

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 883**

51 Int. Cl.:

A61K 47/50 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2015 PCT/EP2015/069327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16030316**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2015 E 15763504 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 3185907**

54 Título: **Molécula terapéutica APAC que comprende heparina conjugada con una proteína plasmática**

30 Prioridad:

26.08.2014 GB 201415062
17.06.2015 GB 201510637

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2019

73 Titular/es:

APLAGON OY (100.0%)
Biomedicum Helsinki 2B Tukholmankatu 8 B
00290 Helsinki, FI

72 Inventor/es:

LASSILA, RIITTA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 700 883 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Molécula terapéutica APAC que comprende heparina conjugada con una proteína plasmática

5 Campo de la invención

La invención se refiere a una molécula antitrombótica que tiene actividad antiplaquetaria y anticoagulante (APAC); a su uso como medicamento; a su configuración selectiva y al uso como inhibidor anticoagulante y plaquetario, o su configuración selectiva y uso, predominantemente, ya sea como inhibidor anticoagulante o plaquetario; y a un procedimiento para su fabricación. La invención se puede emplear tanto en la industria médica como veterinaria.

Antecedentes de la invención

Este proceso fisiológico de coagulación, durante el cual la sangre circulante se convierte de un líquido a una matriz de tipo gel, es complejo y conlleva múltiples reacciones bioquímicas que avanzan secuencialmente.

El proceso fisiológico de la coagulación implica activación, adhesión y agregación de plaquetas específicas de daño vascular, para crear un tapón o sello primario, seguido de la deposición y maduración de fibrina para crear un coágulo estable. La mencionada actividad plaquetaria puede ser inhibida por inhibidores plaquetarios y la deposición de fibrina mencionada puede ser inhibida por anticoagulantes.

El proceso de coagulación comienza casi de manera instantánea después de que una lesión en un vaso sanguíneo daña el revestimiento endotelial y/o capas más profundas del vaso. La exposición de la sangre al espacio debajo del endotelio da comienzo a dos procesos: cambios en las plaquetas, y exposición del factor de tejido subendotelial al factor de coagulación plasmático VII, que entre otros factores de coagulación contribuye de manera significativa a la generación de trombina y a la formación de fibrina.

Cuando el endotelio está dañado el colágeno subyacente queda expuesto a plaquetas circulantes, que se unen directamente al colágeno mediante los receptores superficiales de glicoproteína específicos de colágeno. De manera indirecta, el factor de von Willebrand sujeta las plaquetas para que estén en contacto estrecho con el colágeno y también forma puentes entre plaquetas y colágeno. La localización de las plaquetas en la matriz extracelular promueve la interacción del colágeno con la glicoproteína plaquetaria VI desencadenando una cascada de señalización que da como resultado la activación de integrinas plaquetarias y produce la consiguiente adherencia de las plaquetas al sitio de la lesión.

Esto genera un tapón inmediato formado por plaquetas en el sitio de la lesión; denominado hemostasia primaria.

La hemostasia secundaria se produce simultáneamente y conlleva la denominada «cascada de la coagulación». Los factores de coagulación adicionales, además del factor VII, responden en una cascada compleja dando como resultado la escisión enzimática del fibrinógeno para formar cadenas de fibrina que refuerzan el tapón plaquetario. La cascada de la coagulación consiste en una serie de etapas en las cuales una proteasa se escinde y posteriormente activa un zimógeno que entonces actúa como la siguiente proteasa en la secuencia. La conclusión de estas reacciones es la conversión del fibrinógeno, una proteína soluble, en hebras insolubles de fibrina sobre superficies de plaquetas activadas. Junto con las plaquetas que se contraen, las hebras de fibrina forman un coágulo sanguíneo estable. El factor de von Willebrand crucial y el fibrinógeno son proporcionados por las plaquetas así como también el plasma.

La cascada de la coagulación se divide normalmente (y de cierta forma artificialmente) en tres vías; primero la vía del factor tisular y en segundo lugar la vía de activación de contacto, y ambas activan la tercera «vía común final» del factor X y la trombina produciendo la formación de fibrina. El papel principal de la vía del factor tisular es generar una «ráfaga de trombina», un proceso mediante el cual la trombina, el elemento constitutivo más importante de la cascada de la coagulación en cuanto a sus funciones de activación de retroalimentación, se forma muy rápidamente. Resulta interesante señalar que la trombina es el enlace entre la activación plaquetaria y la coagulación porque si bien se produce por la cascada de la coagulación, es el activador plaquetario más potente y, por ende, es probable que los productos terapéuticos que pueden dirigirse a esta molécula sean antitrombóticos extremadamente eficaces.

La cascada de la coagulación es un proceso fisiológico normal que busca evitar la pérdida significativa de sangre o la hemorragia después de una lesión vascular. Finalmente, los coágulos sanguíneos se reorganizan y reabsorben mediante un proceso denominado fibrinólisis. La principal enzima responsable de este proceso (plasmina) se regula mediante diversos activadores e inhibidores. Asimismo, el sistema de coagulación se superpone con el sistema

inmunitario y el sistema del complemento para atrapar físicamente los microbios invasores en coágulos sanguíneos, aumentar la permeabilidad vascular y proporcionar agentes quimiotácticos para células fagocíticas. Asimismo, algunos de los productos del sistema de coagulación son directamente antimicrobianos.

5 No obstante, sucede a veces que un coágulo sanguíneo (también denominado trombo) se forma cuando no es necesario. Por ejemplo, algunas condiciones de alto riesgo como ser enfermedad aguda, inmovilización prolongada, cirugía o cáncer pueden aumentar el riesgo de desarrollar un coágulo sanguíneo. Por otra parte, los problemas fisiológicos con el proceso de coagulación pueden predisponer un individuo a la hemorragia, trombosis y ocasionalmente a ambas condiciones, las cuales pueden tener serias consecuencias asociadas a enfermedad
10 cardiovascular aterosclerótica y/o arritmias cardíacas.

Los agentes antiplaquetarios y los anticoagulantes se utilizan para tratar trastornos en la coagulación. Los agentes antiplaquetarios incluyen aspirina, dipiridamol, ticlopidina, clopidogrel, ticagrelor y prasugrel; los inhibidores de glicoproteína IIb/IIIa parenteral se utilizan durante intervenciones coronarias (angioplastia y colocación de stents). De
15 los anticoagulantes, la warfarina (y cumarinas relacionadas) y heparina son los más utilizados, pero los anticoagulantes orales directos también incluyen el inhibidor de trombina dabigatrán e inhibidores del factor X activado, tales como rivaroxabán, apixabán y edoxabán.

La antitrombina (AT) es un inhibidor de la proteasa de serina y uno de los inhibidores plasmáticos más importantes
20 de las proteasas de la coagulación. La AT bloquea/regula la cascada de la coagulación, por ejemplo, inhibiendo la trombina (factor IIa) y el factor X activado (factor Xa). La interacción de AT con estos factores aumenta con la presencia de heparina (heparina no fraccionada; HNF) y heparinas de bajo peso molecular (HBPM; heparina fraccionada), que inhiben el proceso de la coagulación a través de la unión a AT mediante una secuencia de pentasacáridos específica. Esta unión produce un cambio conformacional de AT, que acelera su inhibición de
25 factores IIa, Xa y otras proteasas involucradas en la coagulación de la sangre. Una vez disociadas, la heparina y la HBPM quedan libres para unirse a otras moléculas de AT y posteriormente inhibir más trombina y factor Xa.

Además de AT existen otros anticoagulantes de origen natural, de los cuales la proteína C y S, el inhibidor de la vía del factor tisular y el cofactor II de la heparina cumplen una función importante. La actividad de estos también se
30 potencia con las heparinas.

Principalmente, las preparaciones de heparina estándar se utilizan para el tratamiento sistémico de la trombosis. Son más eficaces en trombos pobres en plaquetas, tales como trombos venosos, donde prevalece la actividad de la coagulación. Las heparinas utilizadas en entornos clínicos, aunque son eficaces en el tratamiento sistémico de la
35 trombosis al bloquear el crecimiento adicional de la trombosis, no son lo suficientemente eficaces por sí solas para evitar complicaciones trombóticas derivadas de plaquetas, asociadas con la ruptura endógena de una placa ateromatosa o angioplastia exógena o cirugía vascular o microvascular.

Las intervenciones arteriales, tales como angioplastia [A(C)TP = angioplastia (coronaria) transluminal percutánea]
40 con o sin colocación de stents y cirugía vascular o microvascular, así como arterectomía (direccional) y tromboendarterectomía periférica o pulmonar, representan una modalidad de tratamiento cada vez más utilizada para enfermedades cardiovasculares. Por consiguiente, la trombosis arterial derivada de plaquetas, que se produce en conexión con lesiones endógenas vasculares o microvasculares y/o intervenciones exógenas tales como inserción y mantenimiento de fístulas arterio-venosas o injertos arterio-venosos, es un problema común y en estas
45 situaciones el tratamiento sistémico tradicional anticoagulación de la trombosis a menudo tiene una eficacia limitada.

El tratamiento antitrombótico sistémico actual en relación con intervenciones arteriales incluye la combinación de un anticoagulante, tal como HNF (en promedio 15 kDa) o HBPM (en promedio 7,5 kDa), con un fármaco antiplaquetario, tal como ácido acetilsalicílico (inhibidor de la ciclooxigenasa), clopidogrel u otros antagonistas de ADP. Otros
50 desarrollos también son la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa potente, el factor de von Willebrand y los antagonistas de receptores del fibrinógeno, tales como abciximab, tirofiban y eptifibatida. Estos tratamientos en combinación por vía intravenosa relativamente nuevos han conseguido prevenir 30-35 % de los taponamientos trombóticos agudos de los vasos propensos a trombos tratados con intervenciones. El riesgo de sangrado (hemorragia grave) del paciente hospitalizado más temprano que requiere infusión de productos sanguíneos ronda el 6-7 %, y con el uso de
55 bloqueadores potentes de receptores de ADP plaquetarios las hemorragias graves aumentan 12-15 % en pacientes ambulatorios durante el primer mes. El riesgo asociado de mortalidad es 15-30 veces mayor en el caso de sangrado espontáneo durante el primer mes de seguimiento.

Desafortunadamente, el tratamiento sistémico con heparina no fraccionada tiene desventajas, tales como
60 biodisponibilidad impredecible, semivida breve, unión no específica a proteínas que produce función de

antitrombina/AT comprometida y efectos inmunogénicos que, con el factor plaquetario 4 (PF4), producen trombocitopenia y trombosis. Estos efectos no deseados se han mitigado con el uso de las heparinas fraccionadas de bajo peso molecular que, desafortunadamente, también tienen eficacia limitada contra la trombosis arterial debido a un efecto limitado en la trombina unida a fibrina, y en el factor Xa unido a plaquetas, y debido a la neutralización parcial de la actividad de la heparina por el PF4 secretado por plaquetas. Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar un producto terapéutico eficaz, fiable y seguro para prevenir y/o tratar trombosis asociadas con lesiones e intervenciones vasculares o microvasculares.

Se descubrió anteriormente (WO9926983) que una molécula sintética que comprende proteoglicanos de heparina nativa de cadena larga (75 ± 25 KDa) (HEP-PG), que se puede obtener a partir de mastocitos de mamíferos, cuando se une a un núcleo de proteína, expresa propiedades antitrombóticas potentes, que están basadas en su capacidad de inhibir interacciones plaquetas-colágeno mediante una inhibición fuerte de activación de plaquetas desencadenada por adhesión de plaquetas a colágeno. Por consiguiente, esta molécula es eficaz como tratamiento antiplaquetario y es más apropiada para aplicación local e idealmente se utiliza en combinación con un fármaco sistémico antiplaquetario. Como ventaja, esta molécula al menos cuando se administra de forma local mantiene la función plaquetaria sistémica que garantiza las respuestas hemostáticas normales.

Otros investigadores (US 5.529.986) han desarrollado una molécula antitrombótica sintética que comprende la unión de cadenas de heparina no fraccionada (alrededor de 20-100 cadenas) a una poliamida de cadena recta, tal como una polilisina. Esta molécula tiene un mecanismo de acción diferente en comparación con el que se describe en la publicación internacional WO9926983 mencionada más arriba puesto que une la antitrombina y potencia su actividad. Por lo tanto, esta molécula es eficaz como anticoagulante.

Nuestra investigación permanente nos ha llevado a desarrollar una clase adicional de moléculas antitrombóticas sintéticas basadas en el uso de la heparina. Sin embargo, sorprendentemente hemos descubierto que nuestra nueva clase de moléculas tiene, como ventaja, tanto actividad antiplaquetaria como actividad anticoagulante. A nuestro entender, esta es la primera vez que se han identificado dichas moléculas duales. Asimismo, hemos descubierto que la propensión de nuestra clase novedosa de moléculas de actuar, predominantemente o en gran medida, con función antiplaquetaria o anticoagulante se puede manipular/diseñar teniendo en cuenta la cantidad de heparina unida a, o incluida en, cada molécula. Por último, también hemos descubierto que nuestra clase novedosa de moléculas, de manera ventajosa, tiene acción local y por ende puede utilizarse de manera dirigida sin que exista la preocupación de los efectos sistémicos.

Declaraciones de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona una molécula antitrombótica que tiene actividad antiplaquetaria y anticoagulante (APAC) que comprende una proteína plasmática humana a la cual se une, mediante una pluralidad de moléculas enlazadoras, una pluralidad de cadenas de heparina teniendo cada cadena un PM entre 10-21 KDa y además donde la cantidad de dichas cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática humana se selecciona de entre el grupo compuesto por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y 16.

La referencia en el presente documento a la cantidad de cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática humana se determina con relación a un ensayo colorimétrico de glicosaminoglicanos sulfatados, kit de ensayo Blyscan (p. ej., Biocolor Ltd., Reino Unido) utilizando un estándar de heparina con concentraciones específicas para proporcionar una curva de calibración contra la cual se pueden leer/determinar muestras de análisis. Por lo tanto, la cantidad de cadenas de heparina mencionadas en la declaración principal de la invención se correlaciona con la columna 1 de la Tabla I. El ensayo particular utilizado se describe en el presente documento.

La actividad antiplaquetaria (AP) y anticoagulante (AC) es única y sumamente ventajosa porque permite que las moléculas se dirijan a casos donde se precisa actividad antiplaquetaria y/o anticoagulante como ser en vasos curvos o en vasos estenóticos donde se necesita AP en el sitio de estenosis, y tanto distal como proximalmente cuando hay turbulencia y un crecimiento de trombo es mediado por trombina se necesita acción AC.

Además de la funcionalidad dual favorable, hemos descubierto que las moléculas de la invención tienen una fuerte capacidad de unión a la matriz extracelular, incluyendo colágeno y factor de von Willebrand y, por ende, tienen acción antitrombótica local dirigida. Esto constituye un rasgo sumamente deseado puesto que significa que las moléculas se pueden utilizar en un sitio específico para tratar una condición específica sin preocuparse por los efectos antitrombóticos sistémicos perjudiciales que puedan potencialmente originar sangrado o hemorragias. Este direccionamiento ventajoso existe independientemente del modo de administración, es decir, local o sistémico.

La referencia en el presente documento a acción antitrombótica dirigida se refiere a retención de las moléculas de la invención en el sitio de aplicación durante periodos significativos de tiempo, por ejemplo, superiores a 24 horas y, además, idealmente, superiores a 48 o 50 horas e incluso hasta 120 horas. Sobre todo, esta retención en el sitio de aplicación se produce tanto cuando se administra fuera como dentro del vaso sanguíneo.

5

En una realización preferida de la invención, dicha proteína plasmática humana es una albúmina, globulina o fibrinógeno, idealmente es seroalbúmina humana (HSA) o alfa-2 macroglobulina humana. Como es de conocimiento general, la seroalbúmina es producida por el hígado, se disuelve en el plasma sanguíneo y es la proteína sanguínea más abundante en los mamíferos. La seroalbúmina es una proteína globular, soluble en agua, con un peso

10

molecular aproximado de 66.000 Daltons. Como también es sabido la alfa-2 macroglobulina (α_2M y A2M) es una proteína plasmática grande, en realidad, es la proteína no inmunoglobulina principal más grande que se encuentra en el plasma y es producida, principalmente, por el hígado. La alfa-2 macroglobulina actúa como anti-proteasa y puede desactivar una gran variedad de proteinasas.

15 Incluso en una realización preferida adicional de la invención dicha proteína plasmática humana es recombinante.

Incluso en una realización preferida adicional de la invención dicha heparina es una heparina no fraccionada. Incluso más idealmente dicha heparina es de origen mamífero, idealmente humana o porcina. En el caso en el cual la proteína plasmática es humana y la heparina porcina o bovina, dicha molécula APAC representa una molécula

20

química. Preferentemente, la heparina tiene un PM seleccionado de entre el grupo compuesto por: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 KDa, idealmente 15 o 16 o 17 KDa.

25 Incluso en una realización preferida adicional de la invención dicha heparina es recombinante.

Incluso en una realización más preferida de la invención dicha molécula enlazadora, al menos cuando el enlace de dicha heparina a dicha proteína plasmática humana es completo, es una molécula enlazadora única que se une a una molécula de heparina y, en consecuencia, la unión de una molécula enlazadora a dicha proteína plasmática

30

humana produce la unión de una molécula de heparina a dicha proteína plasmática humana. Por lo tanto, la estequiometría de dicho enlazador a dicha heparina es 1.1. Preferentemente dicho enlazador es un enlazador de aminas y se enlaza con grupos amino en dicha heparina y proteína plasmática humana, idealmente, pero no exclusivamente, dicho enlazador se conjuga con serina en la cadena de heparina, idealmente ubicada en el extremo o cerca del extremo de dicha cadena, e idealmente, pero no exclusivamente, con lisina en la proteína plasmática

35

humana. Incluso más idealmente dicho enlazador conjuga dicha heparina y proteína plasmática humana mediante el uso de puentes disulfuro. Incluso más preferentemente dicho enlazador es un agente de reticulación hetero-bifuncional tal como un enlazador SPDP o un agente de reticulación homo-bifuncional tal como un enlazador DTSP.

