que los métodos de eliminación de las cadenas de heparina de muy bajo peso molecular que se han descrito más arriba constituyen tan sólo ejemplos, y no deberían considerarse exhaustivos. En la presente invención puede utilizarse cualquier método de tratamiento de la heparina comercial para la eliminación de las cadenas de heparina que se encuentren por debajo de un determinado umbral de peso molecular.

En varias realizaciones de la presente invención, los tratamientos y métodos que aquí se describen pueden llevarse a cabo utilizando ATH al que se le haya eliminado la heparina de bajo peso molecular, o alternativamente, utilizando ATH formado a partir de heparina no fraccionada.

El ATH puede formarse conjugando la AT con la heparina de la que se han retirado las cadenas de bajo peso molecular. Pueden encontrarse ejemplos de métodos de conjugación de la heparina con AT en la Patente de los EE.UU. Nº 7.045.585, que queda incorporada al presente documento por referencia. Estos métodos pueden aplicarse a la formación de ATH utilizando heparina de la que se han eliminado las cadenas de muy bajo peso molecular, como se describe en este documento. La heparina puede conjugarse con AT mediante un sencillo proceso que consta de una sola etapa, y que permite el enlace covalente directo de la amina de una fracción que contenga aminas (como por ejemplo, entre otros, los oligo(poli)sacáridos que contienen aminas, los lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos que contienen aminas, así como cualquier xenobiótico que contenga aminas) con un residuo de aldosa terminal de una cadena de heparina. Para la formación del ATH, la fracción que contiene aminas se encuentra presente en la AT, aunque pueden conjugarse otras proteínas utilizando los mismos métodos. Los métodos de mínimo procesamiento y no destructivos que aquí se describen permiten preservar al máximo la actividad biológica de la proteína y permiten el enlace directo de la proteína sin necesidad de grupos separadores intermedios.

En una realización, la heparina se incuba con AT a un pH adecuado para la formación de iminas entre la amina y el residuo de aldosa o cetosa terminal de la heparina. Los residuos terminales de aldosa y cetosa suelen existir en equilibrio entre la forma cíclica de anillo cerrado hemiacetal o hemicetal y los correspondientes equivalentes de aldehído o cetona de anillo abierto. Por lo general, las aminas son capaces de reaccionar con la forma de anillo abierto para producir una imina (base de Schiff). Normalmente, las aldosas son más reactivas debido a que los correspondientes aldehídos de la forma en anillo abierto son más reactivos frente a las aminas. Por lo tanto, la formación del conjugado covalente entre las aminas y los residuos de

aldosa terminal de la heparina permite un método de unión con la heparina de la AT que contiene una amina.

Normalmente, la reacción se lleva a cabo a un pH situado entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 9, y más normalmente de entre aproximadamente 5 a aproximadamente 8, e incluso más normalmente, de entre aproximadamente 7 a aproximadamente 8. La reacción suele llevarse a cabo en un medio acuoso. No obstante, pueden emplearse medios orgánicos, y especialmente disolventes orgánicos hidrófilos polares, como alcoholes, éteres y fomamidas y similares, en unas proporciones de hasta un máximo aproximado del 40% para aumentar la solubilidad o reactividad de los reactivos, si fuese necesario. También pueden utilizarse soluciones tampón no nucleófilas, como fosfato, acetato, bicarbonato y similares.

En algunos casos, las iminas formadas por condensación de las aminas de la AT con los residuos de aldosa terminales de la heparina se reducen a las aminas correspondientes. Esta reducción puede llevarse a cabo simultáneamente con la formación de iminas o con posterioridad a la misma. Pueden utilizarse diversos agentes reductores, como agentes reductores de los hidruros, incluyendo borohidruro sódico o cianoborohidruro sódico. En un ejemplo, puede utilizarse cualquier agente reductor que no reduzca los enlaces disulfuro.

Alternativamente, si no se desea la reducción de la imina intermedia, la imina puede incubarse durante un período de tiempo suficiente, normalmente de entre un día y un mes, más normalmente entre 3 días y 2 semanas, para permitir que se lleve a cabo la transposición de Amadori en la imina intermedia. Los residuos de aldosa terminal de las heparinas conjugadas mediante los métodos que se describen en esta invención suelen poseer grupos hidroxilo C2 en el residuo de la aldosa terminal, es decir, una fracción 2-hidroxicarbonil que se convierte a una 2-hidroximina por condensación con la amina de la AT que está conjugándose con la heparina. En la transposición de Amadori, que resulta especialmente frecuente en los carbohidratos, la α -hidroximina (imina en C1, hidroxilo en C2) formada por la condensación inicial puede transponerse para formar una α -cetoamina mediante enolización y reprotonación (ceto en C2, amina en C1)). La α -carbonilamina resultante se ve termodinámicamente favorecida frente a la α -hidroximina precursora, facilitando de este modo un aditivo estable con una mínima interrupción de la cadena de heparina. De este modo, en esta realización, la invención permite obtener una cadena de heparina conjugada de forma covalente en el C1 del residuo de aldosa terminal de la heparina con una amina que contenga AT, mediante un enlace amina. Si así se desea, el conjugado resultante puede reducirse o etiquetarse mediante reducción del grupo

carbonil C2 con un reactivo de etiquetado, como una radioetiqueta (por ejemplo, NaB^3H_4), o conjugarse con una segunda especie, como una etiqueta fluorescente.

Aunque la anterior descripción se centra en la heparina y la AT, existen diversas especies que contienen aminos y que pueden conjugarse para obtener diversos
 5 glicosaminoglicanos mediante los métodos que aquí se describen. La amina primaria puede encontrarse en una molécula pequeña, como por ejemplo, un fármaco o etiqueta fluorescente o cromofórica o una macromolécula, como por ejemplo, una proteína (anticuerpos, enzimas, receptores, factores de crecimiento y similares), un polinucleótido (ADN, ARN y mezclas de sus
 10 polímeros), un lípido o un polisacárido. En general, cuando las proteínas se conjugan para formar glicosaminoglicanos, los enlaces se efectuarán a través de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina. Alternativamente, los enlaces también pueden llevarse a cabo mediante el grupo α -amino del residuo ácido del amilo terminal N. Además, pueden utilizarse otros muchos métodos conocidos para cualquier experto en la técnica para la introducción de una función amina en una macromolécula.

15 Concretamente, la presente tecnología puede aplicarse a una diversidad de otras proteínas terapéuticamente útiles cuando pueden resultar de utilidad consideraciones del tipo de promedio de vida más prolongado y coagulación de la sangre. Entre éstas se encuentran las enzimas de la sangre, los anticuerpos, las hormonas y similares, así como los activadores del plasminógeno con ellos relacionados, la estreptoquinasa y sus derivados. Concretamente, esta
 20 tecnología proporciona conjugados de heparina o dermatán sulfato con antitrombina, cofactor II de la heparina (HCII) o análogos del cofactor II de la heparina.

Los métodos de la presente invención proporcionan conjugados de glicosaminoglicano con una máxima retención de la actividad biológica. Concretamente, se proporcionan conjugados de heparina o dermatán sulfato con AT o HCII, que poseen > 60 % en peso,
 25 normalmente > 90 % en peso, más normalmente > 95 % en peso, y sobre todo > 98 % en peso de actividad de antitrombina heparina intacta no conjugada. Los métodos de la presente invención proporcionan moléculas de heparina intactas conjugadas con antitrombina o cofactor II de la heparina. De este modo, se evita la pérdida de la actividad biológica asociada a la fragmentación o cualquier otra modificación de la heparina con anterioridad a la conjugación.
 30 Los conjugados de heparina de la invención retienen su actividad anticoagulante debido a su preparación a partir de heparina intacta. Por lo tanto, los métodos que aquí se describen pueden utilizarse para preparar conjugados activos de heparina añadiendo en primer lugar grupos ligantes y separadores a las especies que se quieren conjugar con heparina (o con el

glicosaminoglicano que se esté utilizando) y añadiéndolos posteriormente a la heparina. Se describen numerosos métodos de incorporación de grupos amino reactivos en otras moléculas y soportes sólidos en el ImmunoTechnology Catalog and Handbook, Pierce Chemical Company (1990), que queda incorporado por referencia. Por lo tanto, cualquier especie que posea grupos amino reactivos o que sea capaz de modificarse a fin de contener dichos grupos amino, mediante cualquier método conocido en la actualidad o que pueda conocerse en el futuro, puede conjugarse de forma covalente con glicosaminoglicanos, como la heparina, mediante los métodos que aquí se describen, y la totalidad de dichos conjugados queda contemplada por la presente invención.

Como se ha descrito anteriormente, la presente tecnología aprovecha el hecho de que la heparina nativa (aislada de la mucosa intestinal), así como el dermatán sulfato, ya contienen moléculas con aldosas terminales, que existirían en equilibrio entre las formas hemiacetal y aldehído. De este modo, la heparina o el dermatán sulfato pueden conjugarse para formar serpinas de antitrombina por reducción de la base de Schiff formada espontáneamente entre el aldehído terminal de la aldosa en la heparina o el dermatán sulfato y un amino de la serpina. La heparina o el dermatán sulfato quedan sin modificar (sin reducir sus actividades) antes de la conjugación, y se enlaza en un punto específico de uno de los extremos de la molécula, sin que existan grupos de activación no bloqueados ni entrecruzamiento de la serpina.

En otro aspecto de la presente invención, pueden producirse complejos covalentes mezclando simplemente heparina y AT en una solución tampón y dejando que se forme espontáneamente una ceto-amina mediante una transposición de Amadori entre la aldosa terminal de la heparina y un grupo amino de la AT. De este modo, esta tecnología proporciona métodos de utilización de la transposición de Amadori para elaborar conjugados de glicosaminoglicanos con especies que contienen aminas, y sobre todo con proteínas. Este es un método de conjugación especialmente sencillo, que minimiza la modificación del glicosaminoglicano, maximizando de este modo la retención de su actividad biológica.

Otro aspecto de esta tecnología proporciona conjugados covalentes de glicosaminoglicanos, y especialmente de heparina, etiquetados en su extremo con una especie que contiene aminas en el residuo terminal de aldosa del glicosaminoglicano. Por ejemplo, la heparina y la AT pueden enlazarse directamente entre sí de forma que la secuencia activa de pentasacárido para la AT en la heparina se encuentra muy cercana para su enlace. Este es uno de los motivos fundamentales de realización de un complejo heparina-AT covalente, ya que la heparina acelera la inhibición a través de la AT tan sólo en el caso de que la AT pueda enlazar

la secuencia activa. Resulta notable que el ATH tenga la propiedad exclusiva de que la H (heparina) del conjugado activa estequiométricamente la AT endógena mientras activa catalíticamente la AT exógena. Normalmente, una especie que contenga aminos se enlazarán a cada glicosaminoglicano. No obstante, es evidente que puede reducirse la proporción entre las especies que contienen aminos y el glicosaminoglicano por debajo de la unidad, ajustando las proporciones molares de los reactivos o el tiempo de reacción.

Los glicosaminoglicanos se encuentran disponibles en diversas formas y pesos moleculares. Por ejemplo, la heparina es un mucopolisacárido, aislado a partir de intestinos de cerdo o pulmones bovinos, y es heterogénea con respecto al tamaño molecular y la estructura química. Consiste básicamente en residuos enlazados (1–4) de 2-amino-2-desoxi- α -D-gluopiranosil, y de ácido α -L-idopiranosilurónico con una cantidad relativamente reducida de residuos de ácido β -D-glucopiranosilurónico. Los grupos hidroxilo y amina se derivan en diversos grados mediante sulfatación y acetilación.

Las moléculas de heparina también se pueden clasificar en función de su contenido en pentasacárido. Alrededor de una tercera parte de la heparina contiene cadenas con una copia del pentasacárido único con una elevada afinidad por la AT, mientras que una proporción mucho más reducida (calculada en torno al 1% de la heparina total) consiste en cadenas que contienen más de una copia del pentasacárido de elevada afinidad. El resto (aproximadamente 66%) de la heparina no contiene el pentasacárido. De este modo, la denominada “heparina estándar” constituye una mezcla de las tres especies, la heparina de “baja afinidad” que carece de una copia del pentasacárido, la heparina de “alta afinidad”, que está enriquecida para las especies que contienen al menos una copia del pentasacárido, y la heparina de “muy alta afinidad” que se refiere aproximadamente al 1% de moléculas que contienen más de una copia del pentasacárido. Estas tres especies pueden separarse entre sí recurriendo a métodos cromatográficos rutinarios, como la cromatografía sobre una columna de afinidad de antitrombina.

Una ventaja de formar un conjugado entre heparina y una especie que contenga al menos un grupo amino primario (por ejemplo, AT) utilizando el proceso de glicación lenta que se describe en este documento es la aparente selección de cadenas de heparina con dos pentasacáridos. De este modo, por ejemplo, el ATH preparado conforme al método de esta invención parece estar enriquecido en lo que respecta a las especies de heparina que contienen dos pentasacáridos. Cuando la heparina estándar (que contiene aproximadamente un 1% de heparina formada por dos pentasacáridos) se utiliza como material de partida, por lo

general más del 10% del ATH resultante comprende heparina de dos pentasacáridos, con frecuencia más de un 20% aproximadamente, frecuentemente más del 35%, y más frecuentemente en torno al 50% del ATH comprende heparina de dos pentasacáridos.

Este enriquecimiento puede ser el responsable de una serie de propiedades útiles del ATH. El ATH de la presente invención activa la AT con la que está conjugado, de forma estequiométrica, pero activa la AT exógena de forma catalítica. De este modo, la heparina que se encuentra en el complejo ATH actúa catalíticamente, tanto cuando el ATH se administra como coagulante sistémico como cuando el ATH se utiliza para revestir las superficies y hacerlas no trombogénicas. Con el método de la invención se obtiene un complejo ATH con una actividad específica anti-factor IIa muy elevada. Además, la segunda cadena de pentasacárido del complejo ATH puede interactuar con moléculas de AT exógena, permitiendo así que la heparina conjugada tenga una actividad catalítica. Además, la heparina del complejo ATH puede orientarse de tal forma que el pentasacárido quede disponible para enlazar y activar la circulación de moléculas de AT cuando el complejo ATH se una a una superficie protésica.

Se observará que un conjugado de heparina que revista interés (por ejemplo, ATH) también puede obtenerse incubando una especie que contenga al menos un grupo amino primario (por ejemplo, AT) con heparina purificada de muy elevada afinidad (es decir, que contenga dos grupos pentasacáridos) o una fracción enriquecida para una heparina de muy alta actividad.

Aunque esta tecnología se ha ilustrado básicamente con respecto a la heparina, es evidente que todos los glicosaminoglicanos, independientemente de su peso molecular y derivatización, pueden conjugarse mediante los métodos descritos en esta invención, siempre que posean un residuo de aldosa terminal. Los conjugados de todos estos glicosaminoglicanos y su preparación a través de los métodos que aquí se indican se encuentran dentro del alcance de esta invención. Por ejemplo, los conjugados de heparina derivatizados con fosfatos, sulfonatos y similares, así como los glicosaminoglicanos con unos pesos moleculares inferiores o superiores a los pesos moleculares de la heparina se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

En un aspecto adicional de la presente invención, un método de fabricación de una composición para la prevención de la trombogénesis puede incluir la conjugación de AT con heparina en el exterior del cuerpo de un sujeto para obtener un conjugado de antitrombina-heparina, donde la cantidad de antitrombina obtenida en el conjugado de antitrombina-heparina es superior al 60 % en peso, superior al 65 % en peso, superior al 75 % en peso, superior al 85

% en peso, superior al 90 % en peso, superior al 95 % en peso, o superior al 99 % en peso en función de la antitrombina inicial utilizada en la síntesis. El rendimiento puede incrementarse mediante diversos métodos. En un ejemplo, la AT puede conjugarse con heparina mediante los métodos descritos anteriormente. Tras la conjugación, cualquier AT no enlazada puede
5 reciclarse y utilizarse en otra reacción de conjugación con heparina. Tras cada etapa de incubación de AT con heparina, la AT no enlazada puede reciclarse y utilizarse para obtener ATH adicional.

En otro ejemplo, el rendimiento del ATH puede incrementarse utilizando como catalizador una transposición de Amadori. Entre algunos de los ejemplos de catalizadores que
10 pueden aumentar la proporción de la transposición de Amadori se encuentran la 2-hidroxi piridina, las sales de aminas terciarias, el malonato de etilo, la fenilacetona y el ácido acético, así como otros ácidos. En un ejemplo concreto, puede hacerse reaccionar la AT y la heparina en presencia de 2-hidroxi piridina mientras se calientan en agua o en disolventes muy anfífilos, como la formamida. En ejemplos adicionales, puede hacerse reaccionar a la AT y la
15 heparina en presencia de trimetilamina o de sales de trimetilamina.

La velocidad de la transposición de Amadori también se puede incrementar mediante sistemas de disolventes aceleradores de la transposición de Amadori. Entre los ejemplos de dichos disolventes se encuentran las mezclas de agua con formamida, dimetilformamida, dioxano, etanol, dimetilsulfóxido, piridina, ácido acético, trimetilamina, trietilamina, acetonitrilo y
20 sus combinaciones. Se puede hacer reaccionar la heparina y la AT en estos sistemas disolventes para acelerar la transposición de Amadori para la obtención de ATH.