SPDP (a la venta, por ejemplo, por Sigma Aldrich o Thermo Scientific Pierce) es un agente de reticulación de cadena

40

corta utilizado para conjugación amina a sulfhidrilo mediante éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) y grupos reactivos a piridilditio y forma enlaces disulfuro escindibles (reducibles) con sulfhidrilos de cisteína. Está disponible en versiones de cadena corta y cadena larga. La versión de cadena larga está disponible en forma sulfonada y es soluble en agua. Preferimos utilizar éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-(2-piridilditio)propiónico. Si bien todos los SPDP contienen un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) reactivo a aminas que reaccionará con residuos de

45

lisina para formar un enlace amida estable y, en el otro extremo del enlazador, hay un grupo piridil disulfuro que reaccionará con sulfhidrilos para formar un enlace disulfuro reversible.

DTSP (di(éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) de ácido 3,3'-ditiopropiónico), comercializado por, por ejemplo, Sigma-Aldrich o Thermo Scientific Pierce) es un agente de reticulación de cadena corta utilizado para conjugación

50

amina a amina mediante grupos éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). Está disponible en versiones de cadena corta y cadena larga. La versión de cadena larga está disponible en forma sulfonada (éster de N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS)) y es soluble en agua. Los DTSP contienen dos grupos éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) reactivo a aminas y un puente disulfuro en el brazo espaciador. El éster de N-hidroxisuccinimida reacciona con residuos que contienen la amina principal para formar enlaces amida estables con un enlace disulfuro escindible en la molécula enlazadora.

55

Por consiguiente, las fórmulas genéricas de nuestra molécula sintética preferida se pueden expresar de la siguiente forma:

(Hep-enlazador) $_n$ -PIPr

60

donde $n=4-16$;

PIPr es una proteína plasmática humana tal como seroalbúmina humana o alfa-2 macroglobulina humana; y

5 la cadena de heparina tiene un PM de 10-21 KDa.

Más en particular, donde utilizamos nuestro enlazador preferido éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-(2-piridilditio)propiónico (SPDP) o di(éster de N-hidroxisuccinimida) de ácido 3,3'-ditiodipropiónico (DTSP), nuestra molécula sintética preferida se puede expresar de la siguiente forma:

10 $(\text{Hep-NH-CO-CH}^2\text{-CH}^2\text{-S-S-CH}^2\text{-CH}^2\text{-CO-NH})_n\text{-PIPr}$ donde $n=4-16$;

PIPr es una proteína plasmática humana tal como seroalbúmina humana o alfa-2 macroglobulina humana; y

15 la cadena de heparina tiene un PM de 10-21 KDa.

Si bien es posible unir hasta 36 cadenas de heparina a cada proteína plasmática humana tal como albúmina, específicamente HSA, hemos descubierto que la unión de entre 4-16 cadenas de heparina a cada proteína plasmática humana proporciona la funcionalidad dual deseada de la actividad tanto antiplaquetaria como
20 anticoagulante. Asimismo, como muestran los datos que se enseñan en el presente documento, también hemos descubierto que la unión de menos de 6 cadenas de heparina, idealmente entre 4-6 cadenas de heparina, a cada proteína plasmática humana proporciona predominantemente, o en gran medida, la actividad anticoagulante deseada mientras que la unión de más de 8 cadenas de heparina, idealmente entre 8-16 cadenas de heparina, a cada proteína plasmática humana proporciona predominantemente, o en gran medida, la actividad antiplaquetaria
25 deseada.

En todos los aspectos y realizaciones de la invención reivindicada previamente descritos y que se describen a continuación, la expresión «proteína plasmática» debería interpretarse como «proteína plasmática humana».

30 Por consiguiente, incluso en una realización preferida adicional de la invención, dicha molécula APAC tiene 6 o menos, tal como entre 4-6, cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática cuando dicha molécula se ha de utilizar predominantemente, o en gran medida, como anticoagulante.

Por consiguiente, incluso en una realización preferida adicional de la invención, dicha molécula APAC tiene 8 o más,
35 tal como entre 8-16, cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática cuando dicha molécula se ha de utilizar predominantemente, o en gran medida, como inhibidor antiplaquetario/plaquetario.

Por consiguiente, incluso en una realización preferida adicional de la invención, dicha molécula APAC tiene 8 cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática cuando dicha molécula se ha de utilizar
40 predominantemente, o en gran medida, como inhibidor antiplaquetario/plaquetario.

Por consiguiente, incluso en una realización preferida adicional de la invención, dicha molécula APAC tiene 11 cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática cuando dicha molécula se ha de utilizar
45 predominantemente, o en gran medida, como inhibidor antiplaquetario/plaquetario.

En consecuencia, la unión preferida de cierta cantidad de cadenas de heparina a cada núcleo de proteína plasmática puede influenciar la función predominante de la molécula sintética. Este rasgo singular tiene aplicación técnica debido a que, si bien el efecto que ha de conseguirse cuando se utiliza una o varias de nuestras moléculas es antitrombótico, hay casos en los cuales se requiere énfasis en una actividad antiplaquetaria y otros casos en los
50 cuales se requiere énfasis adicional en una actividad anticoagulante. Por ejemplo, cuando se están tratando vasos tales como venas en las que la velocidad de corte es relativamente baja, es decir, mayor lumen de vaso y menor velocidad de flujo sanguíneo, es muy conveniente un antitrombótico con predominio o énfasis en anticoagulación. Por otra parte, cuando se están tratando vasos tales como arterias o una fistula arterio-venosa, por ejemplo, donde la velocidad de corte es relativamente elevada, es decir, una velocidad de flujo sanguíneo más elevada o vasos con
55 un lumen de vaso más pequeño y, por consiguiente, donde la velocidad de flujo sanguíneo es elevada, es muy conveniente un antitrombótico con predominio, o énfasis, en actividad antiplaquetaria. De manera similar, donde se utilizan implantes tales como catéteres, stents o dispositivos utilizados para realizar angioplastia con balón, estos se pueden revestir con las moléculas APAC de la invención y el tipo de moléculas APAC utilizadas, idealmente, se determinará en relación con la naturaleza del vaso en el cual se han de insertar los implantes.

60

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona una molécula antitrombótica que tiene actividad antiplaquetaria y anticoagulante (APAC) que comprende una proteína plasmática a la cual se une, mediante una pluralidad de moléculas enlazadoras, una pluralidad de cadenas de heparina teniendo cada una un PM entre 10-21 KDa y además donde la cantidad de dichas cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática se selecciona de entre el grupo compuesto por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y 16 para uso como medicamento.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención se proporciona una molécula antitrombótica que tiene actividad antiplaquetaria y anticoagulante (APAC) que comprende una proteína plasmática a la cual se une, mediante una pluralidad de moléculas enlazadoras, una pluralidad de cadenas de heparina teniendo cada una un PM entre 10-21 KDa y además donde la cantidad de dichas cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática se selecciona de entre el grupo compuesto por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y 16 para uso como antitrombótico.

En una realización preferida de este aspecto de la invención dicho antitrombótico es de acción local. Con esto queremos decir que el antitrombótico se une a la matriz extracelular y, por consiguiente, se retiene en el sitio de aplicación, o en el sitio de la acción buscada, con actividad local prolongada. De hecho, esta actividad de acción local es ventajosa puesto que significa que las moléculas de la invención son dirigidas de manera eficaz al sitio donde más se necesitan, es decir, donde es probable que se produzca una trombosis, en otros términos, la matriz extracelular donde tanto el colágeno como el factor de von Willebrand son componentes presentes/integrales.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención se proporciona el uso de una molécula antitrombótica que tiene actividad antiplaquetaria y anticoagulante (APAC) que comprende una proteína plasmática a la cual se une, mediante una pluralidad de moléculas enlazadoras, una pluralidad de cadenas de heparina teniendo cada una un PM entre 10-21 KDa y además donde la cantidad de dichas cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática se selecciona de entre el grupo compuesto por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y 16 para uso en la fabricación de un medicamento para tratar trombosis o una supuesta trombosis.

La referencia en el presente documento a una supuesta trombosis se relaciona con cualquier caso, circunstancia o condición que pueda dar lugar a una trombosis, tal como (sin carácter restrictivo) la práctica de una intervención quirúrgica, p. ej. trombectomía quirúrgica, en este ejemplo las moléculas de la invención podrían administrarse al sitio de operación o infundirse en el vaso que se ha operado o infundirse en un vaso cercano corriente abajo cuyo suministro sanguíneo fluiría cerca de/dentro de dicho sitio de operación.

En una realización preferida de este aspecto de la invención dicho medicamento es antitrombótico, idealmente de acción local. Con acción local se refiere a que el antitrombótico se une a la matriz extracelular y, por consiguiente, se retiene en el sitio de aplicación con actividad local prolongada. De hecho, esta actividad de acción local es ventajosa puesto que significa que las moléculas de la invención son dirigidas de manera eficaz al sitio donde más se necesitan, es decir, donde es probable que se produzca una trombosis, en otros términos, la matriz extracelular donde tanto el colágeno como el factor de von Willebrand son componentes presentes/integrales.

En los aspectos antes mencionados de la invención preferentemente dicha molécula APAC tiene 6 o menos, tal como entre 4-6, cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática, mediante dichos enlazadores, cuando dicha molécula se ha de utilizar predominantemente, o en gran medida, como anticoagulante.

De manera similar, en los aspectos antes mencionados de la invención preferentemente dicha molécula APAC tiene 8 o más, tal como entre 8-16, cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática, mediante dichos enlazadores, cuando dicha molécula se ha de utilizar predominantemente, o en gran medida, como inhibidor antiplaquetario/plaquetario.

Incluso en realizaciones preferidas adicionales de la invención dichas moléculas APAC se pueden utilizar en el tratamiento o prevención de complicaciones trombóticas, tales como las asociadas con la ruptura endógena de una placa ateromatosa; o después de terapia trombolítica para prevenir reoclusión; o angioplastia exógena; o cirugía vascular o microvascular; intervenciones arteriales tales como angioplastia, en particular, angioplastia (coronaria) transluminal percutánea con o sin colocación de stents; arterectomía (direccional); tromboendarterectomía periférica o pulmonar; trombosis arterial derivada de plaquetas, lesiones vasculares o microvasculares; púrpura trombocitopénica trombótica o intervenciones exógenas, tales como inserción y mantenimiento de fístula arterio-venosa o injertos arterio-venosos y deficiencia de antitrombina (AT).

De acuerdo con un quinto aspecto de la invención se proporciona el uso de una molécula antitrombótica que tiene actividad antiplaquetaria y anticoagulante (APAC) que comprende una proteína plasmática a la cual se une, mediante una pluralidad de moléculas enlazadoras, una pluralidad de cadenas de heparina teniendo cada una un

PM entre 10-21 KDa y además donde la cantidad de dichas cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática se selecciona de entre el grupo compuesto por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y 16 para uso en el tratamiento de lesión por isquemia-reperfusión (LIR) o lesión renal aguda o infarto de miocardio o accidente cerebrovascular o enfermedad oclusiva arterial periférica o isquemia mesentérica.

5

De manera alternativa, de acuerdo con un sexto aspecto de la invención se proporciona el uso de una molécula antitrombótica que tiene actividad antiplaquetaria y anticoagulante (APAC) que comprende una proteína plasmática a la cual se une, mediante una pluralidad de moléculas enlazadoras, una pluralidad de cadenas de heparina teniendo cada una un PM entre 10-21 KDa y además donde la cantidad de dichas cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática se selecciona de entre el grupo compuesto por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y 16 para uso en la fabricación de un medicamento para tratar lesión por isquemia-reperfusión o lesión renal aguda o infarto de miocardio o accidente cerebrovascular o enfermedad oclusiva arterial periférica o isquemia mesentérica.

10

De acuerdo con un séptimo aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para la fabricación de una molécula antitrombótica que tiene actividad tanto antiplaquetaria como anticoagulante (APAC) que comprende:

15

i. modificar una cadena de heparina (Hep) no fraccionada para producir un producto de reactivo que tiene un grupo sulfhidrido (-SH);

ii modificar una proteína plasmática, tal como seroalbúmina, para producir un producto de reactivo que tiene un grupo piridil ditiol (-PDP); y

20

iii enlazar el producto de reactivo de i) con el producto de reactivo de ii) utilizando un agente de reticulación heterobifuncional.

En un procedimiento preferido de la invención dicho enlazador es éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-(2-piridilditiol)propiónico SPDP (a la venta (opcionalmente calidad BPF), por ejemplo, en Sigma-Aldrich o Thermo Scientific Pierce).

25

De acuerdo con un octavo aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para la fabricación de una molécula antitrombótica que tiene actividad tanto antiplaquetaria como anticoagulante (APAC) que comprende:

30

i. modificar una cadena de heparina (Hep) no fraccionada para producir un producto de reactivo que tiene un grupo éster de N-hidroxisuccinimida (-NHS);

ii. enlazar el producto de reactivo de i) con una proteína plasmática, tal como seroalbúmina, que contiene aminas primarias utilizando un agente de reticulación homo bi-funcional.

35

En un procedimiento preferido de la invención dicho enlazador es di(éster de N-hidroxisuccinimida) de ácido 3,3'-ditiopropiónico DTSP (a la venta (opcionalmente calidad BPF), por ejemplo, en Sigma-Aldrich o Thermo Scientific Pierce).

40

De acuerdo con un noveno aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad o condición seleccionada de entre el grupo compuesto por:

complicaciones tromboticas, tales como las asociadas con la ruptura endógena de una placa ateromatosa; terapia trombolítica para prevenir reoclusión, trombosis arterial derivada de plaquetas; lesiones vasculares o microvasculares; púrpura trombocitopénica trombótica; lesión por isquemia-reperfusión; lesión renal aguda; infarto de miocardio; accidente cerebrovascular; enfermedad oclusiva arterial periférica, isquemia mesentérica y deficiencia de antitrombina (AT);

45

donde una cantidad efectiva de molécula antitrombótica que tiene actividad antiplaquetaria y anticoagulante (APAC) que comprende una proteína plasmática a la cual se une, mediante una pluralidad de moléculas enlazadoras, una pluralidad de cadenas de heparina teniendo cada una un PM entre 10-21 KDa y además donde la cantidad de dichas cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática se selecciona de entre el grupo compuesto por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y 16 se administra a un individuo que ha de ser tratado.

50

En una realización preferida de este aspecto de la invención dicha molécula antitrombótica se administra después de terapia trombolítica para prevenir reoclusión.

55

Todavía más preferentemente, dicha cantidad de cadenas de heparina se selecciona de entre el grupo compuesto por 8, 9, 10, 11 y 12.

60

De acuerdo con un décimo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de tratamiento seleccionado de entre el grupo compuesto por:

5 angioplastia exógena; cirugía vascular o microvascular; intervención arterial; angioplastia, en particular angioplastia (coronaria) transluminal percutánea con o sin colocación de stents; arterectomía (direccional); tromboendarterectomía periférica o pulmonar; e intervenciones exógenas tales como inserción y mantenimiento de fístula arterio-venosa o injertos arterio-venosos;

10 donde una cantidad efectiva de molécula antitrombótica que tiene actividad antiplaquetaria y anticoagulante (APAC) que comprende una proteína plasmática a la cual se une, mediante una pluralidad de moléculas enlazadoras, una pluralidad de cadenas de heparina teniendo cada una un PM entre 10-21 kDa y además donde la cantidad de dichas cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática se selecciona de entre el grupo compuesto por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y 16 se administra a un individuo que ha de ser tratado antes, durante o después de dicho tratamiento.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención dicha molécula antitrombótica se administra antes de practicar cualquiera o más de los tratamientos mencionados.

20 Todavía más preferentemente, dicha cantidad de cadenas de heparina se selecciona de entre el grupo compuesto por 8, 9, 10, 11 y 12.

25 Todavía más preferentemente, la molécula antitrombótica que tiene actividad antiplaquetaria y anticoagulante (APAC) se purificó mediante cromatografía tal como cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) utilizando medios de Butil-Sefarosa (GE Healthcare, EE.UU.) y/o ultra/diafiltración. Sin embargo, las moléculas APAC se pueden purificar mediante otros medios, tales como cromatografía de intercambio de aniones, u otras formas conocidas para los expertos en la materia.

30 En las reivindicaciones que aparecen más adelante y en la descripción precedente de la invención, excepto donde el contexto indique lo contrario por el texto expreso o la insinuación necesaria, el término «comprende» o sus variantes tales como «comprende» o «comprendiendo» se utiliza con un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de los rasgos determinados pero no para excluir la presencia o adición de rasgos adicionales en diversas realizaciones de la invención.

35 Se describirá ahora la presente invención, a modo de ejemplo únicamente, con referencia específica a las siguientes figuras donde:

Figura 1. Muestra el cribado del efecto en el tiempo de trombina (TT) en presencia de dos concentraciones de la APAC1 de primera generación (lote 1.1, 4 cadenas de Hep), la APAC2 de segunda generación (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) y la APAC-CL6 a CL16 (lote:3.1; 3.2; 3.3; 3.4; 3.5 y 3.6, 8; 8; 10; 13; 16 y 6 cadenas de Hep, respectivamente) con heparina (Hep) [C] a 1,0 y 1,75 µg/mL en lotes de plasma. El valor inicial de TT fue 28 s.

40 Figura 2. Muestra el tiempo de trombina (TT) en presencia de tres a cinco concentraciones de APAC1 de cuarta generación (lote 4.1, 4 cadenas de Hep) y APAC2 (lote 4.2, 8 cadenas de Hep) con [C] Hep 0,75; 1,0 y 1,75 µg/mL en lotes de plasma. El valor inicial de TT fue 31 s.

45 Figura 3. Muestra el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) en presencia de cinco concentraciones de la APAC1 de primera generación (lote 1.1, 4 cadenas de Hep), la APAC2 de segunda generación (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) y la APAC-CL8 a -16 de tercera generación (lotes 3.1; 3.2; 3.3; 3.4 y 3.5, 8, 8, 10, 13 y 16 cadenas de Hep, respectivamente) con heparina (Hep) [C] a 1; 2; 3; 6 y 8 µg/mL en lotes de plasma. El valor inicial de APTT fue 30 s.

50 Figura 4. Muestra una comparación de nivel de conjugación de heparina en APAC con cinco concentraciones de heparina diferentes en la prolongación (1- a 10 veces) de APTT. Los resultados con APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep), APAC-CL8 (lotes 3.1 y 3.2, 8 cadenas de Hep), APAC-CL10 (lote 3.3, 10 cadenas de Hep), APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep), APAC-CL13 (lote 3.4, 13 cadenas de Hep), APAC- CL16 (lote 3.5, 16 cadenas de Hep) en 55 APTT con [C] Hep 1; 2; 3; 6; 8 µg/mL se muestran en lotes de plasma. El valor inicial de APTT fue 30 s.

Figura 5. Muestra APTT en presencia de cinco concentraciones de la APAC1 de cuarta generación (lote 4.1, 4 cadenas de Hep) y APAC2 (lote 4.2, 8 cadenas de Hep) con [C] Hep 1; 2; 3; 6 y 8 µg/mL en lotes de plasma. El valor inicial de APTT fue 30 s.

60

Figura 6. Muestra generación de trombina demorada por trombogranas automatizados calibrados en presencia de A) 0,25 µg/mL y B) 0,5 µg/mL de la APAC1 de primera generación (lote 1.1, 4 cadenas de Hep), la APAC2 de segunda generación (lote 2.1, 11 cadenas de Hep), en comparación con HNF y tampón fosfato salino (PBS) en lotes de plasma (PP) complementados con 5 pM de factor tisular (TF) y 4 µM de fosfolípidos (PPL).

5

Figura 7. Muestra generación de trombina demorada por trombogranas automatizados calibrados en presencia de A) 1,0 µg/mL y B) 1,5 µg/mL de la APAC1 de primera generación (lote 1.1, 4 cadenas de Hep), la APAC2 de segunda generación (lote 2.1, 11 cadenas de Hep), en comparación con HNF y PBS en lotes de plasma (PP) complementados con 5 pM de TF y 4 µM de PPL.

10

Figura 8. Muestra generación de trombina por trombogranas automatizados calibrados en presencia de A) 0,25 µg/mL y B) 0,5 µg/mL de la APAC-CL6 a CL16 de tercera generación (8, 8, 10, 13, 16 y 6 cadenas de Hep) y PBS en lotes de plasma (PP) complementados con 5 M de TF y 4 µM de PPL. APAC-CL8 (lote 3.1 y 3.2, 8 cadenas de Hep), APAC-CL10 (lote 3.3, 10 cadenas de Hep), APAC-CL13 (lote 3.4, 13 cadenas de Hep), APAC-CL16 (lote 3.5, 16 cadenas de Hep) y APAC-CL6 (lote 3.6, 6 cadenas de Hep).

15

Figura 9. Muestra generación de trombina por trombogranas automatizados calibrados en presencia de A) 1,0 µg/mL y B) 1,5 µg/mL de la APAC-CL6 a CL16 (8, 8, 10, 13, 16 y 6 cadenas de Hep) y PBS en lotes de plasma (PP) complementados con 5 M de TF y 4 µM de PPL. APAC-CL8 (lote 3.1 y 3.2, 8 cadenas de Hep), APAC-CL10 (lote 3.3, 10 cadenas de Hep), APAC-CL13 (lote 3.4, 13 cadenas de Hep), APAC-CL16 (lote 3.5, 16 cadenas de Hep) y APAC-CL6 (lote 3.6, 6 cadenas de Hep).

20

Figura 10. Muestra generación de trombina por trombogranas automatizados calibrados en presencia de 0,25; 0,5; 1,0; y 1,5 µg/mL de HNF en plasma rico en plaquetas (PRP) complementado con 1 pM de TF, las plaquetas suministrando los PPL.

25

Figura 11. Muestra generación de trombina por trombogranas automatizados calibrados en presencia de A) 0,25 µg/mL y B) 0,5 µg/mL de APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep), APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) y HNF en PRP (donante es respondedor alto) complementados con 1 pM de TF, las plaquetas suministrando los PPL.

30

Figura 12. Muestra generación de trombina por trombogranas automatizados calibrados en presencia de A) 0,25 µg/mL y B) 0,5 µg/mL y C) 1,0 µg/mL de APAC1 (lote 4.1, 4 cadenas de Hep) y APAC2 (lote 4.2, 8 cadenas de Hep) y en PRP (donante es respondedor moderado) complementados con 1 pM de TF, las plaquetas suministrando los PPL.

35

Figura 13. Muestra agregación inducida por colágeno en PRP en presencia de las APAC de tercera generación, APAC-CL6 a -CL-16 (8, 8, 10, 13, 16 y 6 cadenas de Hep). Se proporciona un ejemplo del respondedor bajo a APAC con [C] Hep A) 1, B) 10 y C) 30 µg/mL. Canal 1: APAC-CL8 (lote 3.1, 8 cadenas de Hep), canal 2: APAC-CL8 (lote 3.2, 8 cadenas de Hep), canal 3: APAC-CL10 (lote 3.3, 10 cadenas de Hep), canal 4: APAC-CL13 (lote 3.4, 13 cadenas de Hep), canal 5: APAC-CL16 (lote 3.5, 16 cadenas de Hep), canal 6: APAC-CL6 (lote 3.6, 6 cadenas de Hep) y canal 7: mezcla de APAC-CL10 y -16 (10 cadenas de Hep y 16 cadenas de Hep). La [C] de colágeno fue 0,5 µg/mL.

40

Figura 14. Muestra inhibición de agregación plaquetaria máxima inducida por colágeno en presencia de APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) en PRP con un respondedor alto (círculo abierto) y un respondedor moderado (cuadrado abierto) representativos a APAC a 3; 10; 30; 60 y 90 µg/mL. También se muestra la inhibición media de agregación plaquetaria en donantes en presencia de HNF (triángulo negro). La inhibición de la agregación plaquetaria máxima respecto del vehículo (PBS) se muestra como un porcentaje (%).

45

Figura 15. Muestra un gráfico de reducciones de flujo cíclico (CFR, por su sigla en inglés) después de la aplicación local de HNF y APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) (ambas a 4 mg/mL; 2 mg en total) en el sitio de la lesión reciente en el modelo de Folts modificado de trombosis aguda en babuinos. Inmediatamente después que regresó el flujo sanguíneo inicial, se provocó estenosis de la arteria (30 %) a la velocidad de flujo de 100 mL/min. Se observaron oclusiones reiteradas (5 CFR en 25 minutos) en el sitio de la lesión tratada con HNF (triángulo negro). Antes de volver a implementar la estenosis (a los 20-50 minutos) y de aumentar la estenosis (a los 180 minutos), el sitio de la lesión tratada se lavó con tampón fosfato salino (PBS). En comparación, con el tratamiento con APAC (círculo abierto) el sitio de la lesión reciente permaneció abierto durante todo el experimento: En primer lugar durante 120 minutos con flujo sanguíneo arterial de 100 mL/min (círculo abierto), en segundo lugar durante 14 minutos con estenosis apretada (60 %) con flujo sanguíneo arterial de 50 mL/min (cruz negra), y finalmente durante periodos secuenciales de 10 y 15 minutos con estenosis dura (90 %) con flujo sanguíneo de 30 mL/min (estrellas negras).

50

55

60

Figura 16. Muestra una comparación de APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) y HNF (ambas a 4 mg/mL) en formación de trombo inducida por colágeno en sangre circulante en un modelo de babuino (n=4). La deposición plaquetaria reducida se observó para: A) superficies de colágeno en el sitio de aplicación donde la deposición plaquetaria era reducida en presencia de APAC1 en 34+13 % (media y DE, n=4) en comparación con HNF (p=0,01), y B) trombo que se propagó 10-cm distal respecto del segmento de colágeno donde la deposición plaquetaria era reducida en presencia de APAC1 en 63+11 % (media y DE, n=4) en comparación con HNF (p=0,19). La formación de fibrina también se redujo en 45 %+14 % (media y DE, n=4) (p=0,01) con APAC1 en comparación con control sin tratar, compatible con la acción dual de inhibición plaquetaria y de coagulación.

Figura 17. Muestra la acción anticoagulante inmediata de APAC y HNF en plasma de rata. Las APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep), utilizadas con 16, 32 o 80 µg para investigar la lesión por isquemia-reperfusión o lesión renal aguda fueron anticoagulantes eficaces cuando se las midió con el ensayo APTT. Como comparador, la heparina no fraccionada (HNF, línea negra punteada) se utilizó con el mismo intervalo de concentración 16, 32 o 80 µg. Es posible observar que los dos productos terapéuticos funcionaron comparativamente de la misma manera a 16 µg pero a 32 µg la HNF prolongó el APTT marginalmente más que la APAC2, mientras que a 80 µg la HNF prolongó el APTT de manera significativa más que la APAC2 (línea negra continua).

APTT como media+DE 10 min después de administración IV de APAC2 o HNF a la dosis de 16 µg (0,06 mg/kg), 32 µg (0,13 mg/kg) y 80 µg (0,32 mg/kg). n=5-8/grupo. ***P<0,001. Con la dosis de 16 µg, el APTT fue 18,0+6,6 (n=7) con APAC y 27+6,2 (n=4), con HNF. Con la dosis de 32 µg, el APTT fue 17,4+4,0 (n=10) con APAC y 25,2+2,0 (n=5), con HNF. Con la dosis de 80 µg, el APTT fue 42,2+18 (n=8), con APAC y 72-180>(n=5), con HNF. La línea roja punteada es el valor inicial de referencia para APTT. Las dosis de heparina se determinaron utilizando HNF como el estándar en el ensayo de glicosaminoglicanos sulfatados Blyscan.

Figura 18. Muestra la función renal y lesión tubulointersticial después de lesión por isquemia-reperfusión renal bilateral de 30 minutos. El efecto de 16 o 32 µg de APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) en la función renal, cuando se analizó con los marcadores establecidos, en comparación con un control de vehículo de solución salina (IV) únicamente. Los marcadores de función renal creatinina, urea y lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos (LAGN) se analizaron durante un periodo de tres días después de lesión por isquemia-reperfusión reversible de 30 min y la concentración de APAC2 de 32 µg redujo de manera significativa los niveles de cada marcador en cada intervalo de tiempo; sugiriendo una función protectora para la APAC2 con 32 µg.

Para analizar la función renal y la lesión tubulointersticial después de la isquemia renal, se recogió suero de rata una vez al día durante 3 días después de la reperfusión. Niveles en suero de (A) creatinina, (B) nitrógeno ureico y (C) LAGN, un biomarcador de lesión tubulointersticial en ratas pretratadas con APAC 16 µg (0,06 mg/kg) y 32 µg (0,13 mg/kg) IV. Las ratas de control recibieron un vehículo de solución salina IV n=8/grupo. ***P<0,01. Las dosis de heparina se determinaron utilizando HNF como el estándar en el ensayo de glicosaminoglicanos sulfatados Blyscan.

Figura 19. Muestra activación inmune innata e histopatología después de lesión por isquemia-reperfusión renal bilateral de 30 minutos. Los efectos visibles de lesión por isquemia-reperfusión después de lesión reversible de 30 minutos mejoraron con el uso de APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) con o bien 16 o 32 µg en comparación con control con vehículo de solución salina (IV). Se estudió el riñón en cuanto a A) ligando de inmunidad innata hialuronano (HA), B) daño tubular por marcador de lesión tubulointersticial Kim-1 y C) lesión tubular (aplanamiento, dilatación, cilindros y necrosis) con tinción hematoxilina-eosina (H&E).

Para evaluar la activación inmune innata y la lesión renal a los 3 días de la reperfusión, se tiñeron secciones transversales de riñón embebidas con parafina para observar (A) ligando de inmunidad innata hialuronano, (B) marcador de lesión tubulointersticial Kim-1 y (C) H&E para histopatología en ratas pretratadas con APAC 16 µg (0,06 mg/kg) y 32 µg (0,13 mg/kg) IV. (A) El área con hialuronano positivo se midió con obtención de imágenes asistida por ordenador. (C) C = cilindros epiteliales, D = dilatación tubular; punta de flecha = aplanamiento epitelial; flecha = necrosis epitelial. Las ratas de control recibieron un vehículo de solución salina IV. Controles de IgG en los recuadros. n=8/grupo. *P<0,05. Las dosis de heparina se determinaron utilizando HNF como el estándar en el ensayo de glicosaminoglicanos sulfatados Blyscan.

Figura 20. Muestra la función renal y la supervivencia global después de lesión por isquemia-reperfusión renal bilateral de una hora. Los riñones se sometieron a LIR grave sujetando ambas arterias renales con clamps durante una hora. Para analizar la supervivencia y función renal post-isquémica, se recogió suero de rata una vez al día durante 3 días después de la reperfusión. El tratamiento con APAC (lote 2.1, 11 cadenas de heparina) 32 µg permite que el tejido sobreviva (A) % supervivencia de ratas en el periodo de vigilancia de tres días, además los niveles en

suero de (B) creatinina y (C) nitrógeno ureico en ratas pretratadas con APAC 32 µg (0,13 mg/kg) IV también mostraron resultados positivos; los valores de creatinina y urea en suero de rata fueron reducidos sugiriendo la retención de la función renal. Las ratas de control recibieron un vehículo de solución salina IV n=8/grupo. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. Las dosis de heparina se determinaron utilizando HNF como el estándar en el ensayo de GAG.

Figura 21. Muestra tiempo de trombina (TT) en presencia de APAC1 de quinta generación (lote 5.1, 4 cadenas de Hep) con [C] Hep 1,0 y 2 µg/mL y APAC2 (lote 5.2, 8 cadenas de Hep) con [C] Hep 2 µg/mL en plasma con antitrombina agotada. Las dosis de heparina se determinaron utilizando HNF como el estándar en el ensayo de GAG.

Figura 22. Muestra tiempo de trombina parcial activado (APTT) en presencia de APAC1 de quinta generación (lote 5.1, 4 cadenas de Hep) con [C] Hep 4 y 5 µg/mL, y APAC2 (lote 5.2, 8 cadenas de Hep) y HNF con [C] Hep 4 µg/mL en plasma con antitrombina agotada. Las dosis de heparina se determinaron utilizando HNF como el estándar en el ensayo de GAG.

Procedimientos

Conjugación

Las cadenas de heparina (Hep) no fraccionada se conjugaron con seroalbúmina humana (HSA) mediante puentes disulfuro creados por dos agentes de reticulación alternativos y vías de reacción utilizando:

i) Agente de reticulación hetero-bifuncional éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-(2-piridiliditio)propiónico (SPDP). Para la conjugación se utilizaron aminas libres en Ser en la región enlazadora de Hep y Lys en HSA. La Hep y la HSA se modificaron en reacciones separadas en derivados de sulfhidrilo (-SH) y piridil ditiol (-PDP), respectivamente. En la reacción de conjugación final el grupo piridil ditiol de HSA reaccionó con el grupo sulfhidrilo de Hep produciendo la formación de un complejo con enlaces disulfuro y la liberación de piridina 2-tiona.

ii) Agente de reticulación homo-bifuncional éster de di-(N-hidroxisuccinimida (NHS)) de ácido 3,3'-ditididipropiónico (DTSP). Para la conjugación se utilizaron aminas libres en Ser en la región enlazadora de Hep y Lys en HSA. Primero se modificó Hep en derivado de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) con la liberación del primer grupo NHS. En la reacción de conjugación final el Lys de HSA reaccionó con el grupo éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) de la Hep derivatizada, produciendo la formación de un complejo con un enlace disulfuro escindible en la región enlazadora y la liberación del segundo grupo N-hidroxi-succinimida.

Los complejos Hep-HSA se purificaron por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) utilizando medios de Butil-Sefarosa (GE Healthcare, EE.UU.) o ultra/diafiltración. Al final, los complejos Hep-HSA se eluyeron en tampón fosfato salino (PBS) con pH 7,4. Los complejos se nombraron con APAC- con un sufijo que designaba el nivel de conjugación de las cadenas de Hep a HSA.

La fórmula general para los complejos de APAC que ejemplifican la invención es (Hep-NH-CO-CH₂-CH₂-S-S-CH₂-CH₂-CO-NH)_n-HSA

donde la cantidad promedio de cadenas de heparina no fraccionada acopladas a HSA se define como n.

El nivel de conjugación (CL) medio de Hep con HSA se determinó utilizando la concentración de Hep y HSA y sus pesos moleculares promedio con las siguientes ecuaciones:

mol de Hep = [C] Hep/PM medio Hep

mol de HSA = [C] HSA/PM HSA

CL = mol de Hep/mol de HSA

PM Hep = 15.800

PM HSA = 66.472

El PM medio para el polímero de Hep se basa en la información obtenida del fabricante de heparina. El PM de HSA

se basa en ALBU HUMAN, P02768 de UniProtKB/Swiss-Prot, isoforma 1 sin péptido señal y propéptido.

Complejos APAC. Véase la Tabla I.

5 APAC1 tiene un CL medio de 4-6 moles de Hep por 1 mol de HSA.

APAC2 tiene un CL medio de 8-16 moles de Hep por 1 mol de HSA.

En 2010, una primera generación de APAC, es decir, APAC1 se fabricó a escala relativamente grande (1 g) con un
10 CL medio de 6 moles de Hep por 1 mol de HSA (CL 6:1; lote 1.1). APAC1 mostró eficacia tanto anticoagulante como antiplaquetaria *in vitro*. En dos modelos de babuino diferentes de trombosis aguda, mantuvo la permeabilidad vascular y redujo tanto la trombosis como la acumulación de fibrina respecto de un control que fue heparina no fraccionada (HNF), es decir, heparina que no estaba acoplada a HSA. Asimismo, APAC1 radioactivamente marcada (Cu-64) tuvo localización prolongada en el sitio de administración tópica en anastomosis de rata reciente en
15 comparación con el control, es decir, HNF (estudio en IPS Therapeutics, Canadá).

En 2011, una segunda generación de APAC denominada APAC2 (lote 2.1) se fabricó con casi el doble de CL medio (11:1) de Hep a HSA en comparación con APAC1. En comparación con APAC1, APAC2 fue más eficaz en inhibir la agregación plaquetaria inducida por colágeno en plasma rico en plaquetas (PRP) con la misma concentración de
20 heparina. En un modelo de anastomosis de rata, APAC2 marcada con Cu-64 se administró dentro del vaso y fue detectable durante dos veces el tiempo del control de HNF (IPST, Canadá).