Un método adicional de incrementar la velocidad de la conjugación de la aldosa de heparina con una molécula que contenga una amina implica la utilización de un agente ligante. El agente ligante puede ser un agente heterobifuncional, con un grupo que reacciona a la
25 aldosa de la heparina en un extremo y un grupo diferente en otro extremo que se puede utilizar para unirse a la AT o a un segundo agente ligante que a su vez puede unirse a la AT. En un ejemplo concreto, el agente ligante puede contener hidracina en un extremo y un grupo amino en el otro extremo, como 2-aminoetilhidracina. Este agente ligante puede hacerse reaccionar con la heparina para formar una hidrazona con el aldehído de la aldosa de la heparina. El
30 producto puede dializarse o diafiltrarse con membranas que permitan la eliminación de cadenas de heparina con un peso molecular inferior a 3.000 o 5.000 Daltons junto con cualquier agente ligante que no haya reaccionado. El producto heparina-hidrazona puede entonces hacerse reaccionar con una gran cantidad de un agente ligante secundario. El agente ligante secundario

puede ser un reactivo homobifuncional que posea grupos carboxilo activados en cada uno de sus extremos, como el éster del ácido succínico di(N-hidroxisuccinimida) (preparado mediante la esterificación del ácido succínico con N-hidroxisuccinimida utilizando agentes de condensación como el carbonildiimidazol o una carbodiimida) para que el grupo amino del agente ligante que contiene hidracina reaccione con tan sólo uno de los carboxilos activados del agente ligante secundario. La mezcla de reacción puede dializarse o diafiltrarse para eliminar el agente ligante secundario que haya quedado sin reaccionar. En este punto, el producto será heparina modificada mediante el agente ligante que contiene amino-hidracina, así como el agente ligante secundario. Este producto puede incubarse con AT en una solución tampón de H₂O de forma que el grupo amino de la AT reaccione con el segundo grupo carboxilo activado del agente ligante secundario para formar un conjugado de AT-Heparina, donde la AT y la heparina están enlazadas a través del agente ligante y el agente ligante secundario.

Tras la formación del ATH, el ATH puede liofilizarse (dsecarse por congelación) para su almacenamiento. En una realización, el ATH puede prepararse en una solución que contenga exclusivamente agua y liofilizarse posteriormente. En otra realización, el ATH puede prepararse en una solución con agua y alanina a una concentración que oscile entre 0,01-0,09 molar, liofilizándose posteriormente. En otra realización adicional, el ATH puede prepararse en una solución que contenga agua y manitol, y liofilizarse a continuación. Cada uno de estos métodos se puede utilizar independientemente, y cada uno de ellos posee sus propias ventajas. Tras la liofilización utilizando cualquiera de estos métodos, el ATH puede reconstituirse y preservar un importante nivel de actividad de inhibición de la trombina, en comparación con su nivel de actividad previo a la liofilización. En algunos casos, el ATH puede retener al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, o al menos un 98% de su actividad inhibidora de la trombina. Se ha demostrado que mediante la utilización de otros métodos de liofilización del ATH, como la preparación del ATH en una solución que contenga sal en una concentración de más de 1 molar con anterioridad a la liofilización se puede destruir la actividad del ATH.

Tanto si se ha liofilizado el ATH o no, el ATH se puede preparar en una solución acuosa que contenga entre 9 y 11 mg/mL de ATH con respecto a la totalidad del volumen de la solución. Se ha demostrado que si se preparan soluciones con una concentración de ATH superior a 11 mg/mL se puede producir una agregación del ATH que resulta difícil o imposible de revertir. No obstante, pueden prepararse soluciones acuosas estables con unas concentraciones de ATH de 9-11 mg/ml. Esta solución puede formularse para su administración

a un paciente para el tratamiento de cualquiera de las afecciones que se describen en el presente documento. La solución también puede incluir diversos aditivos que resulten adecuados para su administración a un paciente.

5 En la práctica clínica, los conjugados de heparina de la presente invención pueden utilizarse en general de la misma manera y en el mismo formato de preparación farmacéutica que la heparina disponible comercialmente para su uso clínico. De este modo, los conjugados de heparina facilitados por la presente invención pueden incorporarse a soluciones acuosas para inyección, (intravenosa, subcutánea y similares) o infusión intravenosa, o en preparaciones de ungüentos para su administración a través de la piel y de las membranas mucosas. Puede
10 realizarse cualquier tipo de terapia, tanto profiláctica como curativa, conocida en la actualidad o disponible en el futuro, mediante los conjugados de heparina facilitados por esta tecnología.

Los conjugados de heparina de la presente invención resultan especialmente útiles para el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (SDR) en neonatos y adultos. Al contrario de lo que sucede con la utilización de complejos no covalentes de heparina-AT, la utilización de
15 los conjugados covalentes de heparina de la presente invención previene la pérdida de la heparina en el espacio pulmonar provocada por su disociación de la AT. En este caso, puede ofrecerse una solución formada por un complejo covalente en una solución reguladora, en forma de pulverización atomizada en el pulmón a través de las vías respiratorias mediante un catéter o inhalador. Debido a su gran tamaño, el ATH permanecerá en los alvéolos durante un
20 período de tiempo prolongado. El ATH también es útil para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática.

Su utilización a largo plazo en el torrente circulatorio puede llevarse a cabo mediante inyección intravenosa o subcutánea de complejo en una solución reguladora fisiológica. Los conjugados covalentes de esta tecnología también se pueden utilizar en el tratamiento de los
25 estados adquiridos de déficit de AT caracterizados por complicaciones trombóticas, como el bypass cardiopulmonar, la oxigenación molecular extracorpórea, etc. ya que la vida media más larga del complejo covalente permite reducir el número de tratamientos y el control. Adicionalmente, esta invención permite el tratamiento profiláctico de pacientes adultos con riesgo de trombosis venosa profunda.

30 El conjugado de ATH de la presente invención presenta numerosas ventajas con respecto a la AT no compleja y la heparina estándar. Dado que la AT está unida a la heparina mediante un enlace covalente, la unión no específica del ATH a las proteínas del plasma será menor que en el caso de la heparina estándar, con el resultado de una menor variación

interindividual en la respuesta a la dosis en el caso del ATH que la que se da con la heparina estándar. La más prolongada vida media del ATH tras su inyección intravenosa en seres humanos significa que puede lograrse un efecto anticoagulante sostenido con una administración menos frecuente de ATH que la que se precisaría en el caso de la AT no compleja y la heparina estándar. El ATH es un desactivador de la trombina y del factor Xa mucho más eficiente que la AT, y puede resultar eficaz cuando se utiliza en concentraciones mucho más reducidas que la AT en pacientes con déficit de AT. Además, el ATH puede acceder a la trombina ligada a la fibrina e inhibirla. Por último, cuando se encuentra unido (por ejemplo, mediante enlaces covalentes) a superficies protésicas (por ejemplo, injertos endovasculares), el ATH ha demostrado tener una actividad antitrombótica in vivo muy superior a la de la AT unida mediante enlace covalente, la heparina unida mediante enlace covalente, o la hirudina unida mediante enlace covalente.

Los bebés prematuros tienen una mayor incidencia del síndrome de dificultad respiratoria (SDR), una grave enfermedad pulmonar que requiere tratamiento mediante ventilación asistida. La ventilación asistida a largo plazo lleva a la aparición de displasia broncopulmonar (DBP) como resultado de la lesión pulmonar, que permite que las proteínas de la coagulación del plasma se desplacen por los espacios alveolares del pulmón. El resultado es la generación de trombina y posteriormente de fibrina. Se ha observado constantemente una extendida presencia de fibrina en el tejido pulmonar y los espacios aéreos de bebés fallecidos a causa del SDR. Este gel de fibrina situado en el interior de los espacios aéreos dificulta el transporte de fluido desde los espacios aéreos del pulmón, con el resultado de un edema persistente y agravado. La presente invención permite el tratamiento de dichas enfermedades mediadas por la fibrina en el tejido pulmonar, al impedir la formación de fibrina intra-alveolar, al mantener un “entorno anti-trombótico” y/o mejorar la fibrinólisis en el interior del tejido pulmonar, reduciendo de este modo la carga de fibrina en los espacios aéreos del pulmón.

Los conjugados de heparina pueden administrarse directamente en los espacios aéreos del pulmón a través de las vías respiratorias, de forma profiláctica (antes de que el bebé respire por primera vez). De este modo se garantiza que el agente antitrombótico está disponible directamente en el punto en que puede tener lugar la deposición de fibrina, y que se evita el riesgo de hemorragia asociado a las terapias antitrombóticas sistémicas. Además, el agente antitrombótico ya se encontrará presente en el pulmón con anterioridad al comienzo del soporte ventilatorio asociado a la lesión inicial, es decir, a diferencia de la administración sistémica de antitrombina en la que el paso del fármaco administrado a través del espacio aéreo de los

pulmones no se produce hasta después de que tenga lugar la lesión pulmonar. Dado que la heparina está unida a la AT de forma covalente, permanecerá en los espacios aéreos del pulmón. También puede consistir en una terapia complementaria de los tensioactivos que se estén administrando para prevenir el SDR y la DBP. “Tensioactivo pulmonar” significa la sustancia jabonosa que suele encontrarse presente en los espacios aéreos del pulmón, cuya función principal consiste en impedir el colapso del espacio aéreo, y colaborar en la transferencia de gases. Los conjugados también se pueden administrar repetidamente a través del tubo endotraqueal o como un aerosol inhalado. La terapia complementaria también puede practicarse con medicaciones contra el asma administradas mediante inhalador (por ejemplo, esteroides antiinflamatorios como el dipropionato de beclometasona), otros medicamentos contra el asma, como el cromolín sódico (sal disódica de 1,3-bis(2-carboxicromon-5-iloxi)-2-hidroxipropano, (“INTAL”) y broncodilatadores como el sulfato de albuterol.

Mediante la administración de los conjugados de la presente invención pueden tratarse otras diversas enfermedades asociadas a una elevada actividad de la trombina y/o depósitos de fibrina. Los procesos inflamatorios típicos del síndrome de dificultad respiratoria en adultos son básicamente similares al SDR neonatal, y pueden tratarse mediante la terapia antitrombótica descrita. También se ha demostrado que la fibrosis pulmonar espontánea activa las cascadas de coagulación/fibrinolítica en los espacios aéreos del pulmón. La enfermedad fibrótica del pulmón suele ser con frecuencia un efecto secundario asociado a la quimioterapia contra el cáncer y la administración antitrombótica en caso de SDR de los conjugados covalentes de heparina de la presente invención puede realizarse con carácter profiláctico con anterioridad a la quimioterapia contra el cáncer, para prevenir la fibrosis pulmonar. La administración se repite con posterioridad a la quimioterapia para asegurarse de que no se ha formado fibrina. También se ha documentado muy bien un descenso en la actividad de la antitrombina y un aumento de la actividad de la trombina en el caso de la sepsis. La sepsis constituye el factor de riesgo más común para el desarrollo del SDR en adultos. De este modo, los conjugados de heparina de la presente invención pueden utilizarse para reducir la mortalidad asociada al choque séptico.

Los conjugados de la presente invención pueden administrarse a una dosis terapéuticamente efectiva, es decir, la cantidad que, al administrarse a un mamífero que la precise, resulta suficiente para efectuar el tratamiento, como se ha descrito más arriba (por ejemplo, para reducir o tratar en otra forma la trombosis en el mamífero, o para desactivar la trombina relacionada con la coagulación, o para inhibir la acumulación de trombos). La administración de los componentes activos y las sales que se describen en este documento

puede realizarse mediante cualquiera de las modalidades aceptadas de administración de agentes que sirvan a propósitos similares.

En general, una dosis diaria aceptable se encuentra aproximadamente entre 0,001 y 50 mg por kilogramo de peso corporal del receptor y por día, aproximadamente entre 0,05 y 25 mg por kilogramo de peso corporal y por día, o aproximadamente entre 0,01 y 10 mg por kilogramo de peso corporal y por día. De este modo, para su administración a una persona de 70 kg, la dosis puede oscilar dentro de un rango aproximado de entre 0,07 mg y 3.5 g por día, de aproximadamente entre 3.5 mg y 1.75 g por día, o de aproximadamente entre 0,7 mg y 0,7 g por día, en función de los individuos y de la situación de la enfermedad que está tratándose. En el caso del ATH, su larga vida media permite que el compuesto se administre con menor frecuencia que la heparina estándar (por ejemplo, una o dos veces por semana).

La administración puede llevarse a cabo mediante cualquier ruta local o sistémica aceptada, por ejemplo, por vía parenteral, intravenosa, nasal, inhalación bronquial (es decir, formulación en aerosol), por vía transdérmica o tópica, en forma de dosis sólida, semisólida o líquida, como por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas, polvo, soluciones, suspensiones, aerosoles, suspensiones o similares, como dosis unitarias adecuadas para administrar de forma sencilla una dosis precisa. Por lo general, pueden utilizarse formulaciones acuosas. El conjugado puede formularse en un medio excipiente no tóxico, inerte y farmacéuticamente aceptable, con un pH de en torno a 3–8 o con un pH de en torno a 6–8. Por lo general, la formulación acuosa puede ser compatible con el medio de cultivo o perfusión. Las composiciones incluirán un vehículo o excipiente farmacéutico convencional, y un conjugado del glicosaminoglicano, y además, podrán incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, excipientes, adyuvantes, etc. Los vehículos pueden seleccionarse de entre los diversos aceites, incluyendo los derivados del petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, como por ejemplo, el aceite de cacahuete, el aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y similares. Entre los vehículos líquidos adecuados se encuentran el agua, soluciones salinas, dextrosa, acuosa o manitol, y los glicoles, especialmente para soluciones inyectables. Entre los excipientes farmacéuticos más adecuados se encuentran el almidón, la celulosa, el talco, la glucosa, lactosa, sucrosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato sódico, monoestearato de glicerol, cloruro sódico, leche desnatada concentrada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Se describen otros excipientes farmacéuticos adecuados y sus formulaciones en Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin (1985).

Si se desea, la composición farmacéutica que va a administrarse puede también contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH y similares, como por ejemplo, acetato sódico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

5 Los compuestos de la invención pueden administrarse como una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéutico combinado con ATH. El nivel del ATH en una formulación puede variar dentro de la totalidad del rango utilizado por los expertos en la materia, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 por ciento en peso (% p/p) y aproximadamente 99,99% p/p del fármaco, basado en la formulación total, entre
10 aproximadamente un 0,01% p/p y 99,99% p/p de excipiente. En un ejemplo, la formulación puede contener entre aproximadamente un 3,5 y un 60% en peso del compuesto farmacéuticamente activo, siendo el resto excipientes farmacéuticos adecuados.

La presente invención también se extiende a los tratamientos de diversas afecciones mediante ATH. En algunos ejemplos, esto incluye métodos de tratamiento, composiciones que
15 contienen ATH, y productos sanitarios que comprenden ATH. Tal y como se describe en este documento, el ATH presenta diversas ventajas sobre la heparina. Normalmente se utilizan anticoagulantes heparinoides para el tratamiento y la prevención de enfermedades trombóticas. Los heparinoides funcionan catalizando la actividad anticoagulante del inhibidor de la proteasa del plasma, la antitrombina. La heparina no fraccionada (UFH) y sus derivados de bajo peso
20 molecular (LMWH) presentan diversas carencias, incluyendo su reducido promedio de vida, su respuesta anticoagulante variable, su limitada eficacia a la hora de inhibir la trombina (especialmente, la trombina vinculada a la coagulación), la inducción de hemorragia y la inducción de trombocitopenia.

El ATH puede resolver muchos de estos problemas cuando se utiliza como agente
25 terapéutico. En comparación con los heparinoides tradicionales, el ATH tiene un promedio de vida más prolongado, una menor vinculación con las proteínas del plasma y las células endoteliales y una mayor eficacia antitrombótica en modelos animales sin un incremento del riesgo de hemorragia. *In vitro*, el ATH inhibe directamente diversos factores de coagulación, con unas tasas significativamente más elevadas en comparación con las mezclas no covalentes
30 de AT y UFH (AT+H). El ATH también resulta más eficaz a la hora de inhibir la trombina relacionada con la coagulación, en comparación con AT+H.

En algunas realizaciones de la presente invención, el ATH puede utilizarse para fabricar revestimientos para productos sanitarios. En una realización, un método de revestimiento de

una superficie polimérica con un conjugado de antitrombina-heparina puede incluir la puesta en contacto de la superficie polimérica con una solución del conjugado de antitrombina-heparina, de forma que el conjugado de antitrombina-heparina recubra directamente la superficie de poliuretano, sin presencia de grupos ligantes entre el conjugado de antitrombina-heparina y la superficie polimérica.

Pueden utilizarse los métodos conocidos de fijación covalente de las moléculas a las superficies poliméricas para fijar el ATH a una superficie polimérica de un producto sanitario. Por ejemplo, la superficie polimérica se puede activar en primer lugar mediante su tratamiento con un oxidante o reductor, y después se puede unir un grupo ligante a la superficie activada. A continuación, el ATH puede unirse al monómero. En un ejemplo, se activa una superficie de poliuretano haciéndola reaccionar con hipoclorito sódico o con hidruro de litio y aluminio. A continuación, se injerta alil glicidil éter en la superficie, para que actúe como grupo ligante. A continuación, el ATH se une al grupo ligante.

Aunque el ATH puede fijarse de este modo a las superficies utilizando grupos ligantes, se ha demostrado que, sorprendentemente, el ATH también puede unirse directamente a una superficie polimérica, sin ningún grupo ligante. De este modo, la presente invención proporciona unos métodos muy sencillos para el revestimiento de las superficies poliméricas con ATH sin activar la superficie polimérica ni unir un grupo ligante a la superficie. En algunos ejemplos, simplemente se puede poner en contacto la superficie polimérica con una solución de ATH mediante inmersión o por cualquier otro método. El ATH se puede unir directamente a la superficie y permanecer unido a ella incluso tras el lavado con detergentes. Este método puede resultar útil para el revestimiento de productos sanitarios que entran en contacto con la sangre, a fin de reducir la trombogenicidad de los productos sanitarios.