En 2012, se fabricó una APAC de tercera generación (esta vez en lotes múltiples 3.1 a 3.6). Se fabricaron seis complejos APAC diferentes (con CL 6:1 a 16:1) a pequeña escala (tamaño de lotes de ~50 mg) para estudiar la
25 reproducibilidad de la reacción de conjugación (CR) propiamente dicha. Estos complejos APAC se denominaron (CR1 a 6) de acuerdo con el orden de fabricación y, por lo tanto, estos nombres no reflejan el CL específico de los productos. Puesto que el protocolo de fabricación se ajustó a la pequeña escala, los cambios correspondientes pueden haber modificado ligeramente las características finales de los productos. Curiosamente y de manera uniforme, los compuestos con mayor CL fueron más eficaces que los de menor CL en inhibir la agregación
30 plaquetaria inducida por colágeno en PRP. Por otra parte, la eficacia anticoagulante pareció más pronunciada con menor CL.

En 2013, se fabricó una cuarta generación de APAC, tanto APAC1 (CL 4:1; lote 4.1) como APAC2 (CL 8:1; lote 4.2).

35 En 2014, se fabricó una quinta generación de APAC, tanto APAC1 (CL 4:1; lote 5.1) como APAC2 (CL 8:1; lote 5.2). El análisis de los lotes de 2014 continúa.

Cuantificación

40 Determinar el CL de los productos APAC ha sido difícil debido a la naturaleza de las moléculas conjugadas, es decir, por tener tanto proteína HSA como restos de heparina altamente sulfatados. La concentración de HSA se determinó con el ensayo de proteínas de ácido bicínico (BCA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce Biotechnology, EE.UU.) En 2013, también se llevó a cabo la medición de UV a 280 nm para validar el ensayo de BCA puesto que el ensayo de BCA parecía sobreestimar la proteína. La Hep (Heparina Leo, Leo Pharma,
45 Dinamarca) se determinó con el ensayo de glicosaminoglicanos sulfatados Blyscan de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Biocolor Ltd., Reino Unido), ensayo Blyscan.

En 2010 y 2012, la Hep se analizó contra el estándar de glicosaminoglicanos (GAG) (condroitín 4-sulfato traqueal bovino). Normalmente, con este estándar de GAG la concentración de Hep se sobreestimaba. Por lo tanto, en 2013
50 se incluyó material de partida heparina como un nuevo estándar para el ensayo Blyscan. Por motivos de rigurosidad y con fines comparativos, se utilizaron tanto GAG como heparina para los análisis posteriores. La determinación del CL fue influenciada por el estándar específico utilizado en el ensayo de heparina (Tabla I) y también por el análisis de HSA. Sin embargo, en todos los estudios donde se han comparado distintas APAC y HNF de control, las concentraciones de Hep se determinaron con el mismo ensayo, ya sea GAG o más recientemente estándar de Hep
55 (ensayo de glicosaminoglicanos sulfatados, kit de ensayo Blyscan, Biocolor Ltd. Reino Unido).

En resumen, las muestras de análisis que se iban a cuantificar se añadieron a tubos de microcentrífuga y se ajustó el volumen a 100 µl usando agua. Con cada ensayo, el estándar de GAG sulfatados de kit de ensayo Blyscan o un estándar de heparina conocido también se procesaron con el intervalo de concentración determinado además de un
60 blanco de reactivo (0 µg; agua o PBS). Para comenzar el ensayo, se agregó 1,0 ml de reactivo de colorante Blyscan

(azul de 1,9-dimetil-metileno en tampón inorgánico) y se mezcló durante al menos 30 min. Los tubos que contenían heparina sulfatada se volvieron morados/rosas. El complejo GAG-colorante resultante se separó del colorante no unido por centrifugación ($>10.000 \times g$ durante 10 minutos). Se descartaron los sobrenadantes y se agregó 1,0 ml de reactivo de disociación Blyscan y se agitó en vórtex. A continuación se analizó la disolución resultante mediante lecturas espectrofotométricas a 656 nm. Los estándares, junto con el blanco de reactivo, se utilizaron para producir una curva de calibración, que se utilizó para determinar la concentración de heparina. Los valores de absorbancia estaban entre 0,05 y 1,5 unidades, las muestras de otro modo se reconstituyeron o diluyeron, respectivamente.

Pesos moleculares

Los pesos moleculares (PM) para las APAC no se han finalizado todavía, y la molaridad de las disoluciones solo se puede aproximar. Los estudios con cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) común y con SEC a alta presión combinada con técnica de conjunto de detectores triples (TDA; con refractómetro, viscosímetro y detectores de dispersión de luz de ángulo izquierdo y derecho) indican, aproximadamente, un aumento de dos veces el PM entre APAC1 (lote 1.1) y APAC2 (lote 2.1).

Evaluación de la función de APAC *in vitro*

Materiales y procedimientos

Toma de muestras de sangre

Se utilizó sangre de donantes sanos que no habían tomado ninguna medicación durante al menos 6-7 días antes de la extracción de sangre. Las muestras se recogieron después de ayuno durante una noche mediante venopunción de la vena antecubital en tubos para extracción de sangre por vacío estándar (0,109 M citrato sódico Vacuette 455322, Greiner Bio-one). La muestra se consideró válida durante 4 horas después de la extracción de sangre.

Plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas

La sangre se centrifugó a $180 \times g$ durante 12 min a 22 grados Celsius para separar plasma rico en plaquetas (PRP). Para la toma de plasma pobre en plaquetas (PPP), la sangre remanente se centrifugó nuevamente a $1.500 \times g$ durante 10 min a 22 grados Celsius. La cantidad de plaquetas (PLT) en PRP se midió con el contador celular Sysmex KX-21 (Sysmex Corporation, Japón) y se ajustó con PPP a $150 \times 10^6 \pm 10\%$ PLT/mL para análisis de trombogramas automatizados calibrados (CAT) y a $300 \times 10^6 \pm 10\%$ PLT/mL para agregación de PRP inducida por agonistas. Para el lote de plasma local, se extrajo sangre de 11 donantes y se centrifugó a $2.000 \times g$ durante 10 min. El PPP se volvió a centrifugar a $10.000 \times g$ durante 10 min para eliminar las plaquetas restantes. Los plasmas se combinaron, y se almacenaron en alícuotas y se congelaron hasta su uso. Para CAT el plasma se centrifugó dos veces.

40 Plasmas

La eficacia de anticoagulación de los complejos APAC y el control con HNF se analizó con concentraciones de heparina iguales (est. de GAG Blyscan). Se utilizaron tres plasmas diferentes: plasma de control de laboratorio, es decir, plasma humano estándar (SHP, Siemens, Alemania), plasma tratado con disolvente/detergente (D/D) (Octaplas, Octapharma, Suiza), y plasma en lotes local (PP, 11 donantes sanos). En este resumen, los resultados en el plasma en lotes local se muestran como ejemplos.

El plasma con antitrombina (AT) agotada (American Diagnostica, EE.UU.) se utilizó para estudiar la eficacia anticoagulante independiente de AT de las APAC y, en un ensayo APTT, de HNF.

50

Coagulación

La heparina une el complejo de antitrombina y trombina (IIa) y potencia la capacidad de la antitrombina de desactivar la trombina y el factor de coagulación Xa y varios otros factores de coagulación en sentido ascendente de las vías intrínseca y extrínseca de coagulación. En contraposición, las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) se unen solo a antitrombina para inhibir casi exclusivamente el factor Xa. El direccionamiento de la trombina requiere longitudes de cadena más largas; necesitando al menos 18 secuencias unitarias de pentasacárido en la heparina. La eficacia anticoagulante de las muestras de plasma con heparina se analiza de manera rutinaria por el tiempo de formación de coágulos de fibrina en PPP, desprovisto de plaquetas y otras células sanguíneas. La heparina está altamente sulfatada y posee una fuerte carga negativa. Por lo tanto, la unión no específica a proteínas plasmáticas

60

circulantes o endotelio vascular puede inducir otras interacciones no abordadas en el presente documento.

Tiempo de trombina

5 En el ensayo de tiempo de trombina (TT) (Reactivo de trombina BC, Siemens, Alemania) el plasma citrado diluido (40 μ L plasma y 100 μ L de trombina BC) se complementa con una dosis elevada estandarizada de trombina (0,8 UI/ml), y el tiempo para la conversión de fibrinógeno a coágulo de fibrina se mide en un coagulómetro (KC-4, Sigma-Amelung, EE.UU).

10 Tiempo de tromboplastina parcial activado

En el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT, reactivo Dade Actin FSL, Siemens, EE.UU.), la formación de coágulos se induce por los factores de coagulación de la vía intrínseca (I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII), representando la activación de contacto y por recalcificación del plasma. En el experimento, 50 μ L de plasma se diluyeron con 50 μ L de Actin FSL (fosfolípidos de soja y de cerebro de conejo en 100 μ M de ácido elálgico) y se recalcificaron con 50 μ L de 25 mM de CaCl_2 . En presencia de una cantidad suficiente de heparina, los TT y APTT empiezan a prolongarse de manera dependiente de la dosis. A nivel clínico, el alcance de la anticoagulación de la heparina administrada por vía intravenosa se supervisa principalmente con APTT. Para alcanzar el nivel terapéutico de anticoagulación, se busca una prolongación de 1,5 a 3 veces respecto de la muestra de control. El ensayo APTT depende del reactivo y el coagulómetro utilizados, pero el intervalo inicial es normalmente 20-40 s.

Trombograma automatizado calibrado

La generación de trombina se utiliza experimentalmente para estimar condiciones asociadas con el riesgo de sangrado o trombosis (Hemker et al. Pathophysiol Haemost Thromb 2002; 32:249-53). Aunque la trombina se forma durante todo el proceso de coagulación, solo 2 a 5 % de la trombina total se necesita para que la fibrina coagule *in vitro*. Por lo tanto, los tiempos de coagulación tradicionales (es decir, TT y APTT) pasan por alto la mayor parte de la actividad de la trombina durante la coagulación, que se puede capturar mediante el procedimiento de Hemker trombograma automatizado calibrado (CAT). CAT evalúa la generación de trombina desencadenada por factor tisular, que se supervisa detectando la división de un sustrato de trombina fluorogénico y comparando en paralelo la muestra con un control que tiene actividad de trombina conocida. Durante la generación de la trombina, los factores tanto anti como pro-coagulantes influyen en las características cuantificables del trombograma. El tiempo de retraso indica el tiempo de formación de coágulos de fibrina reflejando PT (tiempo máximo) (se desencadena con el factor tisular (TF)/APTT (se desencadena con el ácido elálgico). El punto máximo de la curva muestra la tasa máxima de generación de trombina neta y el tiempo para alcanzarlo (tt máximo). El área bajo la curva, es decir, el potencial endógeno de trombina (PET) mide la trombina total formada. En el análisis CAT, la generación de trombina se puede evaluar o bien en PPP citrado o PRP. La trombina se activa en plasma recalcificado desencadenando y complementando las muestras con TF (5 pM) y fosfolípidos (PPL) (4 μ M) (reactivo de PPP, Stago, Francia) o con TF (1 pM, reactivo de PRP, Stago, Francia) para PPP y PRP, respectivamente. El análisis CAT puede detectar las deficiencias o hiperactividad de los factores de coagulación, y el uso de anticoagulantes (como heparinas o inhibidores directos de la trombina), o terapias de reemplazo en caso de trastornos hemorrágicos.

Agregación plaquetaria en PRP

45 La agregación plaquetaria fue estudiada con el procedimiento turbidimétrico de Born (J Physiol 1962; 162:67-68) utilizando el agregómetro Aggram (Helena Laboratories Inc. EE.UU.) a 37 °C con velocidad de barra de agitación de 1.000 r.p.m. Se utilizó colágeno (fibrilos tipo I, Kollagenreagens-Horm, Nycomed Pharma, Austria o colágeno Chronolog, Chronolog Ltd., EE.UU.) como el agonista principal con la concentración final de 0,5 μ g/mL. Antes de inducir la agregación plaquetaria se incubaron las sustancias de prueba durante 2 min con PRP a 22 ° Celsius y durante 1 min a 37 ° Celsius. Cuando procedió, se midieron la agregación máxima a los 5 min (% de cambio de transmisión de luz), pendiente y área bajo la curva.

En todos los ensayos, el valor inicial se midió con el vehículo (PBS, pH 7,4) con el volumen equivalente a las sustancias de prueba. También hemos estudiado otros agonistas; adenosín difosfato (ADP), ristocetina y péptido relacionado con colágeno (CRP). Las APAC no inhiben la agregación plaquetaria inducida por ADP, aunque a concentraciones elevadas inhiben la agregación inducida por ristocetina (los datos no se muestran). La actividad antiplaquetaria de las APAC contra colágeno es el rasgo más destacable de las pruebas de agregación plaquetaria.

Modelos de trombosis aguda en babuinos

60

La eficacia antitrombótica de APAC1 (lote 1.1) y HNF en comparación con el vehículo se estudió en dos modelos muy consolidados de trombosis aguda en babuinos anestesiados. En un modelo de Folts modificado se creó una derivación AV extracorpórea entre la arteria y la vena femoral. El flujo sanguíneo se controló mediante un elemento constrictor ubicado en la arteria y se monitorizó el flujo con una sonda. La arteria se lesionó desde el exterior mediante sujeción cruzada en dos ocasiones durante 10 s con un porta-agujas Martin (Hegar-Baumgartner TC Gold 14 cm). Se ligaron todas las ramificaciones laterales en las proximidades de la lesión. La derivación se perforó con una aguja (26G) 1 cm cerca del acceso vascular para inyectar un bolo (4 mg/mL) de o bien APAC1 o HNF o tampón fosfato salino (PBS). La lesión se trató durante 3 min con la sustancia de estudio antes de exponerla al flujo sanguíneo. Inmediatamente después de recuperar el flujo sanguíneo inicial se colocó un elemento constrictor externo en la lesión y el flujo se redujo a 30-100 mL/min (estenosis de 90 a 30 %). La acumulación de plaquetas en la arteria con estenosis se detectó por el flujo sanguíneo reducido y se registró como reducciones de flujo cíclico (CFR). A 5 mL/min la arteria se consideró ocluida y el trombo se desplazó liberando el elemento constrictor y lavando con tampón fosfato salino (PBS). Después de que se recuperó el flujo sanguíneo inicial se volvió a aplicar estenosis y el experimento se repitió.

En el segundo modelo de babuino, se indujo trombosis colocando injertos de PTFE revestidos con colágeno (2 cm, lumen 4 mm) en una derivación arteriovenosa externa. La superficie trombogénica de colágeno se trató durante 10 min con APAC o HNF (ambas a 4 mg/mL). Se inició el flujo sanguíneo (100 mL/min; 265-1) y se cuantificó la deposición de plaquetas marcadas con Indio-111 y fibrina (acumulación de Yodo-125 fibrinógeno) durante 60 min.

Retención en el sitio de la lesión

Se evaluaron la eficacia, distribución y retención en el sitio de APAC marcada con Cu-64 o HNF (3 mg/kg) mediante obtención de imágenes por PET durante 50 h de anastomosis de arteria femoral parcialmente ligada (2 suturas sueltas con 1 cm de separación) en ratas.

Modelo de lesión por isquemia-reperusión y lesión renal aguda.

Animales. Se utilizaron ratas Sprague Dawley (SD) macho no consanguíneas, libres de patógenos, específicas (Harlan Laboratories; Horst, Países Bajos) con un peso de 235-250 g. Las ratas recibieron alimento común para ratas y agua corriente a voluntad y se mantuvieron en un ciclo de 12 h de claridad/oscuridad. Los animales recibieron cuidado humano acorde con los recursos de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de la Salud y la Oficina para el Cuidado y Uso de Animales de Estados Unidos (Consejo Nacional de Investigación, Washington DC, National Academy Press, 1996).

Recuentos de células sanguíneas y perfil de coagulación. Las ratas SD recibieron APAC2 por vía intravenosa (n=8/grupo) (Lote 2.1; 16 µg, 32 µg o 80 µg o HNF 32 µg (disolución de infusión 5.000 UI/mL; 200 UI/mg; Leo Pharma, Dinamarca) diluida a una concentración apropiada con PBS (10 mM fosfato sódico, 137 mM cloruro sódico, 2,7 mM cloruro potásico a pH 7,4). Las ratas de control recibieron vehículo de solución salina IV. A los 10 minutos las ratas fueron sacrificadas para llevar a cabo recuentos de células sanguíneas y análisis de perfil de coagulación. La primera muestra de sangre se extrajo con una jeringa de 2 mL precargada con anticoagulante de citrato sódico al 3,8 % y se colocó en tubos de ensayo de polipropileno de 3 mL. La segunda muestra se extrajo inmediatamente después con otra jeringa de 2 mL vacía para recoger suero de rata. Las muestras se procesaron por separado para llevar a cabo recuento de células sanguíneas, PPP y plasma así como suero. Los recuentos de células sanguíneas se determinaron en las muestras de sangre citrada con el contador celular Sysmex KX-21. Para PPP la sangre se centrifugó a 1.200 x g durante 15 min (22 °C) para separar leucocitos y eritrocitos. Se tuvo cuidado de no perturbar la capa leucocítica al pipetear el PPP en un nuevo tubo. El PPP se centrifugó una segunda vez a 16.100 x g durante 5 min, después de lo cual se recogió el PPP en un nuevo tubo. El PPP se almacenó a -40 °C si no se usaba inmediatamente.

Modelo de sujeción de arteria renal con clamps. Diez minutos antes o después del inicio de la isquemia caliente según el modelo de estudio, las ratas SD recibieron o bien APAC2 (lote 2.1) 16 µg, 32 µg o 80 µg o HNF 32 µg (disolución de infusión 5.000 UI/mL, 200 mg/UI) (n=8/grupo) por vía intravenosa diluida a la concentración apropiada con PBS. Las ratas de control recibieron vehículo de solución salina IV. Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano por vía inhalatoria y se les practicó una incisión en la línea media del abdomen. Ambas arterias renales se sujetaron con clamps durante 30 o 60 minutos según el modelo de estudio. Después de quitar el clamp, se examinaron los riñones en cuanto a recuperación de flujo sanguíneo, y el abdomen se cerró. Las ratas recibieron 1 mL de PBS y 0,1 mL de buprenorfina (Temgesic 0,3 mg/ml, Schering-Plough, Kenilworth, NJ) para el mantenimiento post-operatorio del equilibrio de fluidos y alivio de dolor, respectivamente.

60

- Evaluación de la función renal y lesión renal aguda. Para la evaluación de la función renal y la lesión renal se recogieron muestras de sangre de vena caudal de rata bajo anestesia los días 1, 2 y 3 después de la lesión renal. El suero se congeló a -20 °C hasta que se llevaron a cabo análisis adicionales de las actividades de creatinina y nitrógeno ureico en la división de química clínica del laboratorio HUSLAB, Hospital Universitario de Helsinki, Helsinki, Finlandia. Como biomarcador para lesión renal aguda se utilizó lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos (LAGN) de rata. Los niveles en suero de LAGN se estimaron mediante el ensayo ELISA utilizando anti-LAGN monoclonal de ratón (ABS 039-08 de BioPorto Diagnostics A/S, Gentofte, Dinamarca) 3 días después de la sujeción de arteria renal bilateral con clamps.
- 10 Inmunohistoquímica. Para la inmunohistoquímica, se cortaron en serie y sobre portaobjetos secciones transversales de 4 mm de grosor, embebidas con parafina o de criostato y se tiñeron con el procedimiento de peroxidasa ABC (kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories). La reacción fue revelada por 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, Vector Laboratories). Para inmunotinción, los especímenes se bloquearon con 20 min de incubación con suero de cabra normal al 1,5 %/PBS, pH 7,40, seguida de incubación con anticuerpos primarios con dilución óptima a temperatura ambiente durante 30 min (anticuerpos monoclonales) o a +4 °C durante 15 horas (anticuerpos policlonales). Los anticuerpos primarios se diluyeron con una disolución de seroalbúmina bovina al 0,1 %/PBS. Después de lavar en PBS, la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con 10 min de incubación con disolución al 0,1 % de peroxidasa de hidrógeno (30 %)/PBS. Con lavados intermedios en PBS, los especímenes se incubaron adicionalmente con anticuerpos biotinilados en el tampón PBS a TA durante 30 min; se detectaron con complejo de rábano picante biotinilado con avidina en el tampón PBS a TA durante 30 minutos y la reacción fue revelada por AEC (Vector Laboratories). Los portaobjetos se contratiñeron con aluminio-hemateína de Mayer. Para determinar la densidad de células positivas, se contaron cuatro campos aleatorios de cada cuadrante de la sección transversal con magnificación de 40 x, y el resultado se proporciona como un total para 1 mm². Los anticuerpos y diluciones utilizados fueron linfocitos T CD8+ (5 mg/mL, 22071D) de BD Pharmingen, San Diego, CA y KIM-1 (8 mg/mL, AF3689) de R&D systems, Abingdon, Reino Unido.

- El hialuronano (HA) se tiñó a partir de secciones de parafina utilizando un complejo de unión de hialuronano bHABC biotinilado específico, que contiene dominio G1 biotinilado de agrecano y proteína de enlace, preparado a partir de cartílago articular bovino, por detección con avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories; dilución 1:200) con 3,3-diaminobencidina (DAB) al 0,05 % (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), como se describe. La especificidad de la tinción se controló con digestión de algunas secciones con hialuronidasa de *Streptomyces* en presencia de inhibidores de proteasa antes de la tinción, o pre-incubando la sonda de bHABP con oligosacáridos de hialuronano. Se sacaron diez fotos con magnificación de 40 x de cada muestra y el área con hialuronano positivo se midió con obtención de imágenes asistida por ordenador (Zeiss Axionvision 4.4, Carl Zeiss International). La superficie promedio de estas 10 mediciones se utilizó en análisis estadísticos. Todos los análisis fueron ciegos y fueron realizados por dos observadores independientes.

- Histología renal. Se llevó a cabo una evaluación semi-cuantitativa de daño histológico de la siguiente forma: Muestras de riñón embebidas con parafina de 2 mm de grosor se tiñeron con hematoxilina y eosina. La gravedad de los siguientes parámetros de lesión tubular (aplanamiento, dilatación, cilindros y necrosis) se midió en una escala de 0 a 3 como sigue: grado 0 = sin daño, grado 1 = daño leve, grado 2 = daño moderado, grado 3 = daño grave, y se representó como una puntuación de lesión tubular global (0-12).

- Estadísticas. Todos los datos son media +/- EEM y se analizaron por SPSS para Windows, versión 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Para una comparación de dos grupos, se aplicaron la prueba U de Mann-Whitney y la prueba T paramétrica de Student. Para una comparación de varios grupos, se aplicaron la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn y la prueba paramétrica ANOVA con corrección de Dunnett. Para la supervivencia, se aplicó el análisis de Kaplan-Meier con prueba de rangos logarítmicos (Mantel-Cox). Se consideró que P<0,05 era significativo desde el punto de vista estadístico.

50 Resultados

Tiempo de trombina

- 55 En la Figura 1 se muestra un ejemplo de medición de TT en lotes de plasma en presencia de complejos APAC (CL 6:1 a 16:1) de 2010 a 2012, y para APAC1 (lote 4.1) y APAC2 (lote 4.2) se muestra en la Figura 2.

Figura 1

- 60 Con 1 µg/mL, todas las APAC prolongaron el TT al menos 1,5 veces, mientras que HNF prolongó el TT 1,3 veces

respecto del valor inicial (30 s). APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) alcanzó el TT máximo (300 s) medido, mientras que APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) prolongó el TT 2,5 veces respecto del valor inicial (Figura 1). APAC-CL6 (6 cadenas de Hep) prolongó el TT 5,5 veces, APAC-CL8, lote 3.2 (8 cadenas de Hep), 5,8 veces y lote 3.1 (8 cadenas de Hep) 4,3 veces, APAC-CL10 (10 cadenas de Hep) 2,4 veces, APAC-CL13 (13 cadenas de Hep) 2,5 veces y APAC-CL16 (16 cadenas de Hep) 3,7 veces respecto del valor inicial (Figura 1). Con 1,5 µg/mL todas las APAC y HNF alcanzaron el tiempo máximo de la medición.

Figura 2

10 APAC1 (lote 4.1, 4 cadenas de Hep) y APAC2 (lote 4.2, 8 cadenas de Hep) prolongaron el TT 2,1 a 2,4 veces, respectivamente (Figura 2). Con 1,25 µg /mL APAC1 (lote 4.1, 4 cadenas de Hep) alcanzó el tiempo máximo (300 s) medido, mientras que APAC2 (lote 4.2, 8 cadenas de Hep) prolongó el TT 3,2 veces (Figura 2).

Tiempo de tromboplastina parcial activado

15

Figura 3

En la Figura 3 se muestra un ejemplo de la medición de APTT en lotes de plasma en presencia de APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep), APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) y APAC con CL 6:1 a 16:1 de los lotes 3.1 a 3.5 (8, 8, 10, 20 13, 16 cadenas de Hep).

En comparación con el valor inicial de APTT (30 s), con 1 µg/mL, APAC1 (lote 1.1) prolongó APTT 1,4 veces, mientras que las otras APAC y HNF prolongaron el APTT 1,1 a 1,2 veces. Con 2 µg/mL APAC1 (lote 1.1) prolongó APTT 2,0 veces, mientras que las otras APAC y HNF mostraron menos prolongación, 1,4 a 1,6 veces. Con 3 µg/mL APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) prolongó el APTT 2,6 veces, APAC-CL8 (lote 3.1 y 3.2, 8 cadenas de Hep) 2,1 veces, APAC-CL10 (lote 3.3, 10 cadenas de Hep) 2,0 veces, APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) 1,9 veces, APAC-CL13 (lote 3.4, 13 cadenas de Hep), APAC-CL16 (lote 3.5, 16 cadenas de Hep) y HNF todas 1,8 veces. Con 6 µg/mL APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) prolongó APTT 6,7 veces, APAC-CL8 (lotes 3.1 y 3.2, 8 cadenas de Hep) 5,4 a 4,7 veces, APAC-CL10 (lote 3.3, 10 cadenas de Hep) 4,5 veces, APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) 4 veces, APAC-CL13 (lote 3.4, 13 cadenas de Hep) 3,8 veces, APAC-CL16 (lote 3.5, 16 cadenas de Hep) 3,6 veces y HNF 3,1 veces. Con 8 µg/mL APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) prolongó el APTT 9,8 veces, APAC-CL8 (lotes 3.1 y 3.2, 8 cadenas de Hep) 9,3 a 8,7 veces, APAC-CL10 (lote 3.3, 10 cadenas de Hep) 7,4 veces, APAC-CL13 (lote 3.4, 13 cadenas de Hep) 6,0 veces, APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) 5,4 veces, APAC-CL16 (lote 3.5, 16 cadenas de Hep) 5,8 veces y HNF 4,2 veces, como mínimo. Con la concentración más elevada utilizada la diferencia en APTT entre APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) y APAC-CL10 (lote 3.3, 10 cadenas de Hep) fue 25 % y entre APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) 45 %. En total, APTT fue normalmente más prolongado en comparación con el valor inicial en presencia de los CL más bajos de las APAC de primera y segunda generación (lotes 1.1 y 2.1, 4 y 11 cadenas de Hep).

40 La cuarta generación de APAC (APAC1 versus APAC2) difirió de los lotes previos en que la prolongación del APTT fue bastante similar, hasta que se utilizó una dosis de Hep más elevada (por encima de 6 µg/mL). Entonces, nuevamente, la anticoagulación se benefició de los CL de acoplamiento inferiores de la heparina. Con 1 µg/mL, APAC1 (lote 4.1, 4 cadenas de Hep) y APAC2 (lote 4.2, 8 cadenas de Hep) prolongaron el APTT 1,2 veces en comparación con el valor inicial (29 s). Con 2 µg/mL APAC1 (lote 4.1) y APAC2 (lote 4.2) prolongaron el APTT de manera similar, 1,4 y 1,3 veces, respectivamente.

Con 3 µg/mL nuevamente APAC1 (lote 4.1) y APAC2 (lote 4.2) prolongaron el APTT de manera similar 1,8 y 1,7 veces, respectivamente. Con 6 µg/mL APAC1 (lote 4.1) y APAC2 (lote 4.2) prolongaron el APTT 3,9 y 3,4 veces, respectivamente. Con 8 µg/mL APAC1 (lote 4.1) y APAC2 (lote 4.2) prolongaron el APTT 7,5 y 6,0 veces, respectivamente. Con la concentración más elevada utilizada, la diferencia en APTT entre APAC1 (lote 4.1) y APAC-2 (lote 4.2) fue 21 %.

Figura 4

55 La acción anticoagulante evaluada por APTT de las APAC con distintos acoplamientos de heparina, CL se muestra en la Figura 4.

Figura 5

60 APTT en presencia de la APAC1 de cuarta generación (lote 4.1, 4 cadenas de Hep) y APAC2 (lote 4.2, 8 cadenas de

Hep) se muestra en la Figura 5.

Trombograma automatizado calibrado (CAT) en PPP

5 Figuras 6-9

El análisis CAT, que se desencadena por el factor tisular (5 pM), el activador de la vía extrínseca, mostró acción anticoagulante con las APAC con concentraciones más bajas de lo necesario para prolongar el APTT. Con una concentración baja de heparina de 0,25-1,5 µg/mL las APAC redujeron el máximo y PET y prolongaron el tt máximo de una manera dependiente de la dosis en los tres plasmas diferentes analizados (PP, SHP y Octaplas). Los trombogramas que representan la influencia de la APAC1 de primera generación (lote 1.1, 4 cadenas de Hep), la APAC2 de segunda generación (lote 2.1, 11 cadenas de Hep), HNF y APAC-CL6 a 16 de tercera generación en lotes de plasma se muestran como ejemplos en las Figuras 7-12. El tiempo o tiempos de retraso, PET (nM), máximo (nM), y tt máximo(s) para APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) y APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) se resumen en la Tabla II y para APAC-CL6 a APAC-CL16 en la Tabla III. Se muestra el cambio relativo (%) de los valores en comparación con el control con vehículo. Si la generación de trombina se inhibió por completo, el tiempo o tiempos de retraso, PET (nM), Máximo (nM), tt máximo(s) se expresan como 0.

En comparación con HNF, el tiempo de retraso y tt máximo fueron claramente prolongados por todas las APAC con todas las concentraciones analizadas. El PET fue reducido por las APAC en comparación con HNF con todas las concentraciones salvo para APAC-CL6 (lote 3.6, 6 cadenas de Hep) con 1,0 µg/mL donde el PET fue similar al de HNF. El máximo fue reducido por las APAC en comparación con HNF con todas las concentraciones, salvo para APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) con 1,0 µg/mL donde el valor máximo fue similar al de HNF. La generación de trombina fue completamente anulada con las APAC con 1,5 µg/mL, salvo para APAC-CL6 (lote 3.6, 6 cadenas de Hep), que mostró 15 % del valor máximo inicial. En líneas generales, APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) y APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) tenía inhibición de generación de trombina relativamente similar. En la tercera generación, las APAC con CL 13:1 y 16:1 fueron inhibidores más potentes que las APAC con CL <10.

Trombograma automatizado calibrado en PRP

30

Figuras 10-12

Estas figuras analizan la generación de trombina dependiente de plaquetas, es decir, la actividad procoagulante (para estimar el riesgo de sangrado o trombosis), y muestran que las APAC inhiben la generación de trombina. En presencia de plaquetas, se utilizó un desencadenante de TF bajo (1 pM), y por ende la generación de trombina también fue inferior que en el análisis CAT de plasma con PPL añadido. Con una concentración baja de Hep de 0,25-1,5 µg/mL, las APAC redujeron el máximo y el PET y prolongaron el tt máximo de una manera dependiente de la dosis en PRP de donantes sanos individuales analizados.

Los trombogramas que representan la influencia de la concentración de HNF en la Figura 10, la APAC1 de primera generación (lote 1.1, 4 cadenas de Hep), la APAC2 de segunda generación (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) en la Figura 11, y la APAC1 de cuarta generación (lote 4.1, 4 cadenas de Hep) y APAC2 (lote 4.2, 8 cadenas de Hep) en la Figura 12 se muestran como ejemplos utilizando las concentraciones seleccionadas que reflejan el resultado de los estudios. Con 0,5 µg/mL las APAC fueron al menos dos veces más potentes como inhibidores de generación de trombina que HNF. Las APAC con CL 8:1 y 11:1 fueron inhibidores más potentes de actividad plaquetaria-procoagulante y redujeron el máximo y el tt máximo más que las APAC con CL 6:1. Con 1,0 µg/mL la diferencia en eficacia respecto de HNF fue incluso más pronunciada para todas las APAC.

En resumen, la generación de trombina se retrasó y la actividad plaquetaria se inhibió claramente con las APAC en comparación con HNF. Cuanto mayor era el número de cadenas de heparina conjugadas más potente era la inhibición.

Agregación plaquetaria inducida por colágeno

Figuras 13-14. Curvas de agregación representativas en donantes con susceptibilidad elevada (50 % de donantes), moderada (30 % de donante) y baja a las APAC (Figura 13) y análisis de respuesta a dosis por lotes de APAC1 en un respondedor alto y moderado (Figura 14).

Figura 13. Las APAC APAC-CL6 a CL16 (con [C] Hep 1; 3; 10; 30 y 90 µg/mL) fueron analizadas en PRP anticoagulado con citrato de 3 donantes independientes, cada uno con una susceptibilidad diferente (definida como

% de inhibición con concentración de heparina de 30 µg/mL (DE50 global): respondedor alto >60 %, bajo <40 % y moderado 40-60 % a APAC en agregación plaquetaria inducida por colágeno (col; 0,5 µg/mL). Se detectaron los resultados de % de agregación máxima y pendiente de la curva (velocidad de agregación) a los 6 min.

- 5 Las APAC-CL6 a APAC-CL16 (8, 8, 10, 13, 16 y 6 cadenas de Hep) y APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) redujeron la velocidad y la agregación plaquetaria máxima, mientras que HNF no lo consiguió. Las APAC con CL de acoplamiento más elevado de 11 a 16:1 fueron inhibidores más potentes que las moléculas con CL inferior de 6 a 10:1. Los resultados con 1, 10 y 30 µg/mL con el respondedor bajo se presentan en la Figura 13 para APAC-CL6 a APAC-CL16. Las curvas de agregación (relacionadas con la velocidad de agregación) disminuyeron de manera dependiente de la dosis con todas las variantes de APAC, aunque la agregación máxima fue menos afectada. APAC-CL16 (lote 3.5, 16 cadenas de Hep) fue el mejor inhibidor en este respondedor bajo (donante 2) y redujo el % de agregación máxima de 92 a 38 %.

- Figura 14. APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) inhibió 90 % de la agregación plaquetaria máxima con 10 µg/mL en un PRP de respondedor alto, mientras que se requirieron 90 µg/mL para inhibir 75 % de la agregación en un PRP de respondedor moderado. Se presentan los resultados con 3; 10; 30; 60 y 90 µg/mL de APAC1 con los respondedores alto y moderado.

Modelos agudos de trombosis en babuinos

- 20 Figuras 15-16

- En el modelo de trombosis aguda en babuinos se administró APAC y HNF de forma local en la lesión a 4 mg/mL (Figura 15). En presencia de HNF la arteria se ocluyó repetidamente (5 CFR/27 min) con una velocidad de flujo de 100 mL/min (estenosis provocada a 30 %). En contraposición, APAC1 (lote 1.1, 4 cadenas de Hep) inhibió de manera eficaz la formación de trombos hasta que el experimento fue interrumpido, después del tiempo de seguimiento de 120 min. Al final del experimento, en el punto de tiempo 180 min, se volvió a provocar estenosis de la arteria a 50 mL/min (60 % estenosis) y finalmente a 30 mL/min (90 % estenosis) mientras que la APAC continuó inhibiendo la oclusión durante los periodos de prueba seleccionados (10 y 15 min, respectivamente). En los experimentos de control con HNF y tampón fosfato salino (PBS) a continuación se produjeron CFR repetitivos (no se muestran los resultados). En el modelo de trombosis de babuino en el injerto de colágeno extracorpóreo (Figura 16), APAC1 redujo la deposición plaquetaria en colágeno en 34 ± 13 % (media y DE, $n=4$, $p=0,01$) en comparación con HNF. La propagación distal del trombo también disminuyó en 63 ± 11 % ($n=4$, $p=0,19$). Los resultados con HNF fueron similares a los valores de control sin tratamiento ($n=21$). La acumulación de fibrina fue reducida por APAC1 (45 ± 14 %), pero no por HNF ($1,1 \pm 0,1$ %, $n=4$, $p=0,01$).