La superficie polimérica puede estar compuesta por cualquier polímero utilizado para la fabricación de productos sanitarios. En algunas realizaciones, la superficie polimérica puede ser una superficie de poliuretano, una superficie de polietileno, una superficie de polipropileno, una superficie de tetrafluoruro de polietileno, una superficie de polidimetilsiloxano, una superficie de copolímero de etileno-ácido acrílico, una superficie de Dacron, una superficie de poliéster-poliuretano, una superficie de poliuretano-policarbonato, una superficie de cloruro de polivinilo, una superficie de silicona, una superficie de goma látex, una superficie de nitinol, una superficie de Nylon, una superficie de Tereftalato de polietileno, una superficie de poliestireno, o combinaciones de dichos productos. En otras realizaciones, la superficie polimérica puede incluir materiales de Ioplex y otros hidrogeles, como los basados en metacrilato de 2-hidroxietilo

o acrilamida y ureas de poliéter poliuretano (PEUU), incluyendo Biomer (Ethicon Corp.) y Avcothane (Avco-Everrett Laboratories).

La superficie polimérica puede formar parte de un producto sanitario que entra en contacto con la sangre. En algunas realizaciones, el producto sanitario puede ser un catéter intravenoso, un catéter intra-arterial, un catéter central de inserción periférica, un catéter central, un catéter de Swan-Ganz, un stent coronario, una derivación arteriovenosa, un filtro de la vena cava inferior, un catéter de diálisis, una línea de circuito sanguíneo de diálisis, una membrana de diálisis, una línea extracorpórea de oxigenación de la membrana, una membrana de oxigenación de la membrana extracorpórea, una prótesis *in vivo*, un electrodo de marcapasos, una sutura, un filtro de sangre, una válvula mecánica, un órgano artificial, o un contenedor de almacenamiento de sangre. Cualquier producto sanitario interno o externo que entre en contacto con la sangre y a causa del cual resultaría deseable reducir la coagulación de la sangre podría estar revestido con ATH.

En una realización específica, el producto sanitario puede ser un catéter con un revestimiento de ATH. Los catéteres suelen fallar debido a la trombosis inducida por la superficie. El revestimiento de estos dispositivos con anticoagulantes convencionales, como la heparina, puede aportar mejoras de carácter limitado, pero sigue siendo un serio problema la oclusión del dispositivo a causa de los coágulos. Los dispositivos revestidos con ATH exhiben unas propiedades antitrombóticas netamente superiores, y pueden utilizarse sin que se produzca ninguna oclusión causada por trombos.

En un ejemplo, se puede revestir un catéter con ATH, sumergiendo el catéter en una solución de ATH. El interior del catéter puede ponerse en contacto con la solución de ATH haciendo llegar la solución hasta el lumen del catéter utilizando una jeringa. A continuación, el catéter puede dejarse incubando durante un período de tiempo, para permitir que el ATH se adhiera a las superficies poliméricas del catéter. Este período de tiempo puede oscilar, por ejemplo, entre 0,1 y 48 horas, 1 y 48 horas, 1 y 24 horas, 2 y 8 horas, o cualquier otro período de tiempo que sea suficiente para que el ATH se adhiera a la superficie polimérica. A continuación, el catéter puede retirarse de la solución de ATH, y puede vaciarse el exceso de solución de ATH del catéter, dejando secar el resto de revestimiento de la solución de ATH. El secado puede durar un período de tiempo suficiente para que el disolvente se evapore de la solución de ATH con la que está revestido el catéter. En una realización, el catéter puede secarse al aire, a temperatura ambiente. El tiempo de secado puede oscilar, por ejemplo, entre 1 y 48 horas, 1 y 24 horas, 1 y 8 horas, o entre 1 y 2 horas. En otras realizaciones, el catéter

puede dejarse secar al chorro de aire procedente de un dispositivo de soplado, al aire ambiente o por exposición a a un chorro de aire caliente (que puede ser aire calentado a aproximadamente 60 °C), o al aire ambiente o por exposición a chorro de aire deshumidificado, en atmósfera de nitrógeno o por exposición a a un chorro de nitrógeno, en atmósfera de gas noble o por exposición a a un chorro de gas noble, o al vacío, parcial o total. El tiempo de secado puede reducirse cuando se utiliza un chorro, de aire o de otro gas, deshumidificado o caliente. El tiempo de secado también se puede reducir sustancialmente cuando se efectúa al vacío, parcial o total. Por ejemplo, el tiempo de secado puede oscilar entre 1 minuto y 48 horas, 1 minuto y 24 horas, 1 minuto y 1 hora, de 1 a 30 minutos, o cualquier otro tiempo de secado que resulte suficiente. Una vez secado, el catéter puede utilizarse *in vitro* o esterilizarse para su utilización en aplicaciones médicas. Un método de esterilización puede incluir la colocación del catéter en un recipiente hermético que contenga una membrana permeable al gas y esterilizando el catéter y el contenedor mediante su exposición al óxido de etileno.

Pueden utilizarse diversos métodos de revestimiento de un catéter u otro producto sanitario con ATH. Por ejemplo, un producto sanitario se puede sumergir en una solución de ATH e incubarse durante un período de tiempo suficiente para permitir que el ATH se adhiera a las superficies del producto sanitario. En otro ejemplo, puede utilizarse un método de circulación, en el cual se pone en contacto el producto sanitario con una solución de ATH circulante. En un ejemplo concreto, el producto sanitario puede ser un catéter, y la solución de ATH puede circular alrededor del catéter a fin de que la solución de ATH circule por las superficies exteriores e interiores del catéter. La solución de ATH puede reciclarse continuamente y circular a través del catéter durante un período de tiempo suficiente para que el ATH se adhiera a las superficies del catéter.

Pueden revestirse simultáneamente múltiples dispositivos médicos en un solo lote de solución de ATH. Por ejemplo, puede prepararse un volumen suficiente de solución de ATH para sumergir cualquier número de productos sanitarios para su incubado en la solución. Adicionalmente, la solución de ATH se puede utilizar para revestir múltiples lotes de productos métodos de forma secuencial. Teniendo en cuenta que el revestimiento de ATH formado sobre la superficie del producto sanitario puede tener un espesor de tan sólo una molécula, la mayor parte del ATH de la solución seguirá manteniéndose en la solución con posterioridad al revestimiento de un producto sanitario. Por ejemplo, una capa de ATH con un espesor de una molécula puede contener alrededor de 2 pmoles de ATH/cm² de superficie. No obstante, 100 mL de una solución de 1 mg ATH/mL contienen un total de $1,69 \times 10^6$ pmoles de ATH. Por lo

tanto, la solución contiene suficiente ATH para formar un revestimiento con un espesor de una molécula en muchos productos sanitarios. En una realización, puede prepararse un lote con una solución de ATH, y a continuación se puede sumergir una pluralidad de productos sanitarios e incubarse en la solución de ATH. Tras la incubación, pueden retirarse los productos sanitarios, y la solución de ATH sobrante puede verse de nuevo en el lote de solución de ATH. A continuación, este mismo lote de solución de ATH puede reutilizarse para revestir otra pluralidad de productos sanitarios. Este proceso puede repetirse en múltiples ocasiones para revestir un elevado número de productos sanitarios con un único lote de solución de ATH. En algunos casos, el proceso puede repetirse hasta en cinco ocasiones, hasta en 10 ocasiones, hasta en 20 ocasiones, o incluso hasta en 50 ocasiones antes de preparar un nuevo lote de solución de ATH.

En un método de circulación continua, la solución de ATH podría potencialmente reciclarse indefinidamente de forma que llegue a utilizarse todo el ATH de la solución. Por ejemplo, la solución de ATH puede reciclarse a medida que se reviste con la solución una serie de productos sanitarios. Cuando la concentración de ATH de la solución de ATH cae por debajo de un valor umbral, como 0,1 mg ATH/mL, 0,5 mg ATH/mL, 0,8 mg ATH/mL, o 0,9 mg ATH/mL, puede añadirse más ATH a la solución de este ejemplo.

En un ejemplo específico, un grupo formado por 50 catéteres puede revestirse con ATH. Esta operación puede llevarse a cabo sumergiendo los catéteres en 200 mL de una solución tampón de 1 mg ATH/mL para sumergir simultáneamente los 50 catéteres. Alternativamente, pueden revestirse por inmersión 5 o 10 catéteres simultáneamente utilizando un solo lote de solución de ATH. De este modo, el lote de solución de ATH requerido podrá reducirse de 200 mL a 40 mL o 20 mL.

Los catéteres y demás productos sanitarios revestidos con ATH pueden mantenerse operativos durante un período de tiempo considerablemente mayor que los dispositivos revestidos con heparina. Por ejemplo, los catéteres revestidos con ATH pueden mantenerse permeables en una vena o artera hasta un máximo de un año sin utilizar ningún tipo de anticoagulante. En ciertos casos, un catéter revestido con ATH puede mantenerse permeable en una vena o arteria durante un período de entre 1 semana y 1 año, de entre 1 mes y 6 meses, de entre 2 y 6 meses o cualquier otro período de tiempo prolongado. En algunos casos, un producto sanitario revestido con ATH puede mantenerse indefinidamente libre de coágulos, o al menos durante el tiempo que se utilice el producto. De este modo, no es necesario retirar y sustituir el dispositivo implantado a un paciente debido a la formación de coágulos. Esta mayor

capacidad del ATH puede deberse, al menos parcialmente, al hecho de que el ATH puede ser un anticoagulante sustancialmente 100% activo, mientras que la heparina puede contener un elevado porcentaje de cadenas inactivas de heparina.

5 En una realización específica, puede recurrirse al revestimiento por liofilización para revestir una superficie polimérica de un producto sanitario con ATH. La superficie polimérica puede ponerse en contacto con la solución de ATH en ausencia de grupos ligantes. El exceso de solución de ATH puede dejarse que escurra de la superficie polimérica. A continuación, se puede dejar que el disolvente se evapore de la superficie polimérica bajo vacío, al menos parcial. Esto puede formar un revestimiento seco de ATH sobre la superficie polimérica. En 10 algunos casos, el revestimiento liofilizado puede tener una mayor uniformidad en comparación con los revestimientos obtenidos mediante otros métodos de revestimiento.

Además de revestir catéteres y otros productos sanitarios con ATH, la presente invención también se extiende a soluciones de lavado y sellado de catéteres. Muchas instituciones tienen la costumbre de lavar y sellar los catéteres con una solución de heparina 15 diluida para prevenir la aparición de coágulos, aunque no existe un acuerdo básico en la literatura científica acerca de la eficacia del lavado con heparina para mantener los catéteres permeables. Como anticoagulante, la heparina presenta diversas limitaciones, incluyendo su dependencia de unos adecuados niveles de antitrombina en el plasma, y el hecho de que tan sólo una tercera parte de los preparados comerciales de heparina tienen actividad 20 anticoagulante. La dependencia de la antitrombina del funcionamiento de la heparina es un tema de especial preocupación en niños muy jóvenes, cuando los neonatos, y especialmente los bebés prematuros, tienen unas concentraciones de antitrombina en plasma notablemente inferiores a las de los adultos.

Los revestimientos con heparina se utilizan frecuentemente para hacer que las 25 superficies resulten más antitrombogénicas. Sin embargo, estas superficies no resultan ideales, debido a las filtraciones de la heparina de la superficie, a la sustitución no uniforme y las diferentes actividades anticoagulantes del producto. Teniendo en cuenta que dos terceras partes de la heparina estándar no fraccionada no contienen la secuencia de pentasacáridos requerida para la anticoagulación, esta circunstancia limita el nivel de actividad anticoagulante 30 que puede conseguirse en la superficie modificada. Además, las cadenas de heparina no anticoagulante pueden seguir favoreciendo la deposición de proteínas sobre la superficie, lo que puede favorecer la aparición de trombos. Estos problemas se pueden evitar utilizando ATH.

En una realización, una solución para el lavado y el sellado de un catéter intravenoso o intra-arterial puede incluir un conjugado de antitrombina-heparina.

En otra realización, un sistema de lavado y sellado puede incluir: un catéter intravenoso o intra-arterial; una solución de limpieza y sellado configurada para su introducción a través del catéter, comprendiendo dicha solución de limpieza y sellado un conjugado de antitrombina-heparina; y una jeringa configurada para inyectar la solución de limpieza y sellado en el catéter.

En otra realización adicional, un método de mantener la permeabilidad de un catéter puede incluir: la inserción de un catéter en una vena o arteria de un paciente, de forma que una abertura interior del catéter se abra al interior de la vena o arteria, y una abertura exterior del catéter se abra hacia el exterior del paciente; la inyección de una solución que comprenda un conjugado de antitrombina-heparina en el catéter a través de la abertura exterior del catéter; y el sellado de la abertura exterior del catéter de forma que al menos una parte de la solución que comprende el conjugado de antitrombina-heparina permanezca en el interior del catéter.

Cuando se utiliza de este modo una solución de limpieza y sellado con un catéter, el catéter permanece en contacto con la solución de ATH tras su preparación y cierre. Mientras el catéter se mantiene en contacto con la solución de ATH, el ATH puede fijarse a las superficies del catéter como se ha descrito anteriormente. De este modo, cada vez que el catéter se lava y prepara con una solución de ATH, el catéter puede seguir revistiéndose mediante ATH. Cuando la solución de limpieza y sellado se inyecta a través del catéter, el ATH puede fijarse tanto a las superficies interiores como a la boquilla del catéter. De este modo se puede prevenir la formación de trombos en el interior del lumen del catéter, así como en la punta del catéter.

El ATH puede encontrarse presente en la solución de limpieza y sellado en una cantidad variable entre 0,01-10 mg ATH/mL, 0,1-1 mg ATH/mL, u otra cantidad efectiva. Otros componentes de la solución pueden incluir agua, cloruro sódico y reguladores.

Teniendo en cuenta que la fracción de heparina presente en el ATH ya cuenta con una molécula de AT permanentemente enlazada, la parte de la cadena de heparina que se encuentra plenamente disponible para su interacción con las proteínas del plasma y las superficies celulares es menor que la heparina total. El ATH se une menos a las proteínas del plasma y superficies endoteliales (de capa única HUVEC) en comparación con la heparina. Si el revestimiento de ATH se une a las plaquetas, a diferencia de los revestimientos de heparina, el ATH no activa las plaquetas. Por lo tanto, los catéteres que cuentan con el revestimiento de ATH permanecen libres de trombos cuando en los catéteres con revestimiento de heparina se empezarían a formar trompos y se quedarían atascados. Aun cuando se activen las plaquetas a

causa de la estasis u otros fenómenos biofísicos, el ATH es superior a la heparina (UFH) en lo que respecta a la inhibición del complejo protrombinasa y la generación de trombina concomitante en las superficies activadas de las plaquetas. Teniendo en cuenta la gran superioridad del ATH como anticoagulante frente a la heparina, el ATH puede resultar mucho más eficaz a la hora de prevenir el inicio de la coagulación. Esto se ve especialmente subrayado por el hecho de que, aunque la heparina no será capaz de inhibir los factores de coagulación activados en el interior de la boquilla del catéter, a menos que también se encuentre presente AT del plasma, el ATH ya cuenta con una molécula de AT extremadamente reactiva que puede inhibir directamente los factores de coagulación.

Adicionalmente, el ATH presenta unas actividades anti-Xa o anti-IIa, y una catálisis de la inhibición por parte de la AT del factor Xa o trombina muy superiores. De hecho, se ha demostrado que la potencia del complejo ATH es más de cuatro veces superior, en lo que respecta a la tasa de inhibición de la trombina, que la de la AT + H (heparina). También se ha demostrado que la actividad catalítica del anti-factor Xa es similar para el ATH frente a la heparina. El ATH también puede inhibir directamente por sí mismo los factores de coagulación sin necesidad de añadir AT, algo que no puede hacer la heparina. El ATH puede inhibir directamente todos los factores de coagulación de la cascada de coagulación. Por el contrario, se ha documentado perfectamente la necesidad de AT en el mecanismo anticoagulante de la heparina. A diferencia de la heparina, el ATH puede inhibir fácilmente la trombina adherida a los coágulos de fibrina e inhibir el factor Xa adherido a complejos con superficie de fosfolípidos, como la protrombinasa. De hecho, una vez que el ATH inhibe la trombina de la superficie de los coágulos, el complejo ATH permanece adherido, convirtiendo la superficie del coágulo en un anticoagulante debido a la cadena activa de heparina del ATH. Estas y otras ventajas convierten al ATH en un producto muy útil para su uso en una solución de limpieza y sellado. Teniendo en cuenta la superior potencia del ATH, así como otras ventajas, se precisarán unas concentraciones mucho menores de ATH en la solución de sellado en comparación con las soluciones de heparina. Por ejemplo, el ATH puede presentar al menos 5 veces más actividad inhibitoria anti-Xa catalítica en comparación con la heparina no fraccionada.

A veces se utiliza citrato para las soluciones de limpieza y sellado. En comparación con el citrato como solución de limpieza y sellado, el ATH puede mantener la permeabilidad del catéter durante un período de tiempo más prolongado a concentraciones más bajas. El Citrato impide que se produzca la coagulación mediante la quelación del calcio de la sangre. No obstante, una vez que el citrato se ha unido a un ión calcio, ya no podrá impedir la coagulación

uniéndose a más calcio. Así pues, una vez que el citrato queda saturado, habrá más calcio del flujo sanguíneo que inicie la cascada de la coagulación. Por otra parte, el ATH puede continuar catalizando la inhibición mediante la presencia de AT en el plasma. De este modo, el ATH no se satura ni se consume nunca, y continuará operando.