- En consonancia con el potencial de retención fuerte y la baja degradación se detectó mediante PET una APAC no degradada en los sitios de anastomosis en ratas durante más de 50 h (-120 h), mientras que HNF ya no era detectable después de 24 h ($n=2$). Cerca de 10 % de la APAC se unió directamente al sitio de aplicación vascular. Tanto APAC como HNF se eliminaron por vía urinaria.

Modelo de lesión por isquemia-reperfusión y lesión renal aguda.

Figuras 17-20

- 45 En particular, si bien se ha demostrado una lesión por isquemia-reperfusión en un modelo de lesión renal aguda, los productos terapéuticos de la invención se pueden utilizar en relación con cualquier otra lesión por reperfusión y de este modo servirían para prevenir, mejorar o tratar dichas lesiones como, por ejemplo, infarto de miocardio o accidente cerebrovascular o enfermedad oclusiva arterial periférica o isquemia mesentérica.

- 50 Se analizó la recuperación de la función renal a partir de LIR. Las dosis de 16 o 32 µg de APAC2 (lote 2.1, 11 cadenas de Hep) se basaron en análisis hematológicos en la rata. Un intervalo de dosis clínicamente relevante de APAC2 y dosis clínicas comparativas de HNF se basaron en modelos de animales previos. La dosis relacionada con la eficacia anticoagulante de APAC2 y HNF se mostró después de una inyección intravenosa (IV) a los 10 min por APTT (Figura 17), donde HNF prolongó el APTT 3 veces más que APAC2 con la dosis más elevada (80 µg). Las ratas SD fueron tratadas con o bien vehículo de solución salina (IV) o APAC2 16 o 32 µg 10 minutos antes de que ambas arterias renales fueran sujetadas con clamps durante 30 minutos. Para estimar la función renal después de la isquemia, se recogieron suero y plasma de rata durante 3 días después de la reperfusión. En las ratas tratadas con APAC2 32 µg, se redujeron los niveles de creatinina (** $P<0,01$, Figura 18A) y nitrógeno ureico (** $P<0,01$, Figura 18B) en suero, en comparación con las ratas tratadas con vehículo. El análisis ELISA de niveles en suero de

lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos (LAGN), un biomarcador de lesión renal, mostró que el pretratamiento con APAC2 32 µg también redujo la lesión tubulointersticial (** $P < 0,01$, Figura 18C).

5 El pretratamiento con APAC2 disminuyó la expresión del ligando de inmunidad innata hialuronano (HA) asociada a riesgo de infiltración celular inflamatoria en un modelo de sujeción de arteria renal bilateral con clamps de 30 min. Los riñones derechos se extirparon 3 días después de la reperfusión. La densidad del marcador de lesión tubulointersticial Kim-1 indicó que la cantidad de túbulos inmunorreactivos lesionados fue significativamente reducida en los riñones de ratas pretratadas con APAC2 32 µg en comparación con los de las ratas tratadas con vehículo (* $P < 0,05$, Figura 19B). Puesto que LIR induce acumulación cortical renal de un ligando de inmunidad innata

10 hialuronano (HA), analizamos el efecto del pretratamiento con APAC2 en la expresión de proteína HA después de LIR. En los riñones sometidos a isquemia caliente de 30 min y 3 días de reperfusión, el pretratamiento con APAC2 32 µg redujo significativamente el área inmunoreactiva a HA, en comparación con los riñones tratados con vehículo (* $P < 0,05$, Figura 19A).

15 La evaluación semi-cuantitativa de lesión tubular que comprende análisis de dilatación tubular, necrosis epitelial, aplanamiento y cilindros reveló lesión tubular grave en los riñones tratados con vehículos a los 3 días (Figura 19). El pretratamiento con APAC2 tanto con 16 como con 32 µg redujo la puntuación de lesión tubular total puesto que solo se observó dilatación tubular y aplanamiento leves del epitelio en secciones transversales tubulares aisladas (* $P < 0,05$, Figura 19).

20 El pretratamiento con APAC previene la lesión renal aguda en un modelo de sujeción de arteria renal bilateral con clamps de una hora.

Finalmente, estudiamos el efecto del pretratamiento con APAC (lote 2.1, 11 cadenas de heparina) en un modelo de

25 LIR grave casi irreversible. Ambas arterias renales se sujetaron con clamps durante una hora. Las ratas SD recibieron o bien vehículo de solución salina (IV) o 32 µg (IV) 10 min antes de la inducción de isquemia caliente. La supervivencia de las ratas fue 75 % (6 de 8) en las tratadas con vehículo y 100 % (8 de 8) en el grupo de APAC2 32 µg (* $P < 0,05$, Figura 20 A).

30 A continuación analizamos la función renal con mediciones de creatinina y nitrógeno ureico en suero. El pretratamiento con APAC2 redujo los niveles de creatinina y nitrógeno ureico en suero, en comparación con los riñones tratados con vehículo (línea discontinua roja, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$, Figura 20 B & C).

Tiempo de trombina y tiempo de tromboplastina parcial activado en plasma con antitrombina agotada.

35 En las Figuras 21 y 22 se muestra un ejemplo de medición de TT y APTT en plasma con AT agotada en presencia de APAC1 (lote 5.1, 4 cadenas de Hep) y APAC2 (lote 5.2, 8 cadenas de Hep), respectivamente. La concentración de heparina se determina con material de partida heparina como estándar.

40 Figura 21

Con 1 µg/mL, APAC1 (lote 5.1, 4 cadenas de Hep) prolongó el TT al menos 2 veces respecto del valor inicial, y con 2 µg/mL el TT alcanzó el máximo tiempo medido (250 s). Con 2 µg/mL APAC2 (lote 5.2, 8 cadenas de Hep) prolongó el TT 4,6 veces respecto del valor inicial (Figura 21).

45 Figura 22

Con 4 µg/mL, todas las APAC1 (lote 5.1, 4 cadenas de Hep) prolongaron el TT 1,4 veces respecto del valor inicial, y con 5 µg/mL, 1,7 veces. Con 4 µg/mL APAC2 (lote 5.2, 8 cadenas de Hep) prolongó el TT 1,9 veces respecto del

50 valor inicial (Figura 22). Con 4 µg/mL HNF prolongó el APTT 1,5 veces respecto del valor inicial.

Conclusiones del nivel de conjugación (CL) de Hep y su asociación con los efectos anticoagulante y antiplaquetario

Todas las variantes expresan acciones duales anticoagulante y antiplaquetaria (agregación inducida por colágeno y

55 actividad procoagulante plaquetaria).

Las APAC con CL 6-16:1 comparten las siguientes propiedades anticoagulantes:

- (Concentración de Hep estimada sobre estándar de GAG Blyscan)

60

- Prolongación de APTT de manera similar a HNF con dosis clínicas (aproximadamente 3 µg/mL)
- Prolongación de APTT más eficaz que HNF con dosis clínicas elevadas (aproximadamente 6-8 µg/mL)

5 • Las APAC con Hep CL 6:1 parecen ser anticoagulantes más potentes que las APAC con CL ≥ 8:1, en especial con concentraciones elevadas.

10 • La generación de trombina en análisis CAT fue demorada y reducida tanto en PPP como en PRP con concentraciones más bajas de lo necesario para prolongación de APTT (1,0 µg/mL) al menos tan eficazmente como HNF

- Las APAC con CL ≥ 8:1 parecen más potentes al inhibir la generación de trombina en PRP que las especies con CL más bajo

15 • Las APAC tienen propiedades antiplaquetarias:

- Reducen la velocidad y agregación plaquetaria máxima inducida por colágeno en PRP citrado, mientras que HNF no lo consigue

20 • Las APAC con CL (8-16:1) son inhibidores uniformemente más potentes de agregación plaquetaria inducida por colágeno que las moléculas con CL 4-6:1

Las APAC con

25 CL ≤ 6:1 prolongan el TT más que las APAC con CL ≥ 8

CL ≤ 6:1 prolongan el APTT más que las APAC con CL ≥ 8

CL ≥ 8:1 inhiben la generación de trombina en análisis CAT en especial en PRP más que la APAC con CL 4-6:1

30

CL ≥ 8:1 inhiben la agregación de PRP inducida por colágeno más que la APAC con CL 4-6:1

En general la inhibición de tanto la agregación plaquetaria como la actividad procoagulante plaquetaria se benefician de la gran cantidad de cadenas de heparina conjugadas con HSA.

35

Tabla I. APAC y nivel de conjugación de Hep con HSA.

Se utilizaron dos procedimientos distintos para analizar la [C] Hep para determinar el nivel de conjugación (CL) con HSA, es decir mol de Hep por mol de HSA:

40

1. Material de partida Heparina (est. Hep); y
2. Estándar de glicosaminoglicanos (est. GAG)

45 [C] HSA se midió con el ensayo BCA.

CL	CL					Fabricante
est. Hep BCA	est. GAG BCA	Identificación	Sobrenombre	Lote	Año	Solvias GmbH, Suiza
4	8	APAC1	APL001	1.1	2010	Informe L09--1647-201-125

ES 2 700 883 T3

11	17	APAC2	APL00X Fracción A	2.1	2011	N11-02672- Informe_20110623
8	12	APAC-CL8	CR1	3.1	2012	N11-13045A_REP_01
8	11	APAC-CL8	CR2	3.2	2012	N11-13045A_REP_01
10	14	APAC-CL10	CR3	3.3	2012	N11-13045A_REP_01
13	20	APAC-CL13	CR4	3.4	2012	N11-13045A_REP_01
16	26	APAC-CL16	CR5	3.5	2012	N11-13045A_REP_01
6	8	APAC-CL6	CR6	3.6	2012	N11-13045A_REP_01
4	7,5	APAC1	APL001	4.1	2013	N11-1210326_REP_01
8	15	APAC2	APL00X	4.2	2013	N11-1210326_REP_01
4	n.d.	APAC1	APL001	5.1	2014	N14-10639_REP_01
8	n.d.	APAC2	APL00X	5.2	2014	N14-10639_REP_01

Tabla II. Generación de trombina en CAT en presencia de la APAC1 de primera generación (lote 1.1), la APAC2 de segunda generación (lote 2.1), HNF y PBS en lotes de plasma (PP) desencadenada con 5 µM de TF y 4 µM de fosfolípidos (PPL). La concentración de Hep se estima con Blyscan (est. GAG) en el ensayo.

5

	Conc. Hep					% cambio respecto de vehículo control			
						µg/mL	Tiempo de retraso	PET	Máximo tt máximo
PP		2,7	1.144,5	160,8	6,7				
HNF	0,25	2,3	1.190	185,1	6,0	-12,4	4,9	7,6	-2,8
APAC1 (lote 1.1)	0,25	3,3	1.001,5	92,7	8,8	25,2	-11,7	-46,1	43,3
APAC2 (lote 2.1)	0,25	4,2	1.022	90,7	10,2	56,4	-9,9	-47,3	64,8
HNF	0,5	2,3	1.000,5	122,4	6,3	-12,4	-11,8	-28,9	2,6
APAC1 (lote 1.1)	0,5	7,0	691	42,7	19,0	163,2	-39,1	-75,2	208,3
APAC2 (lote 2.1)	0,5	8,3	775,5	56,8	18,9	213,5	-31,6	-67,0	205,7

ES 2 700 883 T3

HNF	1,0	3,0	650	39,1	8,8	12,4	-42,7	-77,3	43,3
APAC1 (lote 1.1)	1,0	17,5	427	25,5	31,4	558,6	-62,3	-85,2	408,6
APAC2 (lote 2.1)	1,0	17,0	601	42,7	28,4	539,8	-47,0	-75,2	359,8
HNF	1,5	3,8	343	17,0	15,7	44,0	-69,8	-90,1	154,1
APAC1 (lote 1.1)	1,5	34,6	0	0,8	49,1	1.198,9	-	-99,5	695,5
APAC2 (lote 2.1)	1,5	0,0	0	0,0	0,0	-	-	-	-
PBS	0	2,7	1.134	172,1	6,2	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla III. Generación de trombina en CAT en presencia de APAC-CL6 a APAC-CL16 y PBS en lotes de plasma (PP) desencadenada con 5 pM de TF y 4 µM de PPL. La concentración de Hep se estima con Blyscan (est. GAG) .

	Conc. Hep	Tiempo de retraso	PET	Máx.	tt máximo	% cambio respecto de control con vehículo			
	µg/mL					Tiempo de retraso	PET	Máx.	tt máximo
PP		2,7	1.123,0	152,7	6,8				
APAC-CL8 (lote 3.1)	0,25	3,5	1.059,0	102,1	9,2	16,7	2,1	-35,6	44,9
APAC-CL8 (lote 3.2)	0,25	3,5	973,5	94,7	9,0	16,7	-6,2	-40,3	42,2
APAC-CL10 (lote 3.3)	0,25	3,5	1.049,5	103,1	9,2	16,7	1,2	-35,0	44,9
APAC-CL13 (lote 3.4)	0,25	3,8	1.018,0	95,7	9,8	27,7	-1,9	-39,7	55,3
APAC-CL16 (lote 3.5)	0,25	4,2	995,5	88,3	10,2	39,0	-4,0	-44,3	60,7
APAC-CL6 (lote 3.6)	0,25	3,2	1.064,5	117,8	7,8	5,7	2,6	-25,8	23,7

ES 2 700 883 T3

	Conc. Hep	Tiempo de retraso				% cambio respecto de control con vehículo			
	µg/mL		PET	Máx.	tt máximo	Tiempo de retraso	PET	Máximo	tt máximo
APAC-CL8 (lote 3.1)	0,5	5,5	819,0	55,9	15,8	83,3	-21,1	-64,8	150,1
APAC-CL8 (lote 3.2)	0,5	5,3	829,0	59,7	15,5	77,7	-20,1	-62,4	144,9
APAC-CL10 (lote 3.3)	0,5	5,5	871,5	61,4	15,8	83,3	-16,0	-61,3	150,1
APAC-CL13 (lote 3.4)	0,5	5,7	892,5	64,3	15,7	89,0	-14,0	-59,5	147,6
APAC-CL16 (lote 3.5)	0,5	6,8	826,5	60,9	16,8	127,7	-20,3	-61,6	165,9
APAC-CL6 (lote 3.6)	0,5	4,2	928,5	70,0	11,2	39,0	-10,5	-55,9	76,5
APAC-CL8 (lote 3.1)	1,0	16,2	527,0	33,2	29,0	439,0	-49,2	-79,1	358,1
APAC-CL8 (lote 3.2)	1,0	16,3	514,0	31,3	29,8	444,3	-50,5	-80,3	371,2
APAC-CL10 (lote 3.3)	1,0	20,8	473,5	29,2	34,0	594,3	-54,4	-81,6	437,1
APAC-CL13 (lote 3.4)	1,0	22,2	507,5	32,1	34,8	639,0	-51,1	-79,8	450,2
APAC-CL16 (lote 3.5)	1,0	25,3	0,0	40,0	38,3	744,3	-100,0	-74,8	505,5
APAC-CL6 (lote 3.6)	1,0	9,2	648,5	39,9	22,0	205,7	-37,5	-74,8	247,6
APAC-CL8 (lote 3.1)	1,5	19,5	0,0	0,4	31,5	550,0	-	-99,7	397,6

ES 2 700 883 T3

	Conc. Hep	Tiempo de retraso				% cambio respecto de control con vehículo			
	µg/mL		PET	Máx.	tt máximo	Tiempo de retraso	PET	Máximo	tt máximo
APAC-CL8 (lote 3.2)	1,5	48,3	0,0	3,7	58,2	1511,0	-	-97,7	819,0
APAC-CL10 (lote 3.3)	1,5	49,5	0,0	1,5	56,8	1.550,0	-	-99,0	797,8
APAC-CL13 (lote 3.4)	1,5	21,5	0,0	0,5	25,7	616,7	-	-99,7	305,5
APAC-CL16 (lote 3.5)	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-
APAC-CL6 (lote 3.6)	1,5	26,3	0,0	25,3	42,0	777,7	-	-84,1	563,5
PBS	0	3,0	1.037,5	158,6	6,3	0	0	0	0

REIVINDICACIONES

1. Una molécula antitrombótica que tiene actividad antiplaquetaria y anticoagulante (APAC) que comprende una proteína plasmática humana a la cual se une, mediante una pluralidad de moléculas enlazadoras, una pluralidad de cadenas de heparina teniendo cada una un PM entre 10-21 KDa y además donde la cantidad de dichas cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática se selecciona de entre el grupo compuesto por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y 16.
2. La molécula antitrombótica de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicha molécula tiene acción dirigida y de este modo se retiene en el sitio de aplicación durante más de 24 horas, 48 horas, 50 horas o hasta 120 horas.
3. La molécula antitrombótica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 donde dicha proteína plasmática se selecciona de entre el grupo que comprende o que está compuesto por: una albúmina, una globulina, un fibrinógeno, seroalbúmina y alfa-2 macroglobulina.
4. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde dicha heparina es heparina no fraccionada.
5. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde dicha heparina proviene de un mamífero.
6. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 donde dicha heparina es humana o porcina o bovina.
7. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 donde dicha molécula enlazadora, al menos cuando el enlace de dicha heparina a dicha proteína plasmática es completo, es una molécula enlazadora única que se une a una molécula de heparina.
8. La molécula antitrombótica de acuerdo con la reivindicación 7 donde dicha molécula enlazadora es un enlazador de aminas y de este modo se enlaza a grupos amino en dicha heparina y proteína plasmática.
9. La molécula antitrombótica de acuerdo con la reivindicación 8 donde dicho enlazador conjuga dicha heparina y proteína plasmática mediante el uso de puentes disulfuro.
10. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9 donde dicho enlazador es éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-(2-piridilditio)propiónico (SPDP) o di-(éster de N-hidroxisuccinimida) de ácido 3,3'-ditiodipropiónico (DTSP).
11. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 donde la fórmula genérica de dicha molécula es la siguiente:
 (Hep-enlazador)_n-PIPr
 donde n=4-16;
 PIPr es una proteína plasmática tal como seroalbúmina humana o alfa-2 macroglobulina humana; y
 cada cadena de heparina (Hep) tiene un peso molecular de alrededor de 10-21 KD.
12. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 donde la fórmula genérica de dicha molécula es la siguiente:
 (Hep-NH-CO-CH²-CH²-S-S-CH²-CH²-CO-NH)ⁿ-PIPr
 donde n=4-16;
 PIPr es una proteína plasmática tal como seroalbúmina humana o alfa-2 macroglobulina humana; y
 cada cadena de heparina (Hep) tiene un peso molecular de alrededor de 10-21 KD.

13. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 donde dicha molécula APAC tiene 4, 5 o 6 cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática.
- 5 14. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 donde dicha molécula APAC tiene 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática.
15. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 donde dicha molécula APAC tiene 7 cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática.
- 10 16. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 donde cada una de dichas cadenas de heparina tiene un PM seleccionado de entre el grupo compuesto por 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21 KDa.
- 15 17. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 donde dicha heparina es recombinante.
18. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-17 donde dicha proteína plasmática es recombinante.
- 20 19. Una molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 para su uso como un medicamento.
20. La molécula antitrombótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 para uso en el
- 25 tratamiento de la trombosis.
21. La molécula antitrombótica para uso como medicamento o para uso en el tratamiento de la trombosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20 donde dicha APAC es de acción local.
- 30 22. La molécula antitrombótica para uso como medicamento o para uso en el tratamiento de la trombosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19-22 donde dicha molécula APAC tiene 4, 5 o 6 cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática, mediante dichos enlazadores, y dicha molécula se utiliza predominantemente, o en gran medida, como anticoagulante.
- 35 23. La molécula antitrombótica para uso como medicamento o para uso en el tratamiento de la trombosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19-22 donde dicha molécula APAC tiene 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 cadenas de heparina unidas a dicha proteína plasmática, mediante dichos enlazadores, y dicha molécula se utiliza predominantemente, o en gran medida, como producto terapéutico antiplaquetario/inhibidor plaquetario.
- 40 24. La molécula antitrombótica para uso como medicamento o para uso en el tratamiento de la trombosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19-23 donde dicha APAC se utiliza para tratar o prevenir complicaciones tromboticas, tales como las asociadas con la ruptura endógena de una placa ateromatosa; o terapia trombolítica para prevenir reoclusión; o angioplastia exógena; o cirugía vascular o microvascular; o intervenciones arteriales tales como angioplastia, en particular, angioplastia (coronaria) transluminal percutánea con o sin
- 45 colocación de stents; o arterectomía (direccional); o tromboendarterectomía periférica o pulmonar; o trombosis arterial derivada de plaquetas; o lesiones vasculares o microvasculares; o púrpura trombocitopénica trombótica o intervenciones exógenas, tales como inserción y mantenimiento de fistula arterio-venosa o injertos arterio-venosos; o el uso de catéteres, o deficiencia de antitrombina (AT) o trombosis arterial derivada de plaquetas; o lesiones vasculares o microvasculares.
- 50 25. La molécula antitrombótica para uso como medicamento o para uso en el tratamiento de la trombosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19-24 donde dicha molécula APAC se utiliza para tratar o prevenir lesión por isquemia-reperfusión o lesión renal aguda o infarto de miocardio o accidente cerebrovascular o enfermedad oclusiva arterial periférica o isquemia mesentérica.
- 55 26. Un procedimiento para la fabricación de una molécula antitrombótica que tiene actividad tanto antiplaquetaria como anticoagulante (APAC) que comprende:
- iv) modificar una cadena de heparina (Hep) no fraccionada para producir un producto de reactivo que tiene un grupo
- 60 sulfhidrilo (-SH);

v) modificar una proteína plasmática humana para producir un producto de reactivo que tiene un grupo piridil ditiol (-PDP); y

5 vi) enlazar el producto de reactivo de i) con el producto de reactivo de ii) utilizando un agente de reticulación heterobifuncional.

27. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26 donde dicho enlazador es éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-(2-piridilditio)propiónico SPDP.

10

28. Un procedimiento para la fabricación de una molécula antitrombótica que tiene actividad tanto antiplaquetaria como anticoagulante (APAC) que comprende:

i) modificar una cadena de heparina (Hep) no fraccionada para producir un producto de reactivo que tiene un grupo éster de N-hidroxisuccinimida (-NHS);

15

ii) enlazar el producto de reactivo de i) con una proteína plasmática humana, tal como seroalbúmina, que contiene aminas primarias utilizando un agente de reticulación homo bi-funcional.

29. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28 donde dicho enlazador es di(éster de N-hidroxisuccinimida) de ácido 3-3'ditiodipropiónico (DTSP).

20

30. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26-28 donde dicha molécula antitrombótica se purifica mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) o ultra/diafiltración.

31. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26-30 donde dicha proteína plasmática se selecciona de entre el grupo que comprende o que está compuesto por: una albúmina, una globulina, un fibrinógeno, seroalbúmina y alfa-2 macroglobulina.

25

32. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31 donde dicha proteína plasmática es seroalbúmina o alfa-2 macroglobulina.

30

33. Una molécula antitrombótica que tiene actividad tanto antiplaquetaria como anticoagulante (APAC) preparada de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26-32.

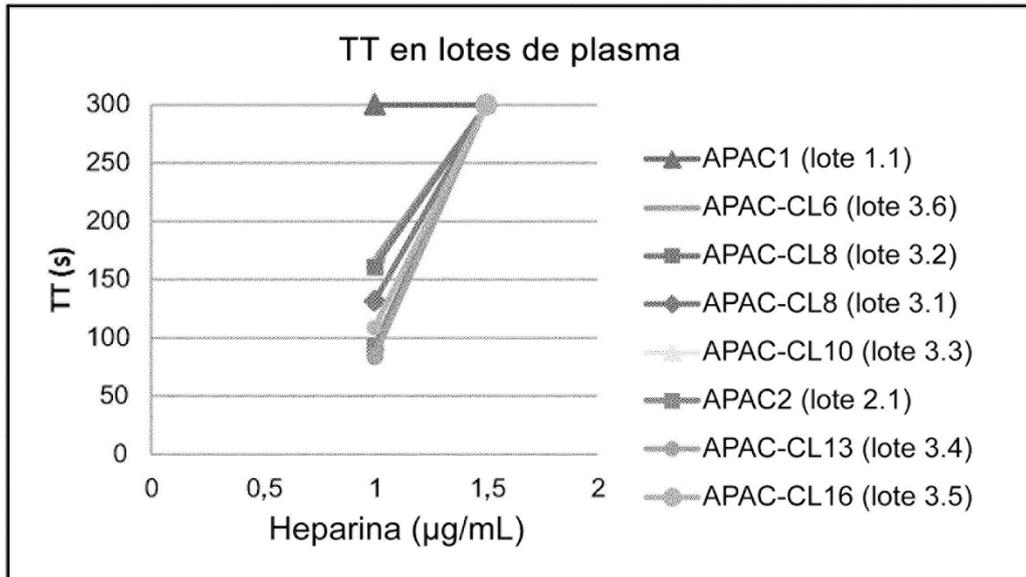


Figura 1

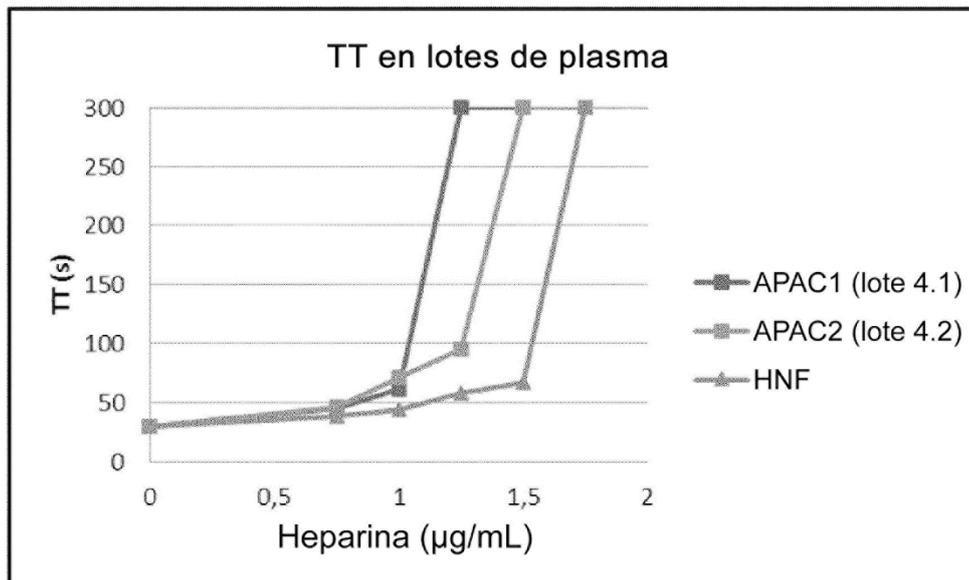


Figura 2

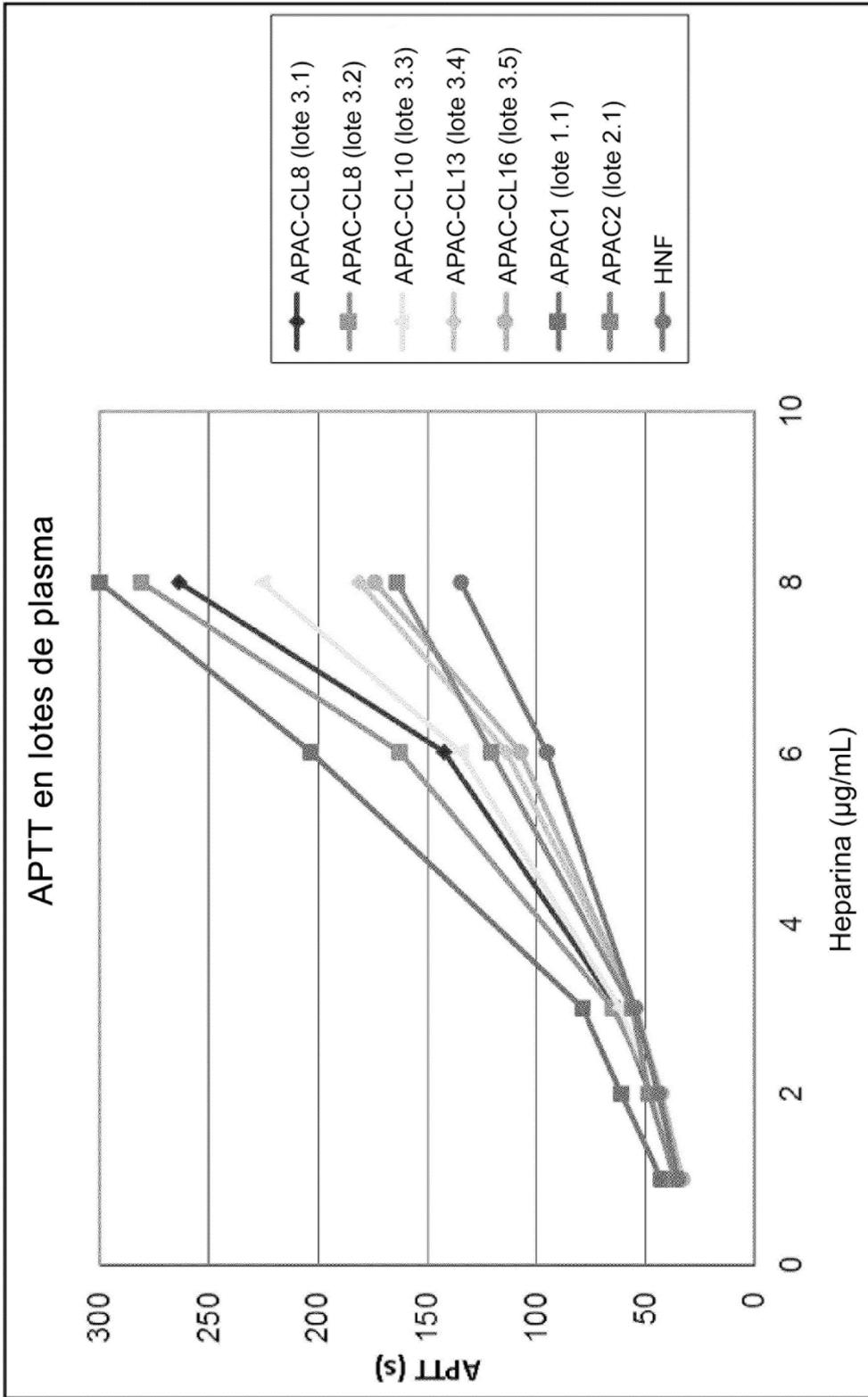


Figura 3

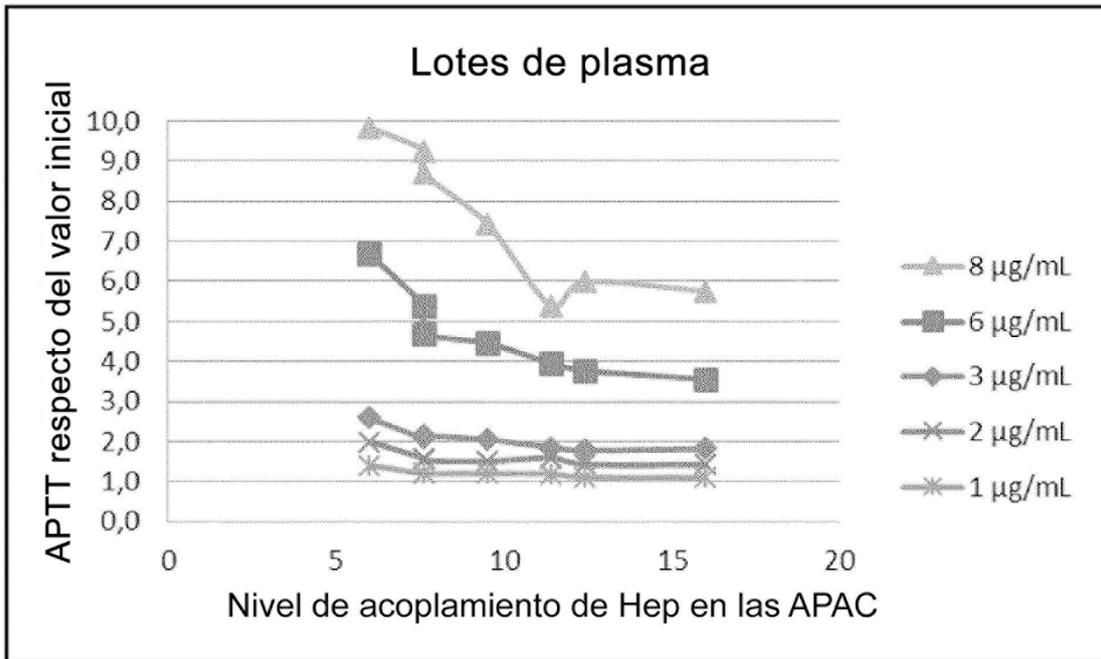


Figura 4

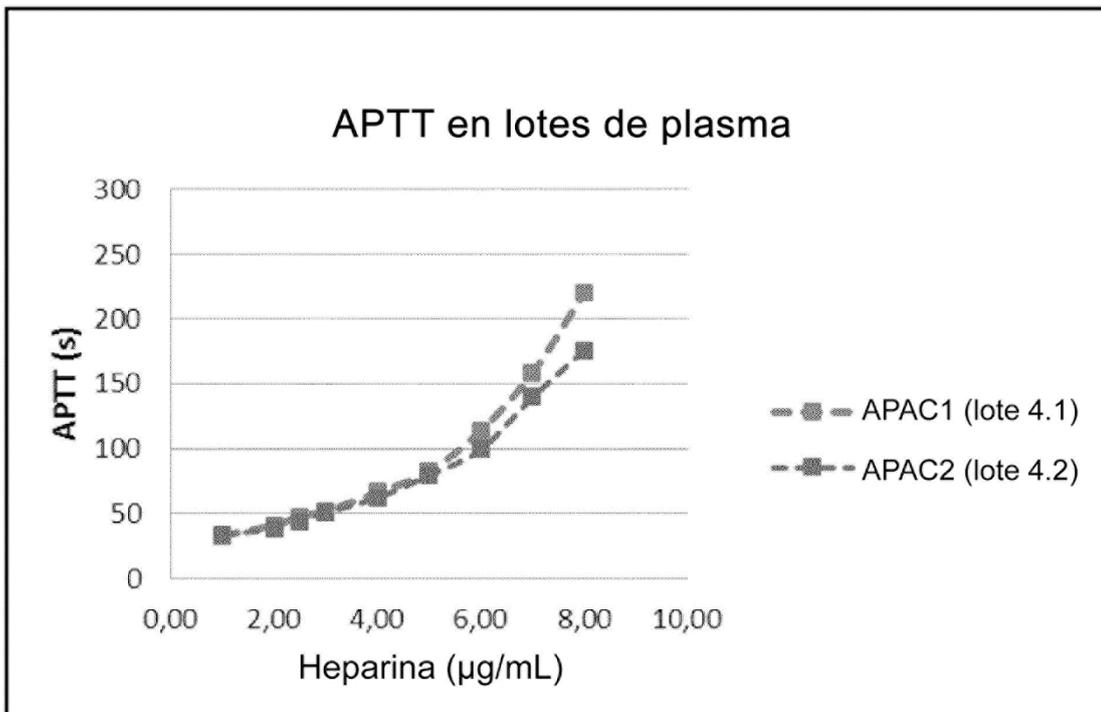
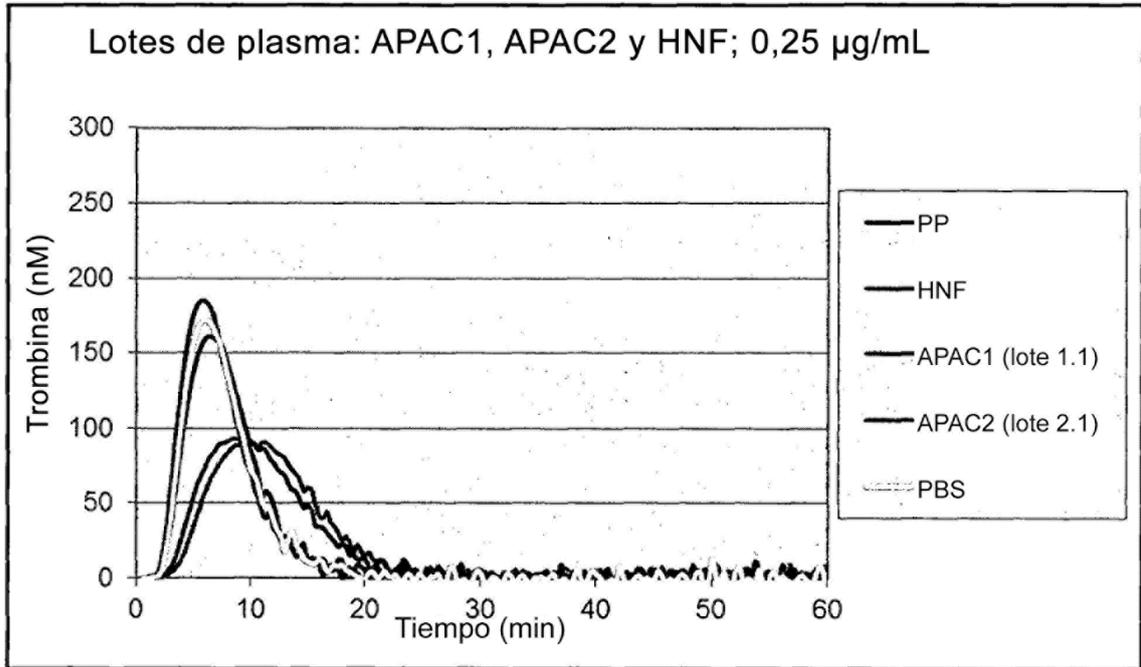


Figura 5

A.