5 El ATH puede inhibir la trombina directamente (sin AT añadida) 3,2 veces más rápido que la AT + heparina. El ATH puede inhibir los complejos del factor VIIa con factor de tejido 28 veces más rápido que la AT + heparina. En función de estas diferencias, una concentración de ATH $3,2 \times 28 = 89,6$ menor puede dar una velocidad de reacción equivalente a la hora de inhibir la cascada de coagulación, en comparación con la heparina. De este modo, la
10 concentración de ATH puede ser al menos 89,6 veces menor que la concentración de heparina utilizada en las soluciones de limpieza y sellado, incluso sin tener en cuenta el revestimiento no covalente de la superficie del catéter con ATH que se producirá a causa de la presencia de la solución de sellado de ATH.

Las actuales soluciones de limpieza y sellado que contienen heparina tienen como
15 consecuencia que un 20% de los catéteres venosos centrales se obstruyan y precisen ser sustituidos. Si se utiliza ATH en la solución de limpieza y sellado, este 20% de CVCs podrán mantener su permeabilidad sin precisar ser sustituidos.

La sustitución de catéteres se eleva a una media de 10.000 unidades diarias tan sólo en los EE.UU. a causa de las complicaciones. La utilización de soluciones de limpieza y sellado a
20 base de ATH puede reducir el número de catéteres que han de ser reemplazados. Esto reduciría los costes de sustitución, aumentaría la calidad de vida del paciente (menor tiempo de hospitalización), impediría que se perdiesen días de tratamiento (como en el caso de las terapias contra el cáncer que han de detenerse mientras se espera a que se programe una intervención para un cambio de CVC), reduciría los costes quirúrgicos y aumentaría el tiempo
25 del que dispondría el médico para atender a otros pacientes.

En un ejemplo, se utilizó ATH para revestir de forma permanente la superficie de los stents y de los CVCs, que a continuación se probaron en modelos animales. Los stents y CVCs con revestimiento de ATH exhibieron una menor formación de coágulos en comparación con los stents y CVCs revestidos con heparina y los stents y CVCs sin revestimiento.

30 Dado que no resulta factible revestir con un anticoagulante los diferentes tipos y marcas de CVCs, muchas instituciones optan por enjuagar los catéteres con una solución anticoagulante para impedir la aparición de coágulos relacionados con el catéter. La utilización

de una solución de limpieza y sellado que contenga ATH puede resultar más eficaz que el uso de una solución de heparina.

La presente invención también se extiende a métodos de tratamiento de afecciones utilizando ATH. El ATH se puede utilizar para el tratamiento de diversas afecciones que requieren la inhibición de la trombogénesis. En algunos casos, puede utilizarse ATH formado a partir de heparina no fraccionada. En otros casos, el ATH puede fabricarse a partir de heparina de la que se hayan eliminado las cadenas de heparina de bajo peso molecular. En una realización, un método de tratamiento de una afección médica mediante la inhibición de la trombogénesis en un mamífero puede incluir la administración al mamífero de una dosis de un conjugado de antitrombina-heparina, donde al menos el 98% de las cadenas de heparina del conjugado de antitrombina-heparina tengan un peso molecular superior a 3.000 Daltons.

En algunas realizaciones, el ATH puede administrarse durante un procedimiento invasivo para reducir el riesgo de complicaciones tromboembólicas. Los procedimientos invasivos, como el bypass cardiopulmonar (BPC), generan cantidades masivas de microémbolos de fibrina que pueden alojarse en el cerebro, pudiendo provocar disfunciones cognitivas a largo plazo. Se ha demostrado que el ATH reduce significativamente las Señales transitorias de alta intensidad (HITS) en las arterias carótidas de los cerdos sometidos a bypass cardiopulmonar (BPC). La reducción de las HITS puede indicar un menor riesgo de complicaciones tromboembólicas durante el BPC y una reducción de las disfunciones neurológicas post-quirúrgicas con ello relacionadas. El descenso de las HITS con ATH, en comparación con el tratamiento mediante UFH + AT, se logró sin un incremento significativo del sangrado (durante o después del BPC). La superior capacidad del ATH para inhibir la trombina relacionada con coágulos de fibrina y su mayor vida media en comparación con la heparina pueden ser responsables de esta mejora del rendimiento durante el BPC.

Con fines profilácticos (en pacientes protrombóticos no sometidos a un tratamiento de coagulación), el ATH se puede administrar por vía intravenosa a una dosis variable entre 1 unidad (en términos de actividad del anti-factor Xa) por kilogramo (unidad/kg) y 1000 unidades/kg, estando la dosis típica en torno a 100 unidades/kg. Si el ATH muestra una actividad del anti-factor Xa de 130 unidades por miligramo (unidades/mg), en términos del componente AT del ATH, las dosis de ATH pueden oscilar entre aproximadamente 0,008 mg y aproximadamente 8 mg, siendo una dosis típica de aproximadamente 0,8 mg. Las dosis también pueden determinarse en términos de mg del componente heparina del ATH sabiendo que la proporción de AT frente a heparina en el ATH es de 59 mg frente 18 mg. Teniendo en

cuenta la mayor vida media intravenosa del ATH que la de la heparina, el ATH no precisa administrarse con tanta frecuencia. De este modo, el ATH podría administrarse entre una vez al día y una vez a la semana, siendo lo más corriente una vez al día.

Para la resolución de un coágulo, el ATH se puede administrar por vía intravenosa con una dosis variable entre 50 unidades (en términos de actividad del anti-factor Xa) por kilogramo (unidades/kg) y 2000 unidades/kg, siendo la dosis típica de aproximadamente 300 unidades/kg. Si el ATH tiene una actividad anti-factor Xa de 130 unidades/mg (en términos del componente AT del ATH), las dosis de ATH podrán oscilar entonces entre aproximadamente 0,4 mg y aproximadamente 15 mg, siendo la dosis típica de aproximadamente 2,3 mg. Teniendo en cuenta que la vida media intravenosa del ATH es más prolongada que la de la heparina, no tendrá que administrarse con tanta frecuencia. Así pues, el ATH podrá administrarse entre tres veces al día y dos veces por semana, siendo lo más corriente dos veces al día. Una vez que ha disminuido suficientemente el tamaño el coágulo, pueden reducirse la dosis y la frecuencia del tratamiento con ATH, o interrumpirse dicho tratamiento.

En el caso de la administración profiláctica durante una intervención quirúrgica, la dosis puede depender del tipo de cirugía, siendo los procedimientos más invasivos los que requieren unas dosis de ATH más elevadas. Una de las cirugías más invasivas y que provoca más daños es la cirugía de bypass, que puede tratarse con dosis de ATH (en términos del componente AT del ATH) variables entre 1 y 6 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, puede utilizarse una dosis de ATH de 3 mg/kg durante la cirugía de bypass.

El ATH puede administrarse por vía intravenosa, en forma de una solución que contenga sales simples iso-osmóticas (como NaCl 0,15 M) y reguladores fisiológicamente aceptables (como HEPES a un pH de 7,4). No se precisa ninguna otra proteína, disolvente, adyuvante u otro tipo de aditivos, pero pueden incluirse opcionalmente sin que ello produzca ningún efecto perjudicial significativo sobre la función del ATH.

El ATH puede aportar diversas ventajas frente a la heparina como anticoagulante sistémico. Uno de los problemas asociados a los anticoagulantes es el sangrado. Puede producirse el sangrado cuando se tiene demasiado anticoagulante en sangre. El ATH tiene una alta actividad anticoagulante, pero provoca un menor sangrado, comparado con la heparina. El ATH también presenta otras ventajas frente a la heparina. La AT del ATH siempre está activada y se ha eliminado el paso de unión de la heparina a la AT, que es lo que determina la frecuencia. Adicionalmente, el ATH inhibe directamente los factores de coagulación activados, como la trombina, con unas tasas más rápidas que la heparina. La heparina puede unirse de

forma no selectiva a las proteínas del plasma y de la superficie celular *in vivo*, y sin embargo, dicha unión no selectiva se reduce con el ATH. Además, el ATH tiene una vida media intravenosa más prolongada que la heparina. Por último, ya que la AT unida de forma covalente abarca una porción significativa de las cadenas de heparina del ATH, se reducen las interacciones adversas con las plaquetas, de forma que se mantiene la función normal de la plaqueta.

En otra realización de la presente invención, el ATH se puede utilizar para el tratamiento de la conjuntivitis leñosa. Un método de tratamiento de la conjuntivitis leñosa en un mamífero puede incluir la administración de una dosis del conjugado de antitrombina-heparina en un ojo del mamífero.

La oclusión retinal venosa causada por la trombosis ocular sólo está superada por la retinopatía diabética como causa de deficiencias o pérdidas de visión provocadas por enfermedades vasculares retinales. En el caso de que exista una deficiencia de plasminógeno, se produce la conjuntivitis leñosa provocada por una membrana de fibrina que cubre el ojo y oscurece la visión. El tratamiento de este problema trombótico con colirios a base de plasminógeno tiene unas proporciones modestas debido a los inhibidores, y los colirios a base de heparina son tan sólo parcialmente eficaces debido a la presencia variable de la antitrombina del plasma que es activada por la heparina. El ATH, a diferencia de la heparina, puede quedarse aislado fuera de los espacios vasculares, debido a sus grandes dimensiones. Asimismo, el ATH contiene antitrombina, por lo que no depende del sistema del paciente para aportar este agente a fin de que opere la heparina como anticoagulante. De este modo, el ATH puede tratar o prevenir con mayor eficacia la trombosis ocular. En un ejemplo, la conjuntivitis leñosa puede tratarse mediante la administración diaria de un colirio que contenga ATH. El ATH puede estar presente en el colirio con una concentración de 0,01 a 10 mg de ATH/mL, de 0,1 a 2 mg de ATH/mL, o de aproximadamente 1 mg de ATH/mL.

En otra realización, puede revestirse una lente de contacto con ATH. El paciente podrá llevar en el ojo la lente revestida para prevenir la trombosis ocular.

La gingivitis leñosa es otra afección relacionada con la deficiencia de plasminógeno. Puede utilizarse el ATH para el tratamiento de la gingivitis leñosa. En una realización, puede aplicarse periódicamente una solución de ATH por vía tópica en las encías del paciente, para prevenir la formación de fibrina en las encías.

En una realización adicional, puede utilizarse el ATH para el tratamiento de desórdenes de coagulación en los pulmones. Estos pueden incluir el síndrome de dificultad respiratoria

(SDR) y las lesiones pulmonares agudas, causadas, por ejemplo, por la ventilación mecánica. Los experimentos realizados en plasma sobre células epiteliales pulmonares distales fetales (FDLE) han confirmado que el ATH inhibe la generación de trombina en mayor medida que una dosis equivalente de AT + UFH. Este resultado demuestra que el ATH se puede utilizar para la
5 prevención o el tratamiento de la coagulación intrapulmonar. Mediante la instilación intratraqueal de ATH se consigue una elevada actividad anticoagulante en el líquido de lavado a lo largo de 48 h, sin actividad sistémica mensurable. Además, el ATH muestra una tendencia a la proliferación selectiva de epitelio en relación con los fibroblastos. Así pues, el ATH presenta muchas de las características necesarias para aliviar los principales factores que contribuyen al
10 SDR, DBP y enfermedades pulmonares inducidas por la ventilación.

El SDR neonatal y en adultos se caracteriza por la fuga de proteínas del plasma de diversos tamaños al espacio aéreo, lo que tiene como consecuencia la generación de trombina intersticial e intra-alveolar, con la consiguiente deposición de fibrina. Existen serias y convincentes evidencias que muestran claramente que la coagulación, que provoca la
15 formación de fibrina, sigue siendo uno de los efectores, clave en las lesiones pulmonares. Ausente en un pulmón normal, la presencia de fibrina en los compartimentos alveolares e intersticiales, a lo largo de la evolución de las lesiones alveolares difusas, sigue siendo una de las características más prominentes del SDR. Desde la introducción de las terapias con surfactantes, se ha reducido la cantidad de fibrina directamente observada en pacientes de
20 SDR. Sin embargo, teniendo en cuenta que en el SDR se encuentra presente una importante actividad de la trombina pulmonar, puede darse una carencia de polímero de fibrina entrecruzada debido al hecho de que la fibrina puede abandonar rápidamente el pulmón, como sucede con diversos tumores sólidos. De hecho, se ha observado que la mejora en la fibrinolisis intrapulmonar disminuye la fibrosis, lo que es otra demostración de la actividad de la fibrina en
25 las lesiones pulmonares. La rotación de la fibrina en los pulmones de pacientes de SDR/DBP se ve alterada a nivel local, de forma similar a lo que sucede con el SDR agudo. Además, los depósitos de fibrina en la vasculatura y en la arteria pulmonar indican la existencia de mecanismos vasoconstrictores cuando se produce una mayor resistencia vascular pulmonar en el SDR. Los depósitos de fibrina intra-alveolar pueden tener importantes efectos negativos,
30 tanto a corto como a largo plazo. Se ha demostrado que la fibrina perjudica de forma significativa la función tensioactiva, mientras que los productos relacionados con la degradación de la fibrina están vinculados a una mayor permeabilidad de la membrana alveolar-capilar, aumentando así las fugas al espacio aéreo de proteínas del plasma. Otra prueba de la

activación de los sistemas coagulantes y fibrinolíticos en el espacio intra-alveolar la constituye la presencia de un exceso de procoagulante y un déficit de actividades fibrinolíticas en el líquido de lavado bronco-alveolar (BAL) procedente de pacientes de SDR. Las fugas de proteína hacia los pulmones se han asociado a la activación sistémica de los linfocitos polimorfonucleares, linfocitos complemento y linfocitos de la coagulación. Los fibroblastos son activados por la fibrina y proliferan en áreas que la contiene, lo que conlleva un remodelado inadecuado de los tejidos pulmonares, como en el caso de la fibrosis.

La fibrina se produce por la división del fibrinógeno por la trombina, entrecruzándose posteriormente. Se ha demostrado que el inicio de la coagulación *in vivo* es básicamente el resultado de la aparición del factor tisular activo (FT). Los experimentos en los que se ha investigado la generación de trombina procedente de plasma en una mezcla de células pulmonares FDLE y fetales han demostrado que la actividad procoagulante en el epitelio pulmonar o los fibroblastos era debida a la activación del factor VIIa por el FT adherido a la superficie celular. De hecho, se ha identificado al FT como el único activador de la coagulación en cultivos de células de cáncer de pulmón. Los datos adicionales han demostrado que los neonatos prematuros presentan en el espacio aéreo una actividad trombótica similar a la del FT. Como característica conjuntiva, los pulmones menos desarrollados en el estado prematuro o fetal son más permeables que los de los adultos a las moléculas que acceden al espacio aéreo procedentes de la circulación sistémica. De este modo, cualquier sustrato pulmonar del FT u otra actividad coagulante tiene mayores oportunidades de contactar con los factores de la cascada de coagulación en los recién nacidos, produciendo los depósitos de fibrina y las complicaciones detectadas en el SDR. De este modo, el estado de desarrollo puede influir sobre la susceptibilidad del individuo para las agresiones protrombóticas. Otras lesiones agudas pueden producirse como consecuencia de factores biológicos o mecánicos, que pueden estar asociados a patologías coagulantes. Por ejemplo, en el caso de una infección, existen importantes evidencias de generación de trombina pulmonar con resultados perjudiciales. Más recientemente, se ha demostrado la existencia de ciertos mecanismos físicos que provocan la generación de trombina y los depósitos de fibrina. Desde hace algún tiempo se sabe que los pacientes (especialmente los más jóvenes) que requieren ventilación mecánica prolongada muestran evidencias de daños en las estructuras tisulares del pulmón. Además, se ha indicado la existencia de coagulación pulmonar y circulatoria como resultado de la ventilación, que puede contrarrestarse mediante la administración de AT sistémica. Asimismo, el volutrauma ventilatorio ha producido lesiones pulmonares, que a su vez han provocado un deterioro en el

intercambio de gases, que se ha visto mejorado por la heparina. Una vez más puede inferirse que los daños inducidos por la ventilación asociados a la trombosis resultan especialmente importantes en los pacientes jóvenes. Los experimentos han demostrado que una ventilación con un elevado volumen tidal en ratas causa la liberación de FT funcional, tanto en la
5 circulación como en las vías aéreas del pulmón. La generación de FT y trombina sólo se indujo en neonatos, pero no en animales adultos. Esto está en línea con otros resultados, en los que la actividad coagulante relacionada con el FT sólo se expresaba en humanos adultos con unos volúmenes tidales muy elevados, y sin presión espiratoria final positiva. La aparición de picos de actividad trombótica en ratas recién nacidas se produjo al cabo de menos de 15 min y
10 persistió a lo largo de períodos de una hora de duración. Teniendo en cuenta la relación existente entre los depósitos de fibrina y la viabilidad pulmonar, el control de la actividad procoagulante del FT durante una lesión aguda (ventilatoria) o crónica (DBP) puede beneficiar la resistencia a la disfunción pulmonar y a la alteración adversa de los tejidos. Resulta interesante que es probable que el control de los daños también atenúe la permeabilidad del
15 tejido pulmonar, lo que lleva a la presencia de fibrina y otras proteínas del plasma que inhiben la acción tensoactiva. De hecho, un agente que pudiese neutralizar la acción del FT, bloquear las vías que conducen a la disfunción de las células pulmonares y a una remodelación moderada de los tejidos durante una lesión pulmonar mejoraría enormemente el resultado en los pacientes, especialmente entre la población pediátrica.

20 El ATH puede hacer frente a muchas de las limitaciones que se encuentran en el tratamiento de los depósitos de fibrina pulmonar por parte de la UFH. El ATH presenta una actividad inhibitoria directa no catalítica frente a la trombina que es de 4 a 10 veces más rápida que la de las mezclas no covalentes de AT + UFH. La rápida tasa de inhibición directa de la trombina por parte del ATH garantizaría la neutralización de los bajos niveles de trombina
25 implicados en la activación de la generación de trombina, y se encontraría presente en el líquido del edema, en el que las concentraciones de AT del plasma podrían ser insuficientes para inhibir la trombina. Además, la gran capacidad del ATH para catalizar la reacción de la AT con la trombina le permitiría también utilizar cualquier AT que acceda a los espacios alveolares. Aparte de la rápida inhibición de la trombina en la fase líquida, el ATH puede inhibir la trombina
30 adherida a la fibrina que es resistente a la reacción con AT·UFH no covalente. La inhibición de la trombina adherida a los coágulos contribuye a reducir los coágulos venosos por parte del ATH sin que aumenten de forma significativa los efectos secundarios hemorrágicos. En el caso de las superficies FDLE, el ATH ha demostrado ser muy superior a la hora de inhibir la

generación de trombina de plasma en comparación con dosis similares de AT + UFH. Además, la comparación del ATH con heparinas no fraccionadas y de bajo peso molecular ha demostrado que el ATH puede inhibir con mayor potencia la generación de trombina en plasmas de adultos, niños o neonatos. La administración intra-traqueal de ATH en conejos y ratas recién nacidas demostró que pueden detectarse unos elevados niveles de actividad anticoagulante en el líquido de lavado al menos de 2 a 4 días más tarde, sin ninguna presencia de antígenos o actividad a nivel sistémico. De este modo, el ATH puede utilizarse como un anticoagulante rápido y potente, que puede inhibir los depósitos de fibrina pulmonar a lo largo de períodos de tiempo prolongados, sin efectos secundarios sistémicos. Tras una sola administración en los pulmones de bebés prematuros con riesgo de lesión pulmonar aguda, el ATH ejerce un interesante efecto diferencial en el crecimiento epitelial *in vitro* frente a fibroblastos, opuesto al impacto ejercido por la AT. La amplia investigación realizada sobre ATH inmovilizado en catéteres de poliuretano e injertos endoluminales ha demostrado que el conjugado presenta una actividad inhibitoria significativamente mayor frente a la trombina *in vitro* y una actividad anticoagulante *in vivo*. El ATH adherido a las matrices alveolares también puede ayudar a controlar el exceso de generación de trombina a nivel local y la acumulación de fibroblastos en comparación con otras células.

Concretamente, el ATH se puede administrar al proporcionar ventilación mecánica. La ventilación mecánica puede dañar los pulmones, especialmente en el caso de neonatos prematuros. Por lo tanto, mediante la administración de ATH a los pulmones de los neonatos, antes o durante la ventilación mecánica, pueden evitarse las complicaciones causadas por la formación de fibrina en los pulmones. Una sola dosis de ATH puede ser suficiente para aportar efectos anticoagulantes en los pulmones durante un prolongado período de tiempo. Por ejemplo, una sola dosis puede tener una duración de entre 6 horas y 1 semana, en algunos casos.

La presente invención también se extiende a una composición específica que incluye ATH junto con la fibrina. El ATH puede incubarse con fibrina fuera del organismo, de forma que la fibrina se adhiera al ATH. A continuación puede utilizarse esta composición para el tratamiento de los coágulos de la sangre. La composición puede inyectarse o administrarse de otra forma para atacar un coágulo. El complejo ATH:Fibrina de la composición tiende a unirse a la otra fibrina presente en el coágulo. Cuando el complejo ATH:Fibrina se adhiere a la superficie del coágulo, la superficie del coágulo adquiere una propiedad anticoagulante neta. De este modo se detiene el crecimiento del coágulo y se permite que se rompa.

En una realización, una composición para el tratamiento de los coágulos de sangre puede contener antitrombina, heparina, y fibrina. Al menos un 50 % en peso de la heparina puede conjugarse con antitrombina para obtener un conjugado de antitrombina-heparina. Al menos una porción de la fibrina puede unirse al conjugado de antitrombina-heparina. En algunos casos, al menos un 50 % en peso de la fibrina puede unirse al conjugado de antitrombina-heparina. El porcentaje puede ser más elevado, uniéndose del orden del 90-100 % en peso de la fibrina de la composición al conjugado de antitrombina-heparina.

La composición del complejo ATH:Fibrina puede prepararse mezclando una solución de ATH con una solución de fibrina. La fibrina puede estar suficientemente diluida o contener un inhibidor de la polimerización de la fibrina, como la amida glicina-prolina-arginina-prolina, de forma que la fibrina no se polimerice en la solución. Cuando la fibrina se une al ATH, si es necesario, puede separarse el complejo ATH:Fibrina de cualquier fibrina no enlazada, a fin de que la composición no introduzca fibrina activa adicional en el organismo del paciente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos muestran las realizaciones de la invención que mejor se conocen en la actualidad. No obstante, ha de entenderse que cuanto sigue no son sino ejemplos ilustrativos de la aplicación de los principios de la presente invención. Cualquier experto en la materia podría concebir numerosas modificaciones y composiciones, métodos y sistemas alternativos sin alejarse del espíritu y el alcance de la presente invención. Las reivindicaciones adjuntas tratan de abarcar dichas modificaciones y configuraciones. De este modo, aunque la presente invención se ha descrito anteriormente de forma particularizada, los siguientes ejemplos facilitan detalles adicionales relativos a lo que en la actualidad se consideran realizaciones prácticas de la invención.

Ejemplo 1

La incubación directa del ATH con un catéter de poliuretano se llevó a cabo de la forma siguiente. Se preparó una solución de ATH, marcada con ATH radioetiquetado (^{125}I -ATH, ATH radioetiquetado utilizando Na^{125}I (de Perkin Elmer, Woodbridge, ON) y marcadores iodobeads (de Thermo Fisher, Ottawa, ON) conforme a las instrucciones del fabricante), utilizándose para realizar las incubaciones con catéteres no activados. Dos de los catéteres (catéteres de

poliuretano de 15 cm de long. y calibre FR 7 fabricados por Solomon) se sumergieron en un cilindro que contenía 53 mL de una solución de 1 mg/mL ATH/¹²⁵I-ATH en PBS diluido 1/10. Se absorbió el líquido del interior de cada catéter mediante una jeringa fijada al mismo, manteniéndose en su lugar mediante la jeringa fija. A continuación, los catéteres se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente agitando con una varilla. Tras las 24 horas de incubación, los catéteres se extrajeron de la solución de incubación y se transfirieron a otro recipiente para su lavado. Los catéteres se lavaron secuencialmente, en volúmenes de 60 mL de: a) fosfato sódico 0,15 M, pH 8.0, b) NaCl 2 M fosfato sódico 0,15 M, pH 8.0, c) 0,1% SDS fosfato sódico 0,15 M, pH 8.0 (efectuándose 3 veces en esta solución), d) NaCl 0,15 M, fosfato sódico 0,02 M pH 7.4 y e) H₂O. Durante cada lavado, la solución de lavado se agitó con una varilla y se hizo subir y bajar por el interior del catéter 50 veces con una jeringa. Tras el lavado, se cortaron segmentos de muestra de 0,5 cm (3 por catéter) y se sometieron a recuento de gamma-radioactividad a fin de determinar la cantidad de ATH radioetiquetado que permanecía adherido al catéter. Cada segmento tenía una superficie total de 1 cm² (interior + exterior). Los resultados se muestran en la tabla 1:

Tabla 1

Número de muestra del catéter	Recuentos por minuto	pmoles de ATH calculados
1	17583	0,265
2	13642	0,206
3	18070	0,273
4	15746	0,237
5	14727	0,222
6	14567	0,220
Promedio	15723	0,237

Los valores de “pmoles de ATH calculados” se calcularon con arreglo a un factor de conversión de que 66.300 recuentos por minuto equivalían a 1 pmol de ATH. Los ensayos ELISA de segmentos de 0,5 cm correspondientes a segmentos de catéteres semejantes para calcular la cantidad de ATH superficial (en términos de la AT detectada por el ensayo) verificaron que la masa total de ATH del catéter también era del orden de una décima de 1 pmol.

Este experimento demuestra que, sorprendentemente, el ATH libre de la solución puede adherirse fuertemente a la superficie del catéter no modificado. Esto también demuestra que

una solución de limpieza y sellado a base de ATH puede ayudar a anticoagular el catéter en la superficie del catéter, ya que el ATH se adherirá a la superficie. Sucede lo contrario que con la heparina, que no se adhiere a la superficie de los catéteres. El ATH siguió adherido tras un copioso lavado con una solución tampón, detergente y un alto contenido de sal. Por el contrario,
 5 no se observó que la heparina se adhiriese a las superficies de poliuretano.

Ejemplo 2

El incubado directo de ATH con un catéter de poliuretano, incluyendo secado, puede
 10 realizarse como sigue. El siguiente ejemplo muestra en detalle como puede aplicarse un revestimiento de antitrombina-heparina (ATH) covalente no modificada a superficies de polímero no reactivas y pasivas sin modificar ni activar previamente el ATH o la superficie de polímero. Se prepara una solución de ATH con un líquido regulador adecuado (con un rango de pH variable entre 4,0 y 10,0, y en algunos casos de aproximadamente 7,4) con una
 15 concentración de ATH (en términos de la fracción de AT) variable entre 0,01 mg/mL y 10 mg/mL y en algunos casos situada en torno a 1 mg/mL. Se sumergieron hasta 20 catéteres (como por ejemplo, catéteres de poliuretano de 15 cm de longitud) en un cilindro que contenía 53 mL de la solución de ATH. El líquido se aspiró del interior de cada catéter mediante una jeringa fijada al mismo y se retuvo mediante la jeringa. A continuación, los catéteres se incubaron durante 24
 20 horas a temperatura ambiente agitando con una varilla. Tras las 24 horas de incubación, se retiraron las jeringas de la solución de incubación, se retiraron los catéteres de la solución de incubación, cada catéter se mantuvo en vertical con el extremo inferior en contacto con un filtro de papel de celulosa, y se dejó que saliese el líquido por gravedad desde el interior y el exterior del catéter a lo largo de un período de tiempo (normalmente, en torno a 1 minuto). A
 25 continuación, los catéteres se suspendieron verticalmente para que se secasen (evaporación del disolvente) sin que la punta inferior tocase superficie sólida alguna. El secado, durante un máximo de 48 horas (en algunos casos, alrededor de 18 horas) puede efectuarse: al aire, a temperatura ambiente, en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, en atmósfera de gases nobles a temperatura ambiente, en una atmósfera abierta de gas calentado a 60 grados
 30 Celsius o en vacío (para liofilización). Una vez secos, los catéteres se utilizan in vitro o se colocan en bolsas precintadas (con membranas permeables al gas) y se esterilizan por exposición a óxido de etileno, para su uso en el futuro en pacientes o en otras aplicaciones médicas.

Ejemplo 3

5 Efectividad de la inhibición por parte del ATH de los factores de Coagulación en las
 Células endoteliales que cubren los vasos sanguíneos (superficie de vasos sanguíneos
 artificiales). Las investigaciones *in vitro* de la inhibición del coagulación por parte del ATH se
 han llevado a cabo básicamente en plasma o soluciones tampón que contenían proteínas
 purificadas. *In vivo*, la superficie endotelial puede modular la coagulación de diversas formas,
 como facilitando emplazamientos para el enlace de receptores de proteína para la trombina que
 10 alteren su actividad (por ejemplo, thrombomodulin (TM)), y expresando moléculas de
 glicosaminoglicano anticoagulante (GAG) (por ejemplo, heparán sulfato (HS)). El objetivo de
 este estudio consistió en comparar las actividades anticoagulantes del ATH y del AT+H en
 presencia de endotelio.

Se adquirieron células endoteliales venosas procedentes de cordones umbilicales
 15 humanos (HUVEC), EBM-2 media y EGM-2MV Bullet Kits a Lonza (Walkersville, MD, EE.UU.).
 Se adquirió un Medio Mínimo Esencial (MEM) a Invitrogen. El IIa y el Xa procedían de Enzima
 Research Laboratories (South Bend, IN, EE.UU.). Los lotes de plasma humano normal y de AT
 humana purificada procedían de Affinity Biologicals (Ancaster, ON, CA). La heparina, el
 bromuro de hexadimetrina (polybrene), el heparán sulfato y la gelatina se adquirieron a Sigma
 20 (Mississauga, ON, CA). El Fibrinógeno (plasminógeno, fibronectina, sin FXIII) y la
 trombomodulina recombinante humana procedían de American Diagnostica Inc. (Stamford, CT,
 EE.UU.). El S-2238 y el S-2222 procedían de Diapharma (West Chester, OH, EE.UU.). El ATH
 se produjo en la forma descrita anteriormente. El resto de reactivos consistía en reactivos
 comerciales.

25 Se cultivaron las células HUVEC sobre plástico tratado con un cultivo tisular (Primaria,
 BD, Mississauga, ON, CA) revestido con un 2% de gelatina. Para los experimentos, las células
 se sembraron en 96 placas pocillo a razón de 20000-40000 células/mL y se cultivaron hasta la
 confluencia en un medio de EBM-2 suplementado con el EGM-2MV Bullet kit, en una atmósfera
 de aire humidificado – 5% CO₂. Las células se utilizaron entre los pases 2 y 5.

30 Se midieron los valores de la constante de segundo orden (k_2) para la inhibición del
 conjugado ATH y la inhibición de AT + H no covalente de IIa y Xa a 37°C mediante un ensayo
 discontinuo bajo unas condiciones de pseudo-primer orden (relación inhibidor:enzima = 10:1).
 El IIa, Xa, AT, UFH y ATH se diluyeron en un Medio Mínimo Esencial (MEM) que contenía

10mM de HEPES a pH 7,4 y 0,1% (p/v) de PEG3000 (MEMPH). El Ila o Xa se incubaron con AT+H o ATH en pocillos de una placa de 96 pocillos que contenía placas únicas confluentes de HUVEC. Las capas únicas se lavaron con MEMPH antes de añadirles los componentes de la reacción. Las proporciones molares de H:AT en las mezclas no covalentes de AT+H fueron de

5 23:1 y 10:1 para las reacciones con Ila y Xa respectivamente. Se observó previamente que estas proporciones H:AT producían unos valores máximos de k_2 para inhibición en ausencia de HUVEC. Tras la incubación a lo largo de diversos intervalos de tiempo, las reacciones se detuvieron al añadir 1,25 mg/mL de polibreno en una solución reguladora de TSP (20mM de Tris-Cl, 150mM de NaCl, 0,6% (p/v) de PEG8000 pH 7.4) que contenía 0,4 mg/mL del sustrato

10 cromogénico adecuado (S-2238 para Ila o S-2222 para Xa). Las actividades residuales de la enzima en cada pocillo se midieron como el cambio en A_{405} a lo largo del tiempo, utilizando un espectrómetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Los valores de k_2 se calcularon tomando el valor negativo de la pendiente de los trazados de la actividad enzimática residual frente al tiempo de inhibición con anterioridad a la adición del

15 polibreno/sustrato y dividiendo este valor negativo de la pendiente por la concentración de inhibidor (es decir, ATH o AT). También se realizaron idénticos ensayos en una superficie plástica (no HUVEC) para comparación, utilizando placas no tratadas de 96 pocillos Falcon Pro-Bind de fondo plano (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).

En experimentos separados, los pocillos que contenían monocapas HUVEC se lavaron

20 con MEMPH, y se añadieron 20 μ L de 2nM Ila (disuelto en MEMPH) a múltiples pocillos. Tras 3 min de incubación a 37°C, se añadieron simultáneamente a todos los pocillos 80 μ L of MEMPH que contenía 1 mg/mL de fibrinógeno humano y diversas concentraciones de AT+H o ATH (0-1,25nM ATH o AT con una proporción H:AT de 23:1). La formación de coágulos de fibrina a 37°C se controló por turbidimetría, midiendo el valor de OD_{350} mediante un espectrómetro

25 SpectraMax Plus 384. El tiempo de retardo en la formación de coágulos se definió como el tiempo que tardaba el OD_{350} en alcanzar un valor de 0,005. Si el OD_{350} no alcanzaba dicho valor de 0,005 al cabo de 90 min, se asignaba un tiempo de retardo de 90 min. También se realizaron ensayos sobre plástico (no HUVEC) para comparación. En algunos ensayos realizados en plástico, se mezclaron 2nM de Ila con 10nM de trombomodulina (TM) o 5 μ M de

30 heparán sulfato (HS) con anterioridad a la etapa de incubación de 3 min.

Los resultados se expresan como la media de $\pm$ SEM. El análisis de la importancia estadística utilizando el *t*-test de Student, donde $p < 0,05$ se consideró significativo. El *t*-test de Student se llevó a cabo utilizando Minitab 13 para Windows.

Para evaluar el efecto del endotelio en la inhibición de IIa and Xa catalizada por heparina por parte de AT+H o ATH no covalentes, se determinaron los valores de k_2 para las tasas de inhibición de estas proteasas en ausencia o presencia de una monocapa de HUVEC. Las FIGs. 1A y 1B muestran la tasa de inhibición de los factores de coagulación por AT+H y ATH en presencia de endotelio. Los valores de K_2 se determinaron para la inhibición de IIa (A) y Xa (B) por ATH y AT+H en pocillos con superficie plástica, o en pocillos cubiertos por una capa única de HUVEC. Los valores K_2 se midieron en condiciones de pseudo primer orden, utilizando un método discontinuo. Las proporciones molares de H:AT en la mezcla AT+H fueron de 23:1 (A) y 10:1 (B), que se ha demostrado previamente que ofrece las máximas valores de k_2 para la inhibición de IIa y Xa respectivamente. Los datos representan la media de $\pm$ SEM ($n \geq 5$). En ausencia de HUVEC, los valores de k_2 para la inhibición de IIa y Xa por el ATH eran más elevados que los valores de k_2 correspondientes a la inhibición por AT+H no covalente (FIGs. 1A y 1B). El grado de incremento era mayor en el caso del IIa, situándose en un factor de 2,3. Cuando se hallaba presente endotelio, la inhibición de IIa y Xa por ATH era nuevamente más rápida que con AT+H (FIGs. 1A y 1B). En comparación con el plástico, los valores absolutos de k_2 para ATH y AT+H en células endoteliales disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) en el caso de IIa (FIG. 1A), y se redujeron ligera, pero no significativamente para Xa ($p > 0,1$) (FIG. 1B).

La inhibición de IIa se investigó adicionalmente mediante un ensayo de formación de fibrina, en el cual se incubó IIa en pocillos con o sin una monocapa de HUVEC, seguido de la adición de fibrinógeno y anticoagulantes a los pocillos. La figura 2 muestra la inhibición de la formación de fibrina inducida por IIa por parte de AT+H y ATH en presencia de endotelio. El IIa se incubó en pocillos de plástico o recubiertos de HUVEC, antes de añadir una mezcla de fibrinógeno purificado, CaCl_2 y AT+H o ATH. La concentración final de IIa era de 0,4nM. Las concentraciones finales de inhibidor (AT o ATH) se indican en el eje de abscisas, y la proporción molar de H:AT en la mezcla de AT+H era de 23:1. La formación de Fibrina se controló por turbidimetría, y el tiempo de retardo representa el tiempo necesario para alcanzar un valor $\text{OD}_{350} = 0,005$. Los datos representan la media $\pm$ SEM ($n \geq 5$). La figura 2 muestra que, al contrario que en los experimentos de tasa, la presencia de endotelio no ejercía efectos sobre la inhibición de IIa mediante la actividad de clivaje del fibrinógeno por el ATH o el AT+H. Al igual que en el caso de los experimentos de tasa. El ATH se mostró más efectivo que el AT+H a la hora de impedir la formación de fibrina por parte de IIa.

Las dos moléculas que constituyen los principales puntos de enlace del factor IIa en la superficie endotelial son HS y TM. Para determinar si el enlace del IIa a cualquiera de estas moléculas ha afectado a la actividad anticoagulante, se preincubaron HS o TM solubles con IIa y se evaluó la formación de fibrina en presencia o ausencia de ATH o AT+H. HS no afectó a la formación de fibrina inducida por IIa (tiempo de inicio = $97,3 \pm 6,6$ s frente a $95,4 \pm 6,4$ s en presencia y ausencia de HS respectivamente, $n=9$). La presencia de TM retardó significativamente la formación de fibrina con un tiempo de inicio de $122,4 \pm 1,7$ s, comparado con $97,9 \pm 6,4$ s en ausencia de TM ($p=0,003$, $n \geq 8$). Las figuras 3A y 3B muestran la inhibición de la formación de fibrina inducida por IIa adherido en HS o TM. El IIa se mezcló con un exceso de HS (A) o TM (B) antes de llevar a cabo los ensayos de formación de fibrina en pocillos de plástico, como se describe en la figura 2. Las concentraciones finales de IIa, HS and TM fueron de 0,4nM, 1µM y 4nM respectivamente. Las concentraciones finales del inhibidor (AT o ATH) se indican en el eje X y la proporción molar de H:AT en la mezcla AT+H fue de 23:1. Los datos representan la media $\pm$ SEM ($n \geq 4$). El ATH mantuvo su superior función anticoagulante en comparación con AT+H en presencia de HS (FIG. 3A) y TM (FIG. 3B).

Ejemplo 4

Lavado y sellado de catéteres utilizando una solución de ATH. Se preparó una solución de ATH en NaCl 0,15 M, con o sin una solución tampón (como HEPES 0,05 M) fijando el pH en 7,4. La concentración de ATH en esta solución está en torno a 1,5 U/mL en términos de la actividad del anti-factor Xa, pero en algunos casos puede oscilar entre 0,01 U/mL y 100 U/mL de actividad del anti-factor Xa. La solución de ATH se esteriliza por filtrado a través de un filtro estéril con poros de 0,2 micrómetros en el interior de una campana de flujo laminar con flujo de aire estéril. Cuando todavía se encuentra en el interior del entorno estéril, la solución estéril filtrada de ATH se sella en el interior de botellas estériles que contienen un tabique para su posterior retirada mediante jeringas estériles inmediatamente antes de su utilización, o se toman cantidades medidas en jeringas esterilizada que a continuación se taponan.

Tras la inserción de un catéter en una vena o arteria del paciente, se conecta una jeringa que contenga alrededor de 2 mL (en algunos casos, entre 0,1 mL y 50 mL de volumen total) de la solución esterilizada de ATH, como se ha descrito anteriormente, al extremo exterior del catéter, y toda la solución de ATH de la jeringa se inyecta en el catéter, seguido del precintado del catéter con un tapón estéril.

Después de transcurrido un período variable entre 1 hora y 7 días, puede retirarse el tapón y sustituirse por una jeringa, de tal forma que pueda extraerse una muestra de sangre o pueda inyectarse medicación. Tras la extracción de la sangre o la inyección de la medicación, la jeringa utilizada para extraer muestras de sangre o administrar la medicación se sustituye por otra jeringa que contenga una solución de ATH similar a la anterior, inyectándose la solución de ATH y tapando el catéter como en el caso anterior. Este proceso se repite siempre que sea necesario, hasta la retirada del catéter.

Ejemplo 5

Tratamiento de la conjuntivitis leñosa. Se prepara una solución de ATH en NaCl 0,15 M, con o sin regulador (como HEPES 0,05 M) con un pH de 7,4. La concentración de ATH en esta solución estaría normalmente en torno a 1 miligramo/mL (en términos del contenido de AT) pero podría oscilar entre 0,001 miligramos/mL y 11 miligramos/mL. La solución de ATH se esteriliza por filtrado a través de un filtro estéril con poros de 0,2 micrómetros dentro de una campana de flujo laminar con caudal de aire estéril.

Un paciente que requiera tratamiento para impedir la aparición de conjuntivitis leñosa en las superficies de los tejidos que se encuentran fuera del sistema vascular recibe regularmente partes alícuotas de una solución que contenga ATH. En el caso de la conjuntivitis leñosa del ojo, se aplican una o más veces al día 1 o más gotas (volumen aproximado de la gota situado entre 10 microlitros y 100 microlitros) de la solución de ATH descrita anteriormente, en función de la gravedad de la enfermedad del paciente específico. Este proceso se repite continuamente durante toda la vida del paciente.

Ejemplo 6

Los datos preliminares más recientes sugieren que el ATH ejerce un interesante efecto diferencial sobre el crecimiento epitelial frente al del fibroblasto *in vitro* que es opuesto al impacto ejercido por la AT (véase a continuación la Tabla 2). Las extensas investigaciones realizadas sobre el ATH inmovilizado en catéteres de poliuretano e injertos endoluminales han demostrado que el conjugado ATH presentaba una significativamente mayor actividad inhibitoria frente a la trombina *in vitro* y una actividad anticoagulante *in vivo*. Estos resultados

sugieren que el ATH adherido a las matrices alveolares puede ayudar a controlar la generación de un exceso de trombina y la acumulación de fibroblastos en relación con otras células.

Tabla 2. Efecto de la AT y del ATH sobre el crecimiento de las células del pulmón en un medio MEM

Tratamiento	Porcentaje de cambio en el número de células con respecto a la solución de Control	
	Células epiteliales del pulmón	Fibroblasto células pulmón
500 nM AT	-19,3 ± 3,3	-0,141 ± 1,76
500 nM ATH	29,1 ± 13,6**	13,9 ± 4,16***

Se prepararon cultivos de células pulmonares primarias de ratas recién nacidas en 24 pocillos de una placa de pocillos durante 1 día en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂/95% de aire a 37° C en un medio MEM suplementado con antitrombina (AT) o AT-heparina (ATH) covalente. A continuación se liberaron las células de la monocapa utilizando tripsina, y se determinó el número total de células utilizando un hemocitómetro. Los resultados se expresan como el valor medio ± SEM (n=5) del porcentaje de cambio en el número de células con respecto a cultivos de control en un medio MEM no suplementado. Se indican unas importantes diferencias en los resultados con ATH frente a los obtenidos con AT en el mismo grupo de células (*, ** y *** media $P = 0,002$, $P = 0,026$ y $P = 0,027$, respectivamente). Aunque la AT por sí sola inhibió significativamente la proliferación de células epiteliales, pero no de fibroblastos, el ATH mejoró preferencialmente el crecimiento epitelial frente a los fibroblastos.

Ejemplo 7

Investigación del tratamiento con ATH de pulmones que sufrían estrés/lesiones agudas. Se realizaron experimentos preliminares utilizando ATH por vía intratraqueal en animales recién nacidos que de forma aleatoria respiraban normalmente o se sometieron a un elevado volumen (1 h) de ventilación mecánica. La figura 4 muestra los tiempos de coagulación de muestras de plasma recalcificadas procedentes de sangre citrada procedente de ratas de 2 a 6 días de edad tratadas por vía intrapulmonar con ATH o una solución reguladora de PBS, con o sin un elevado

volumen de ventilación mecánica durante 1 hora. Los ensayos de coagulación demostraron fehacientemente que con respecto a las soluciones de control instiladas con un regulador, el ATH eliminó el reducido tiempo de coagulación del plasma derivado de la actividad sistémica del factor tisular (FT) asociada a la ventilación (véase la figura 4). Dada la evidente generación de trombina pulmonar y la formación de fibrina relacionada con el FT, la neutralización directa del complejo clave VIIa-FT por el conjugado ATH bloquearía la activación de la coagulación en el pulmón, donde los inhibidores del plasma serán escasos.

Ejemplo 8

Se llevaron a cabo experimentos para determinar el efecto del ATH en la producción de tensioactivos en las células pulmonares para medir el potencial de instilación de ATH en el pulmón (para prevenir el SDR o daños pulmonares provocados por la ventilación mecánica) a fin de aumentar los niveles de tensioactivos e impedir el colapso del espacio aéreo y mejorar la transferencia de gases. Se recopilaron los siguientes datos preliminares (véase la figura 5). Se aisló epitelio pulmonar distal fetal (FDLE) de ratas fetales de 20 días y se cultivó en 24 pocillos de una placa de pocillos de cultivo. El medio de cultivo se suplementó con 100 µg/mL de ATH o con una solución tampón de control. La figura 5 muestra inmunotransferencias de medios celulares producidos por células epiteliales pulmonares distales fetales de ratas (FDLE) incubadas con una solución tampón o con ATH (100 µg/mL medio de cultivo), en las que se detectó la proteína tensioactiva C. Las inmunotransferencias de medios celulares mostraron un incremento en la proteína tensioactiva C producida por células FDLE incubadas con ATH (100 µg/mL de medio de cultivo).

Ejemplo 9

ATH:Fibrina Anticoagulante para el tratamiento de un coágulo. A continuación se indica la metodología propuesta para la preparación de ATH enlazado a un monómero de fibrina que puede inyectarse para tratar un coágulo en un paciente, y hacer que la superficie del coágulo adquiera propiedades anticoagulantes netas. La utilización de ATH:Fibrina puede suponer un agente neutralizador de la coagulación muy eficaz, que puede utilizarse a bajas concentraciones en comparación con la inyección de ATH solamente, ya que el complejo ATH:Fibrina tenderá a unirse a otras fibrinas presentes en una concentración importante, como

en el caso de un coágulo que contenga fibrina polimerizada. A diferencia del ATH ya adherido a la fibrina, el ATH libre acabaría llegando a otros objetivos, además del coágulo de fibrina y por lo tanto, podría necesitar ser administrado a unas concentraciones mucho más elevadas. A continuación se indica un método para la preparación de ATH adherido al monómero de Fibrina y su administración a un paciente que tenga un coágulo.

Se prepara una solución madre de monómero de fibrina en ácido acético, como sigue. Se utiliza fibrinógeno disponible comercialmente (Enzima Research Laboratories, South Bend, IN, EE.UU.). En los experimentos anteriores, se siguió el siguiente protocolo para preparar soluciones de fibrina soluble. Inicialmente se eliminó cualquier resto de fibronectina contaminante del fibrinógeno comercial mediante 2 incubaciones de 15 mL de 130 μ M de fibrinógeno (masa molecular molecular 340000 Da) con 5 mL agarosa de gelatina (Sigma, Mississauga, Ontario, Canadá) durante 30 min, seguido de centrifugado y recogida del sobrenadante que contiene el fibrinógeno. La concentración del Fibrinógeno se determinó mediante absorbencia a 280 nm utilizando una absorbencia de 10 mg/mL = 15,1 (tras la corrección por dispersión de luz a 320 nm utilizando la ecuación corregida $A_{280} = A_{280} - 1,7 \times A_{320}$). El monómero de fibrina soluble se preparó mediante el método siguiente. El fibrinógeno purificado (60 – 100 μ M) se incubó con 2 nM de trombina (Enzima Research Laboratories, South Bend, IN, EE.UU.) a 37° C durante 4 – 6 horas, seguido de un centrifugado a 2000 g durante 5 min. El pellet del polímero de fibrina se situó en una bolsa de diálisis (12000 – 14000 peso molecular cortado), se dializó frente a H₂O (4 °C) para eliminar los fibrinopéptidos A y B y se volvió a dializar frente a ácido acético 0,02 M hasta que se disolvió la fibrina (~ 8 horas). La concentración de la fibrina soluble en la solución se obtuvo mediante absorbencia a 280 nm y utilizando un peso molecular de 340000 y absorbencia de 10 mg/mL = 14,0. Típicamente se obtuvieron 100 μ M de fibrina soluble y se almacenaron a – 80° C.

Para la preparación de soluciones de fibrina para su enlace con ATH, se neutralizaron 6 volúmenes de la fibrina soluble en 0,02 M de ácido acético con 4 volúmenes de Tris-HCl 1 M con pH 7,5 que contenían 10 mM de GPRP-NH₂ (Sigma, Mississauga, Ontario, Canadá) para bloquear la polimerización de la fibrina en condiciones neutrales. El monómero resultante de fibrina soluble neutralizada de 40000 nM podía diluirse aun más o mantenerse a esa concentración antes de combinarlo con el ATH. Aunque pueden prepararse soluciones con diversas proporciones molares de fibrina:ATH, puede añadirse ATH a la fibrina (a un pH situado en torno a 7,5 en presencia de GPRP-NH₂) a unas concentraciones molares aproximadamente iguales hasta un ligero exceso molar (en torno a un 10%) comparado con la

fibrina. En un experimento típico, se mezcló rápidamente 1 volumen de 40000 nM de ATH en Tris-HCl 0,02 M NaCl 0,15 M y glicol de polietileno 8000 al 0,6% con un pH de 7,4 (TSP) que contenía GPRP-NH₂ 0,01 M con un volumen equivalente de la solución de fibrina neutralizada de 40000 nM. La mezcla resultante, designada como solución 1 de ATH:Fibrina contiene 20000 nM de ATH + 20000 nM de monómero de fibrina soluble.

Las soluciones de ATH + fibrina pueden inyectarse por vía intravenosa en pacientes con coágulos, para neutralizar la actividad procoagulante del coágulo, de forma que el propio sistema fibrinolítico nativo del organismo pueda digerir satisfactoriamente el coágulo para eliminarlo. La dosis de producto ATH:Fibrina a suministrar al paciente puede variar ampliamente en función del grado de trombosis o de actividad coagulatoria o tamaño del coágulo del paciente. Utilizando la solución de ATH:Fibrina descrita anteriormente, puede administrarse cualquier cantidad entre 0,01 mL/kg de peso corporal y 10 mL/kg de peso corporal mediante inyección intravenosa, siendo lo más corriente 0,5 mL/kg de peso corporal.

Otras opciones de preparación de soluciones de ATH + monómero de fibrina incluyen la rápida disolución de 100 µM de fibrina en ácido acético 0,02 M con Tris-HCl 0,02 M NaCl 0,15 M y 0,6% de glicol de polietileno 8000 a un pH de 7,4 (TSP) hasta una concentración de < 100 nM, donde la fibrina no se polimerizará con demasiada rapidez. Un volumen equivalente de ATH a la misma concentración se mezclará entonces rápidamente en la solución de fibrina diluida y la mezcla resultante se inyectará a unas dosis variables entre 0,1 mL/kg de peso corporal hasta 10 mL/kg de peso corporal, siendo lo más común 2 mL/kg de peso corporal.

Ha de entenderse que las configuraciones anteriores pretenden ilustrar la aplicación de los principios de la presente invención. De este modo, aunque la presente invención se ha descrito más arriba en relación con los ejemplos de realización, será evidente para cualquier experto en la materia que pueden efectuarse numerosas modificaciones y configuraciones alternativas sin alejarse de los principios y conceptos de la invención, tal y como se establecen en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método de revestimiento de una superficie polimérica con un conjugado de antitrombina-heparina, que comprende la puesta en contacto de la superficie polimérica con una
5 solución de conjugado de antitrombina-heparina de forma que el conjugado de antitrombina-heparina recubra directamente la superficie polimérica sin grupos ligantes entre el conjugado de antitrombina-heparina y la superficie polimérica.

2. El método según la reivindicación 1, donde la superficie polimérica se selecciona
10 entre los integrantes del grupo formado por una superficie de poliuretano, una superficie de polietileno, una superficie de polipropileno, una superficie de politetrafluoruro, una superficie de polidimetilsiloxano, una superficie de copolímero de etileno-ácido acrílico, una superficie de Dacron, una superficie de poliéster-poliuretano, una superficie de poliuretano-policarbonato, una superficie de cloruro de polivinilo, una superficie de silicona, una superficie de
15 polidimetilsiloxano, una superficie de acero inoxidable, una superficie de titanio, una superficie de goma látex, una superficie de nitinol, una superficie de Nylon, una superficie de Tereftalato de polietileno, una superficie de poliestireno, y combinaciones de dichos productos.

3. El método según la reivindicación 1, donde la superficie polimérica es una superficie
20 de poliuretano.

4. El método según la reivindicación 1, donde la superficie polimérica es una superficie de un producto sanitario seleccionado entre los integrantes del grupo formado por un catéter intravenoso, un catéter intra-arterial, un catéter central insertado periféricamente, un catéter
25 central, un catéter de Swan-Ganz, un stent coronario, un shunt arteriovenoso, una válvula mecánica, un órgano artificial, un catéter de diálisis, una línea de circuito sanguíneo de diálisis, una membrana de diálisis, una línea extracorpórea de oxigenación de la membrana, una membrana de oxigenación de la membrana extracorpórea, y un contenedor de almacenamiento de sangre.

5. El método según la reivindicación 1, donde la superficie polimérica es una superficie interior de un lumen de un catéter, y donde la puesta en contacto de la superficie polimérica con

la solución de conjugado de antitrombina-heparina comprende la inserción de la solución en el lumen del catéter y la incubación del catéter con la solución durante un período de tiempo.

5 6. El método según la reivindicación 5, donde el período de tiempo varía entre 5 minutos y 48 horas.

10 7. El método según la reivindicación 5, que comprende adicionalmente el vaciado de la solución tras la incubación y la evaporación del disolvente de la solución residual contenida en el lumen.

15 8. El método según la reivindicación 1, donde la superficie polimérica es una superficie exterior de un catéter, y donde la puesta en contacto de la superficie polimérica con la solución de conjugado de antitrombina-heparina comprende la inmersión del catéter en la solución y la incubación del catéter con la solución durante un período de tiempo.

9. El método según la reivindicación 8, donde el período de tiempo oscila entre 5 minutos y 48 horas.

20 10. El método según la reivindicación 8, que comprende adicionalmente el vaciado de la solución tras la incubación y la evaporación del disolvente de la solución residual contenida en el catéter.

25 11. Un producto sanitario de reducida trombogenicidad, comprendiendo dicho producto sanitario una superficie polimérica revestida con un conjugado de antitrombina-heparina sin grupos ligantes entre el conjugado de antitrombina-heparina y la superficie polimérica.

12. El producto sanitario según la reivindicación 11, donde la superficie polimérica es una superficie de poliuretano.

30 13. El producto sanitario según la reivindicación 11, donde el producto sanitario se selecciona entre los integrantes del grupo formado por un catéter intravenoso, un catéter intra-arterial, un catéter central insertado periféricamente, un catéter central, un catéter de Swan-Ganz, un stent coronario, un shunt arteriovenoso, una válvula mecánica, un órgano artificial, un

catéter de diálisis, una línea de circuito sanguíneo de diálisis, una membrana de diálisis, una línea extracorpórea de oxigenación de la membrana, una membrana de oxigenación de la membrana extracorpórea, una prótesis *in vivo* y un contenedor de almacenamiento de sangre.

5 14. Un método de revestimiento por liofilización de una superficie polimérica de un producto sanitario, que comprende:

La puesta en contacto de la superficie polimérica del producto sanitario con una solución de antitrombina-heparina que comprenda un conjugado de antitrombina-heparina y un disolvente en ausencia de grupos ligantes;

10 Permitir que se vacíe el exceso de solución de antitrombina-heparina de la superficie polimérica; y

Evaporar el disolvente de la superficie polimérica al menos bajo vacío parcial.

15 15. Un método de tratamiento de una afección médica mediante la inhibición de la trombogénesis en un mamífero, comprendiendo dicho método: la administración de una dosis de un conjugado de antitrombina-heparina al mamífero, donde al menos un 98% de las cadenas de heparina del conjugado de antitrombina-heparina tienen un peso molecular de más de 3.000 daltons.

20 16. El método según la reivindicación 15, donde la afección médica es el síndrome de dificultad respiratoria y donde la administración de la dosis del conjugado de antitrombina-heparina comprende la administración del conjugado de antitrombina-heparina en un pulmón del mamífero.

25 17. Un método para el tratamiento de la conjuntivitis leñosa en un mamífero, que comprende la administración de una dosis de un conjugado de antitrombina-heparina en un ojo del mamífero.

30 18. Un método para prevenir o tratar lesiones producidas por ventilación mecánica en mamíferos, que comprende la administración de una dosis de un conjugado de antitrombina-heparina en un pulmón del mamífero.

19. Un método para el tratamiento de la gingivitis leñosa en un mamífero, que comprende la administración de una dosis de un conjugado de antitrombina-heparina en las encías del mamífero.

5 20. Una solución de lavado y sellado de un catéter intravenoso o intra-arterial, que comprende un conjugado de antitrombina-heparina.

21. Un sistema de lavado y sellado, que comprende:

Un catéter intravenoso o intra-arterial;

10 Una solución de limpieza y sellado configurada para ser introducida a través del catéter, donde la solución de limpieza y sellado comprende un conjugado de antitrombina-heparina; y

Una jeringa configurada para inyectar la solución de limpieza y sellado en el catéter.

22. Un método para el mantenimiento de la permeabilidad de un catéter, que
15 comprende:

La inserción de un catéter en una vena o arteria de un paciente de forma que una abertura interior del catéter se abra en el interior de la vena o arteria y una abertura exterior del catéter se abra fuera del paciente;

20 La inyección de una solución que comprende un conjugado de antitrombina-heparina en el catéter a través de la abertura exterior del catéter;

El sellado de la abertura exterior del catéter de tal forma que al menos una porción de la solución que comprende el conjugado de antitrombina-heparina permanezca en el interior del catéter.

25 23. Una composición para el tratamiento de coágulos de sangre, que comprende antitrombina, heparina, y fibrina, donde al menos un 50 % en peso de la heparina se conjuga con la antitrombina para obtener un conjugado de antitrombina-heparina, y donde al menos una porción de la fibrina se adhiere al conjugado de antitrombina-heparina.

30 24. La composición según la reivindicación 23, donde al menos un 50 % en peso de la fibrina se adhiere al conjugado de antitrombina-heparina.

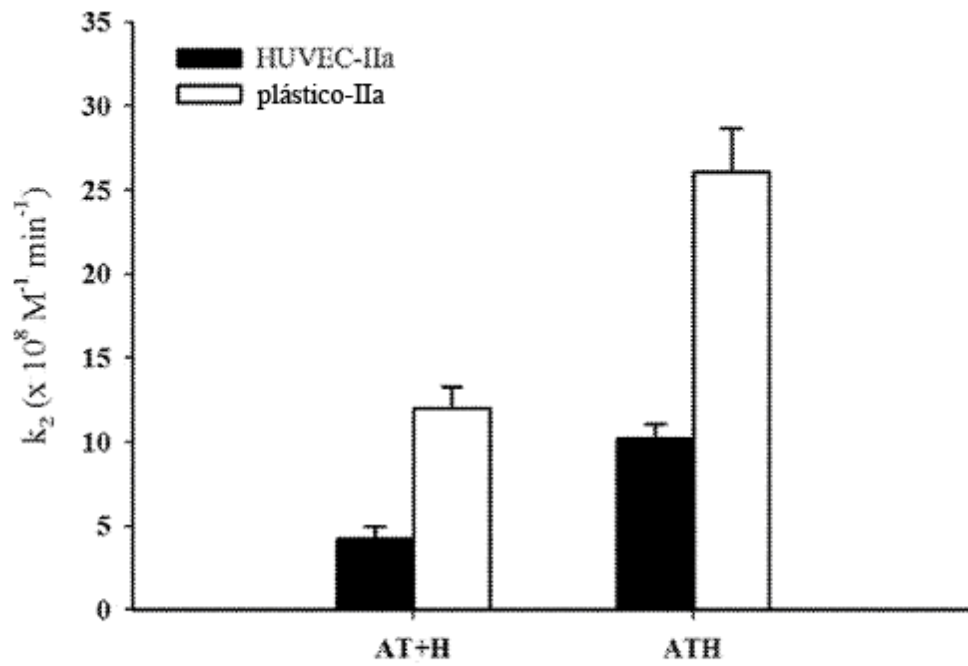


FIG. 1A

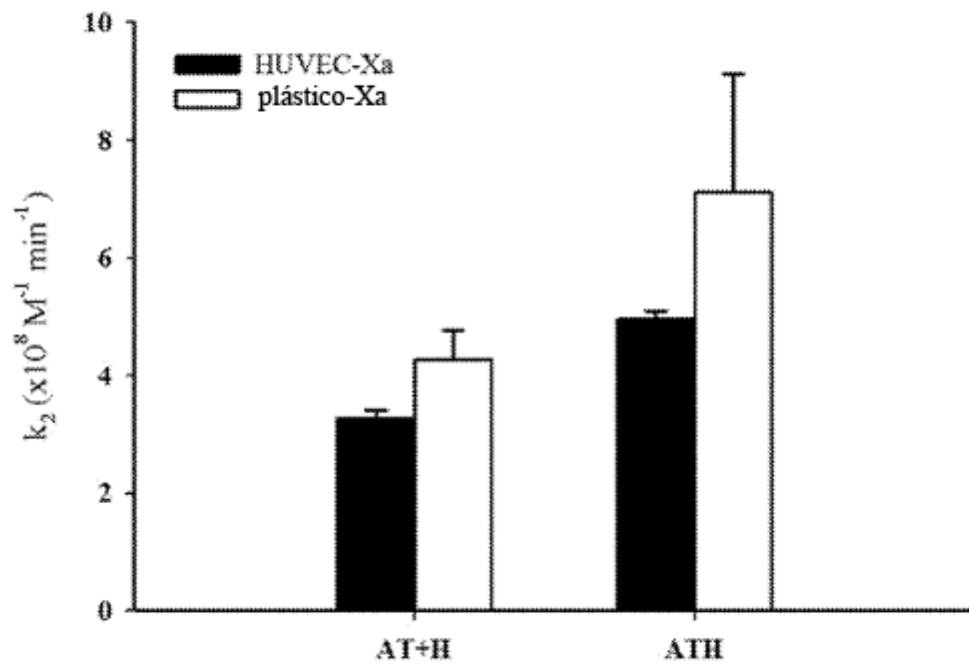


FIG. 1B

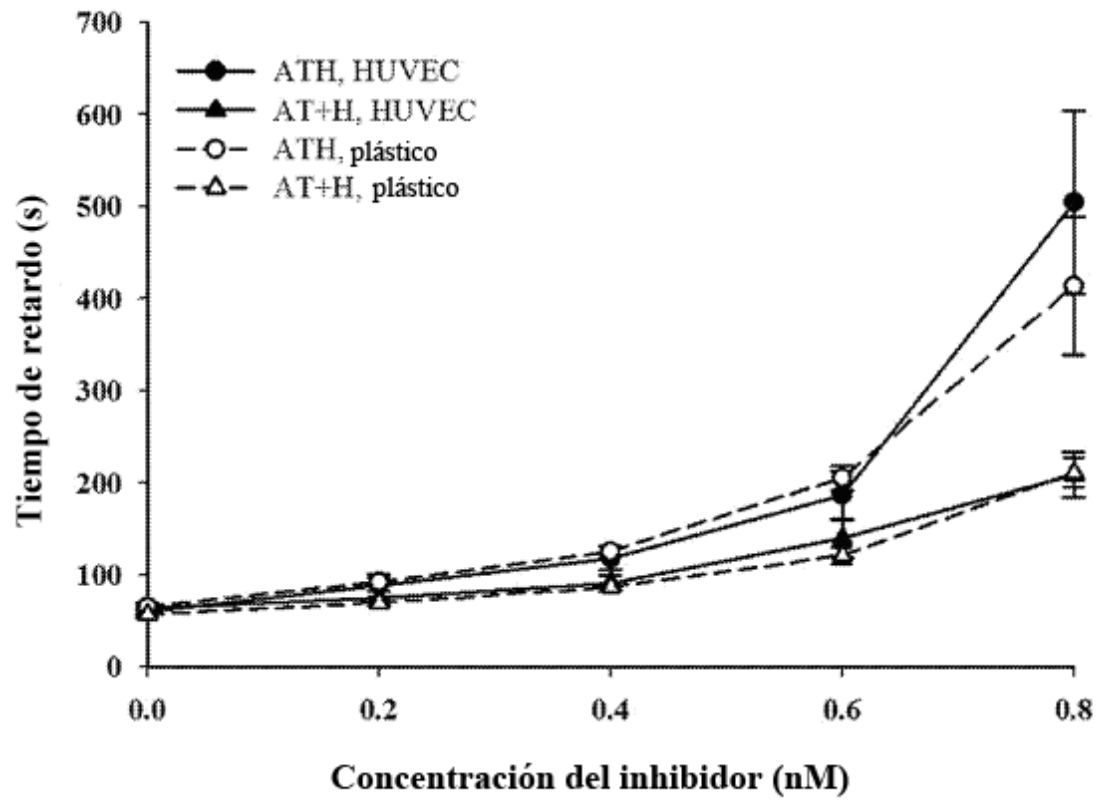


FIG. 2

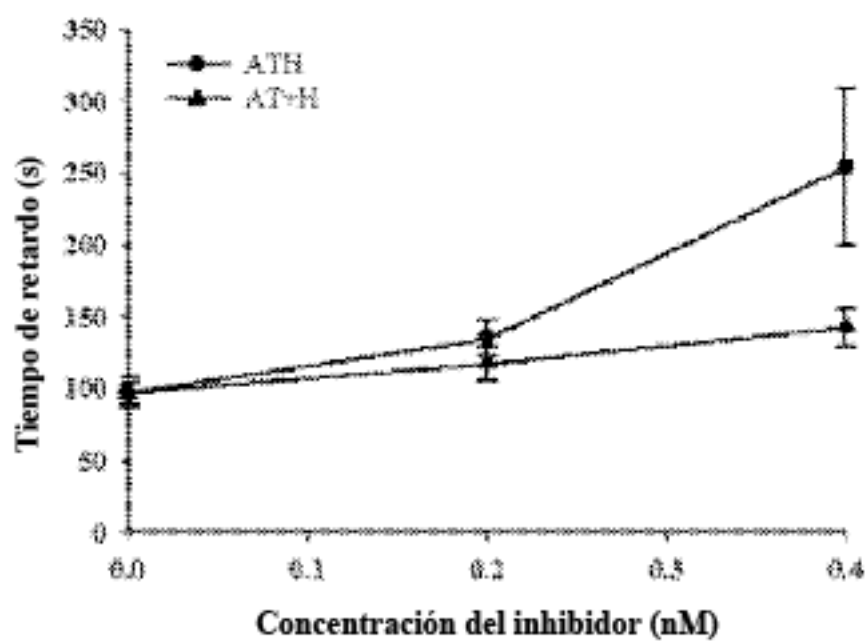


FIG. 3A

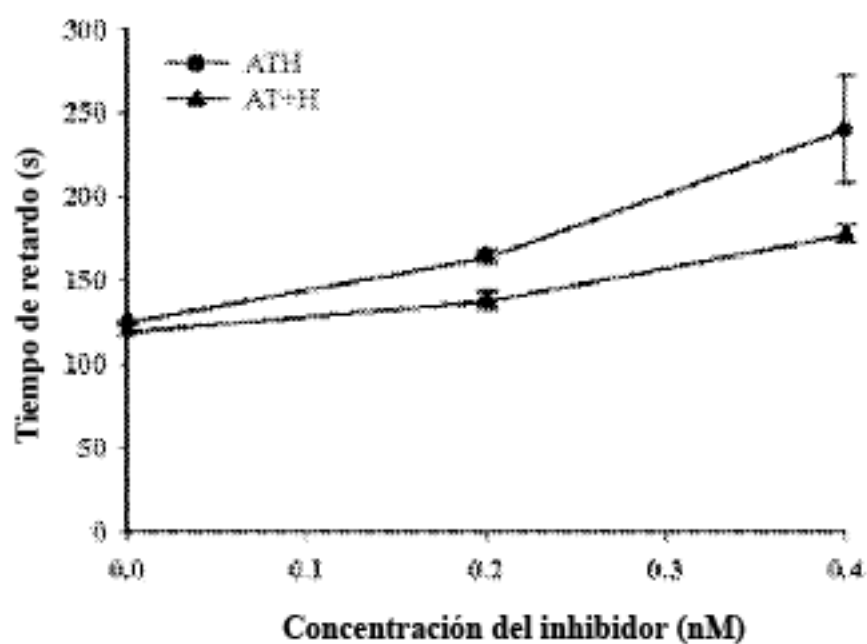


FIG. 3B

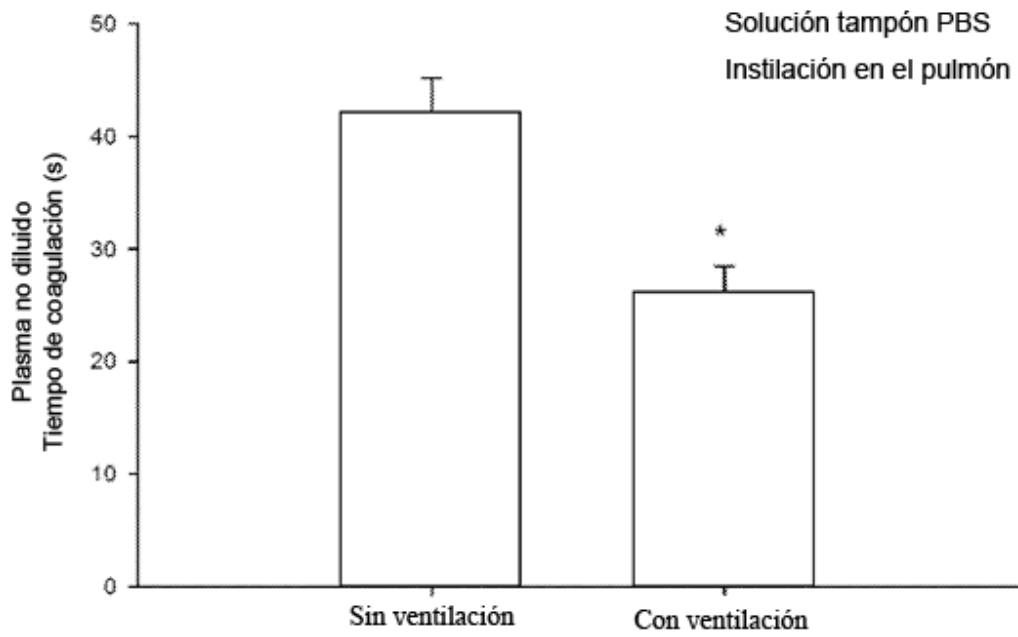


FIG. 4A

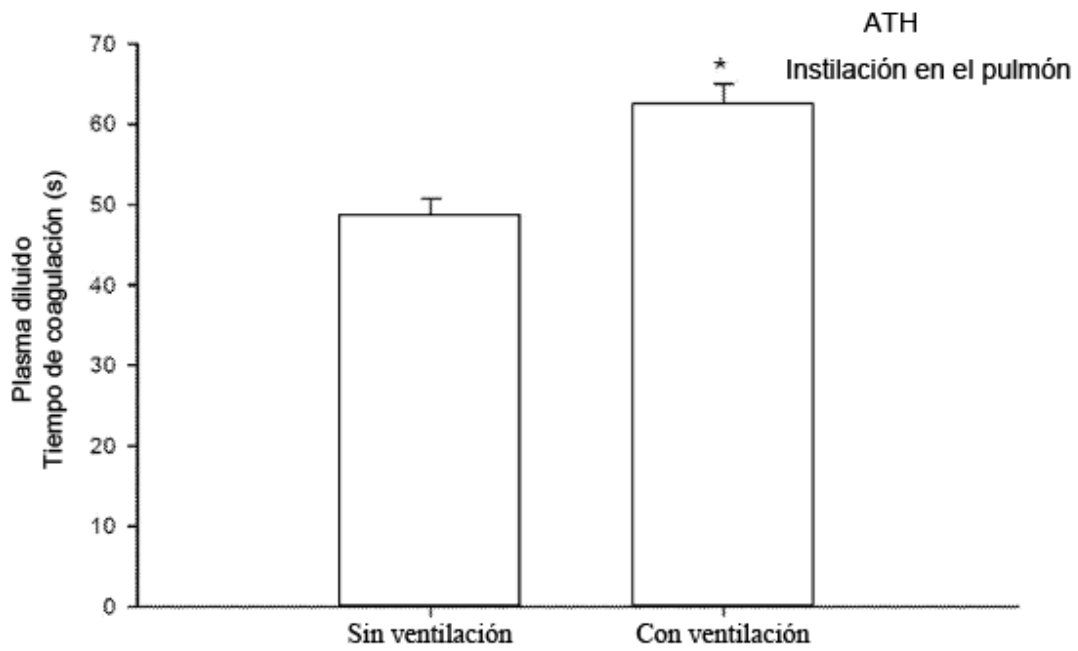


FIG. 4B

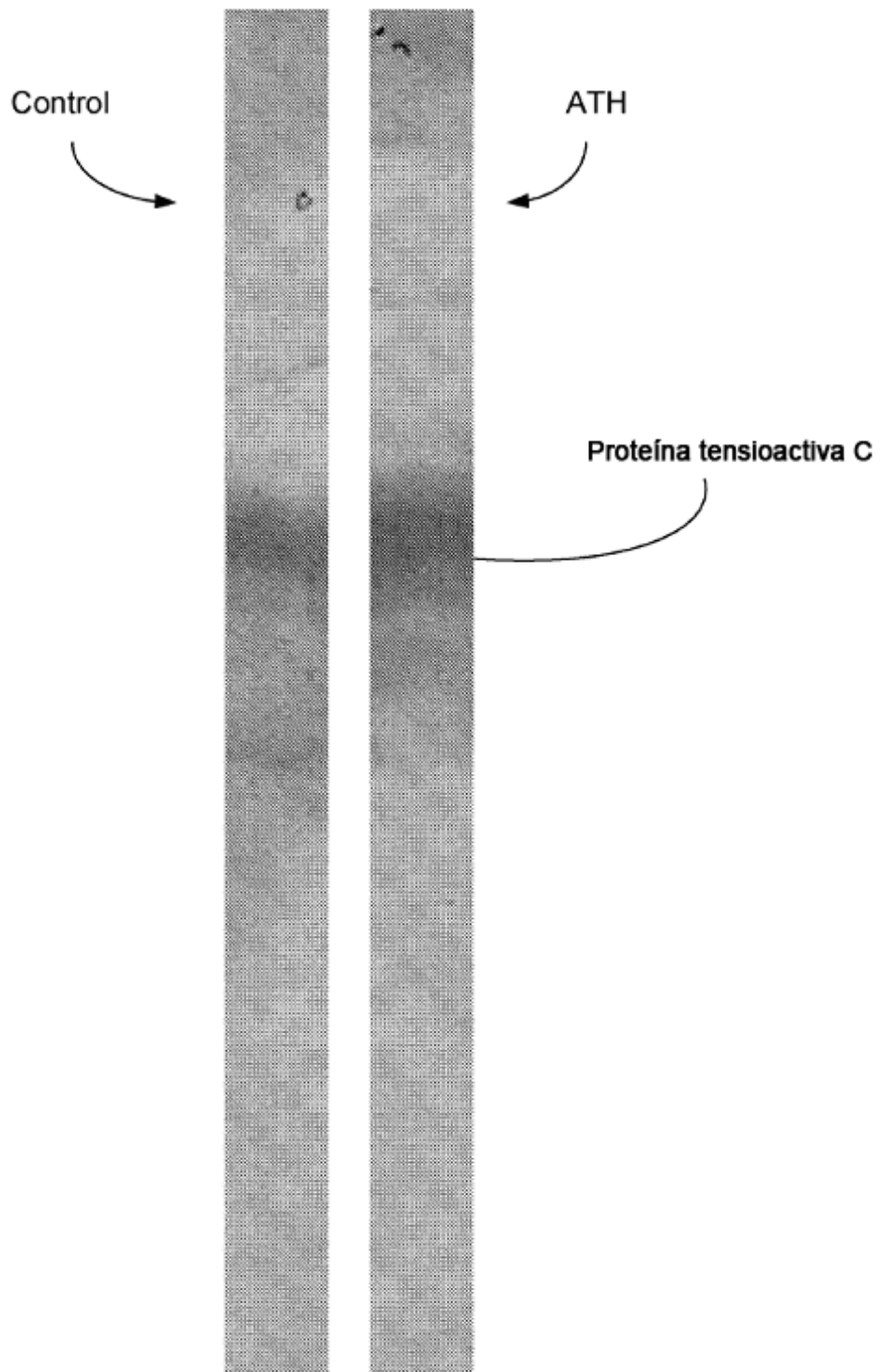


FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201790052

②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.06.2016

③② Fecha de prioridad: **11-06-2015**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2003124705 A1 (BERRY LESLIE ROY et al.) 03/07/2003, Párrafos 97, 175, 184.	1-4, 11-13, 15, 16, 18, 23, 24
Y		5-10, 14, 20-22
Y	US 2009281059 A1 (FALOTICO ROBERT et al.) 12/11/2009, Ejemplo 3, párrafo 63.	5-10, 14, 20-22
Y	De Cock R et al. TOPICAL HEPARIN IN THE TREATMENT OF LIGNEOUS CONJUNCTIVITIS. Ophthalmology United States. 31/10/1995, Vol. 102, Nº 11. Páginas 1654 - 1659, ISSN 0161-6420 (Print), <DOI: pubmed:9098258>	17
Y	FINE et al. SUCCESSFUL TREATMENT OF LIGNEOUS GINGIVITIS WITH WARFARIN. Oral Surg. Oral Med. Oral Radiol Endod. 01/01/2009. Vol. 107. Nº 1. Páginas 77-80	19
Y	EP 0353018 A1 (KITA KIYOSHI) 31/01/1990, columna 1, líneas 1-35	17, 19
A	US 6702850 B1 (BYUN YOUNGRO et al.) 09/03/2004, Columna 8, líneas 35-50.	1-24

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
31.05.2018

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L31/16 (2006.01)

A61L31/08 (2006.01)

C08B37/10 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61L, C08B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.05.2018

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 5-10, 14-17, 19, 20-22, 24	SI
	Reivindicaciones 1-4, 11-13, 18, 23	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-24	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2003124705 A1 (BERRY LESLIE ROY et al.)	03.07.2003
D02	US 2009281059 A1 (FALOTICO ROBERT et al.)	12.11.2009
D03	De Cock R et al.. TOPICAL HEPARIN IN THE TREATMENT OF LIGNEOUS CONJUNCTIVITIS.. Ophthalmology United States. Vol. 102, Nº 11, Páginas 1654 - 1659, ISSN 0161-6420 (Print), <DOI: pubmed:9098258>	31.10.1995
D04	FINE et al. SUCCESSFUL TREATMENT OF LIGNEOUS GINGIVITIS WITH WARFARIN. Oral Surg. Oral Med. Oral Radiol Endod., Vol. 107, Nº 1, Páginas 77-80	01.01.2009
D05	EP 0353018 A1 (KITA KIYOSHI)	31.01.1990
D06	US 6702850 B1 (BYUN YOUNGRO et al.)	09.03.2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

Las reivindicaciones 1-4, 11-13, 18, 23 carecen de novedad, según se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986, a la luz de lo divulgado en el documento D01.

D01 divulga un método de revestimiento de una superficie polimérica con un conjugado antitrombina-heparina. La asociación del conjugado con la superficie polimérica puede llevarse a cabo de manera no-covalente (párrafo 0069). Este documento muestra que la superficie polimérica puede estar formada por poliuretanos, para la formación de catéteres (párrafo 0097, figura 22, párrafo 0184). El documento menciona que los materiales susceptibles de ser tratados con este conjugado se pueden utilizar para la fabricación de prótesis, u otros productos médicos (párrafo 0058). Este documento también menciona un método para el tratamiento de una lesión producida por ventilación mecánica mediante la administración de un complejo antitrombina-heparina, así como enfermedades como el síndrome de distress respiratorio del neonato (párrafo 0175). Adicionalmente, este documento divulga un modelo para la inhibición de coágulos de fibrina mediante complejos antitrombina-heparina, donde se divulga las composiciones que se utilizan comprendiendo las mismas: antitrombina, heparina y fibrina (párrafo 0117, figura 42).

Las reivindicaciones 5-10, 14- 17, 19, 20-22, 24 carecerían de actividad inventiva, tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11-1986.

Tomando D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la invención, con respecto a las reivindicaciones 5-10, 14, 20-22, la diferencia entre estas reivindicaciones y lo divulgado en D01 es que la unión directa entre el conjugado y la superficie polimérica se lleva a cabo por incubación de una solución líquida de conjugado y la evaporación del disolvente de la solución residual. El efecto técnico de esta diferencia sería que el conjugado antitrombina-heparina se quedaría adherido a la superficie polimérica sin necesidad de agentes (linkers) que uniesen los complejos covalentemente a la superficie polimérica. Por tanto, el problema técnico que pretende resolver la invención sería la selección de un método concreto de inmovilización directa del conjugado. La solución sería la aplicación de una disolución y secado de la misma.

D02 divulga un material de recubrimiento de una superficie polimérica. En particular, esta invención se refiere a composiciones de revestimiento antitrombóticas y antirestenóticas que forman parte de un recubrimiento de múltiples capas, en el que la primera capa interna se forma a partir de un polímero y un agente biológicamente activo, y una segunda capa externa que comprende un conjugado de polímero bioabsorbible de heparina bioabsorbible. Este conjugado de heparina se puede aplicar sobre las capas internas disolviendo la heparina en un sistema de disolvente mixto que comprende acetato de etilo (EA) e isopropanol (IPA). Posteriormente, la solución se pulveriza sobre la superficie del dispositivo que ya se ha recubierto con la primera capa. Después de la aplicación se lleva a cabo un secado, y el conjugado de polímero bioabsorbible de heparina antitrombótica permanece en la capa externa del recubrimiento, permitiendo que el agente de la capa interna se eluya a través del mismo. Es decir, una vez que se prepara el conjugado polímero trombótico heparina-bioabsorbible que forma la segunda capa, se puede aplicar directamente sobre la primera capa usando el método de evaporación del disolvente. Después de que el disolvente se evapora de la superficie de un dispositivo médico implantable, se forma una película delgada que comprende un conjugado de polímero bioabsorbible de heparina anti-trombótico en la superficie más externa del dispositivo. La fig.3 ilustra un dispositivo médico recubierto, de acuerdo con la presente invención. Además se describe un procedimiento de obtención de un recubrimiento de un stent liberador de fármaco con una capa externa que comprende un conjugado de polímero absorbible de heparina: la superficie de un stent de cromo cobalto se recubre, por pulverización, con una solución polimérica que contiene un fármaco, que puede comprender, por ejemplo, acetato de etilo (EA) que contiene PLGA y rapamicina. Después de secar la capa que contiene el fármaco, se aplica por pulverización una solución de revestimiento que contiene un conjugado de polímero absorbible de heparina sobre la primera capa que contiene el fármaco. Después de secar la solución de recubrimiento, se producirá una película delgada con la heparina ubicada sustancialmente en la superficie más externa (ejemplo 3, párrafo 0063).

Así pues, para el experto en la materia sería obvia la utilización de la metodología de aplicación directa de un conjugado de heparina mediante la técnica de pulverización, evaporación y secado que divulga D02, para la aplicación directa de un conjugado de antitrombina-heparina en una superficie polimérica con el objetivo de obtener material médico revestido. Por tanto, las reivindicaciones 5-10, 14, 20-22 carecerían de actividad inventiva. Se considera que la elección del rango más óptimo de fibrina que se una al complejo antitrombina-heparina no aporta ningún efecto técnico sorprendente, por lo que la reivindicación 24 carecería de actividad inventiva.

El objeto de la invención que aparece en la reivindicaciones 15, 16, se diferencia de lo divulgado en D01 (párrafo 0175) en que el peso molecular de al menos un 98% de las cadenas de heparina del conjugado es mayor de 3000 Dalton. Sin embargo, esta diferencia no parece que sea la responsable de la utilización del conjugado para el tratamiento de afecciones médicas como las mencionadas en estas reivindicaciones, por lo que se considera que las mismas carecen de actividad inventiva.

En relación a la reivindicación 17, el documento más cercano del estado de la técnica sería D03, el cual divulga un método de tratamiento de la conjuntivitis leñosa administrando localmente heparina. La diferencia con el objeto de la reivindicación 17 sería la antitrombina. El efecto técnico de esa diferencia sería mejorar la eficacia anticoaguladora del tratamiento. D05 menciona que la heparina favorece la acción de la antitrombina III para la anticoagulación inmediata en casos de intervenciones intraoculares. Así pues, para el experto en la materia sería obvia la incorporación de la antitrombina III a la heparina para beneficiarse del doble efecto anticoagulante de ambos compuestos. Por tanto, el objeto de la reivindicación 17 no sería inventiva según lo mencionado en la ley a la luz de la combinación de los documentos D03 y D04.

La reivindicación 19 tampoco cumpliría con el requisito de actividad inventiva, a la luz de D04. En este documento se menciona la utilización de la heparina en el tratamiento de la gingivitis leñosa. La diferencia entre ambos sería la incorporación de antitrombina III. Para el experto en la materia, conocedor de que la antitrombina III potencia el efecto anticoagulador de la heparina, por lo divulgado en D04 y D05, sería obvia la combinación de ambos documentos para deducir de manera obvia que con la incorporación de la antitrombina III a la heparina se potencia el efecto anticoagulante.

D06 muestra un stent que tiene un revestimiento de múltiples capas adherido a su superficie que puede prevenir la restenosis y la trombosis en el sitio del implante. El recubrimiento del stent está compuesto por dos capas. La primera capa es un revestimiento polimérico con uno o más agentes biológicamente activos dispersados en el mismo. La segunda capa está compuesta por un polímero heparinizado hidrófobo que inhibe la coagulación de la sangre y proporciona una superficie hidrófila para reducir la fricción entre el stent y el sitio de la lesión. Una vez que se ha preparado el polímero hidrofóbico heparinizado, la segunda capa se aplica directamente sobre la primera capa usando el método de evaporación del disolvente u otro método apropiado. El polímero heparinizado hidrófobo se prepara para su aplicación combinándolo con un disolvente, tal como ciclohexano, formando de este modo una solución acuosa que tiene el polímero hidrofóbico heparinizado suspendido en su interior. El polímero heparinizado antitrombogénico y la solución de disolvente se aplican luego al stent usando un proceso de inmersión. El disolvente se evapora del stent durante un proceso de secado; dejando una película delgada del polímero hidrofóbico heparinizado sobre la primera capa (columna 8, líneas 35-50).