B.

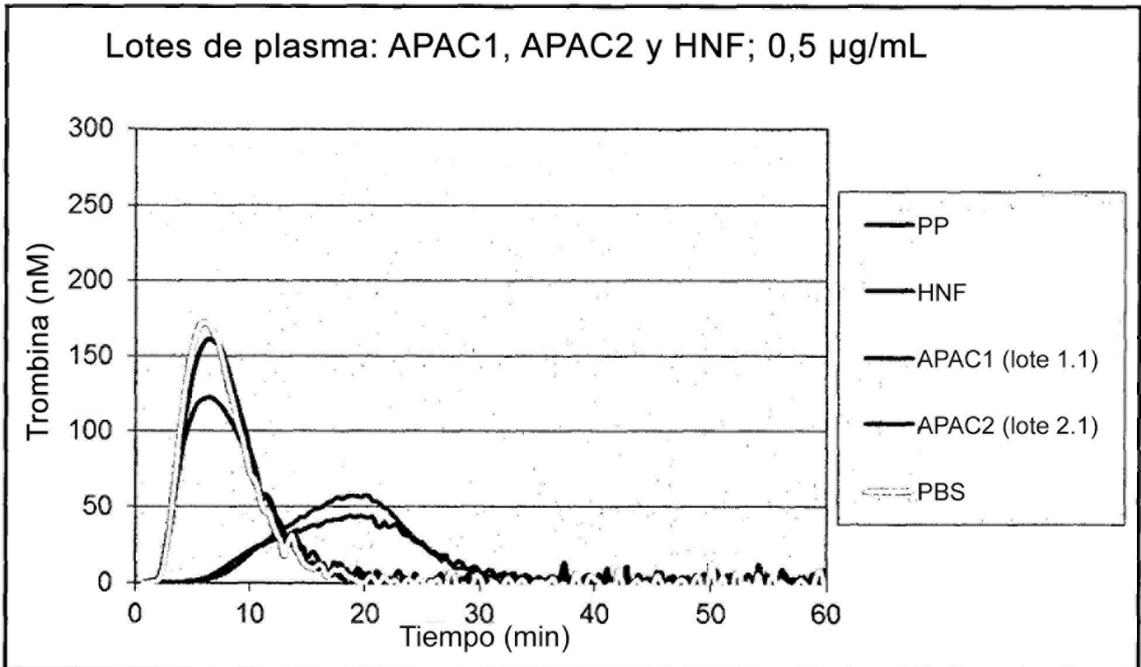
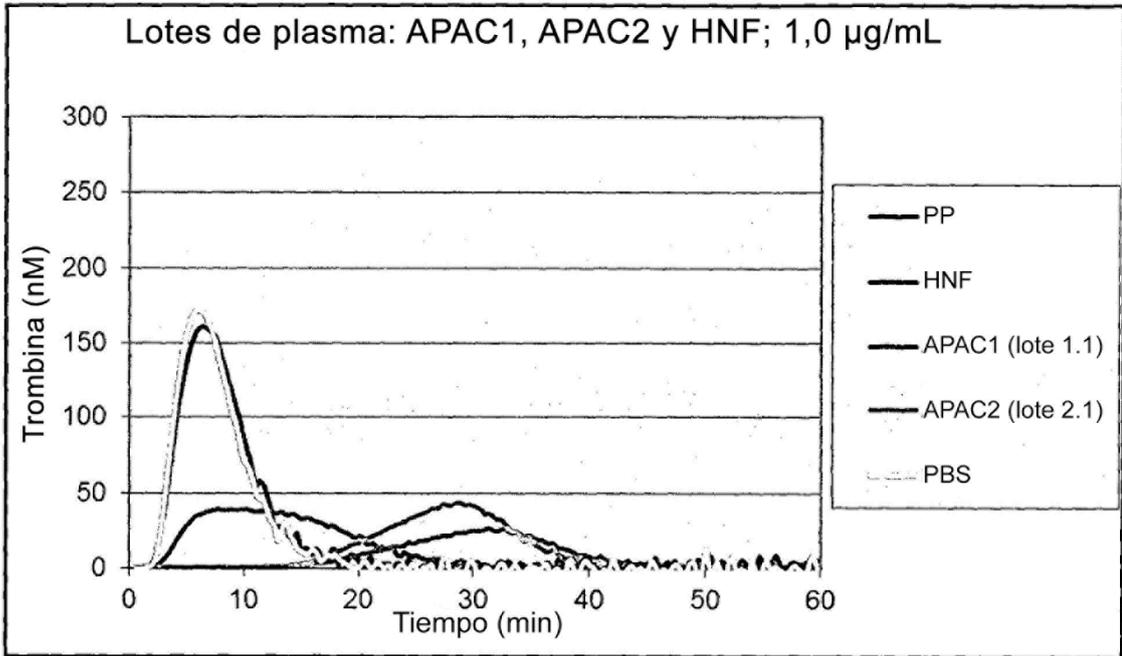


Figura 6

A.



B.

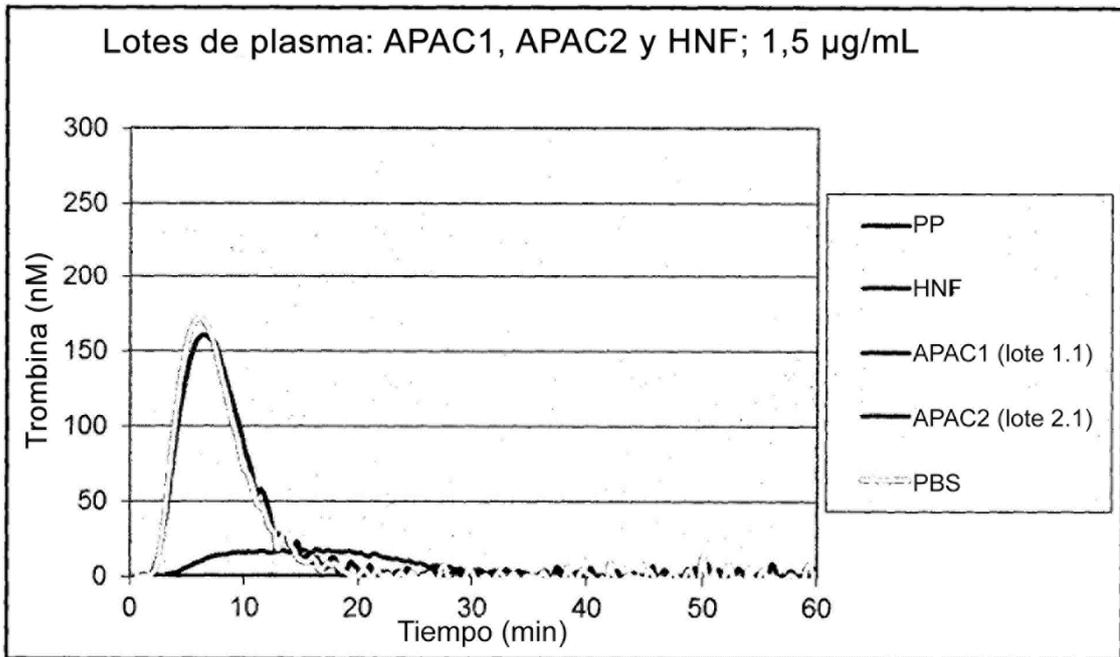
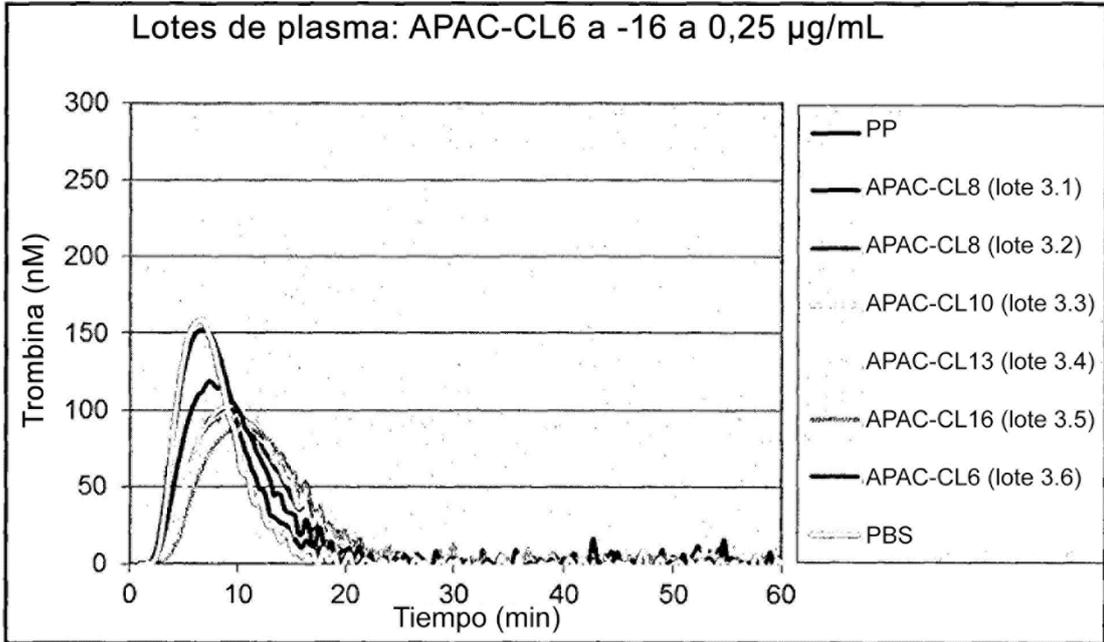


Figura 7

A.



B.

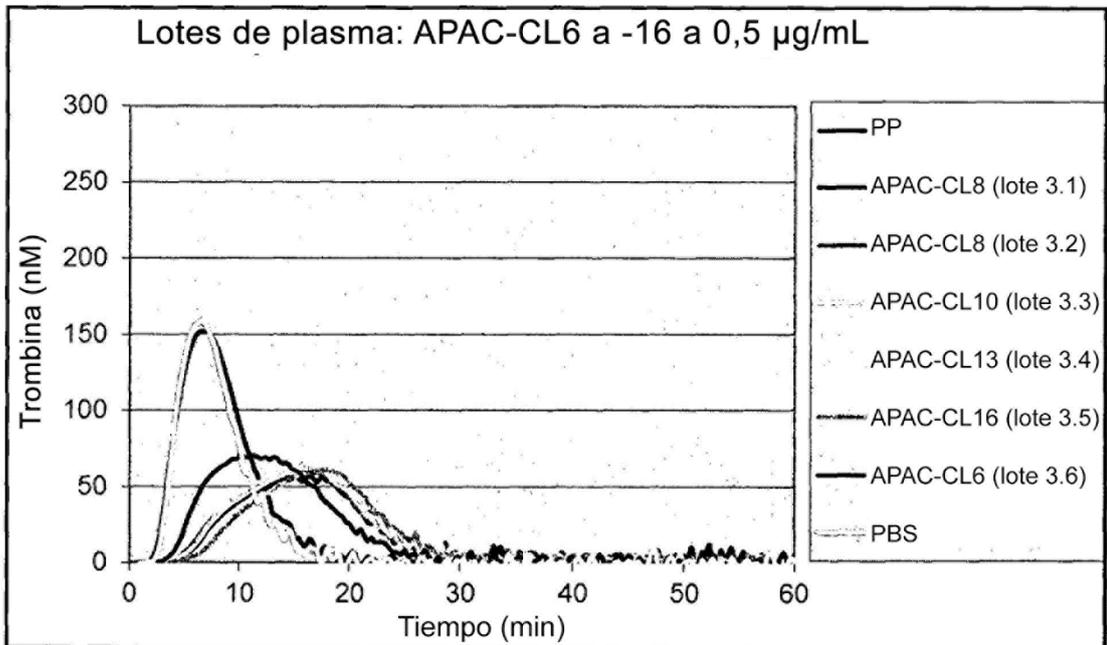
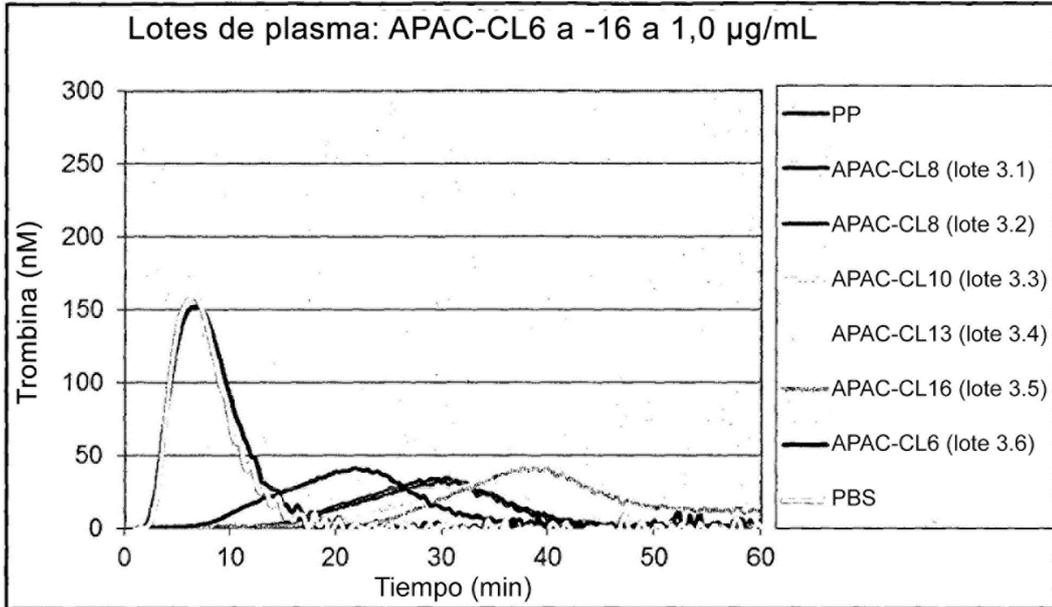


Figura 8

A.



B.

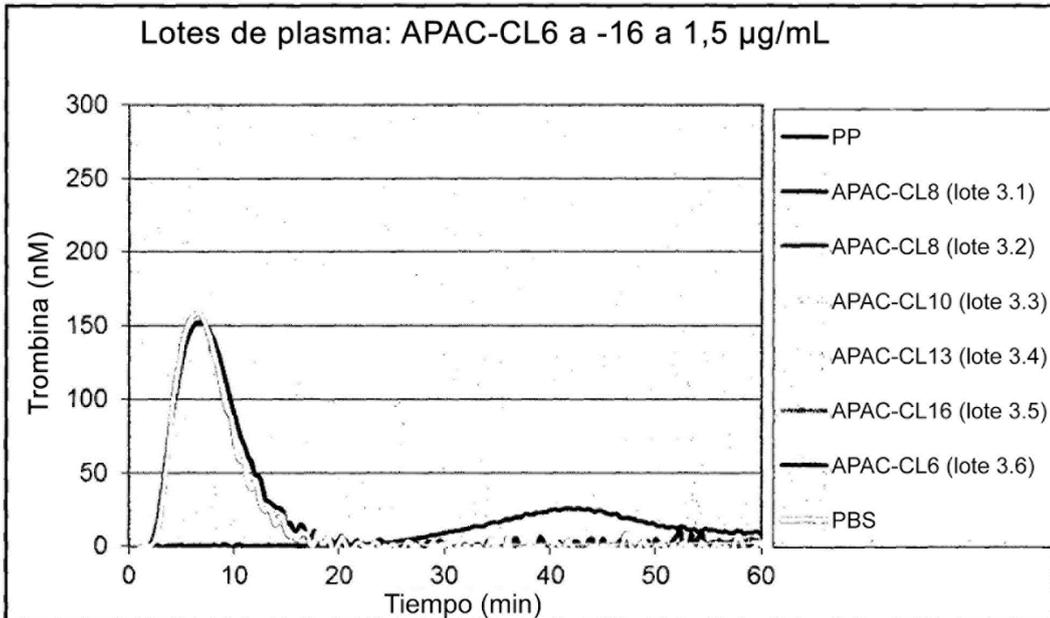


Figura 9

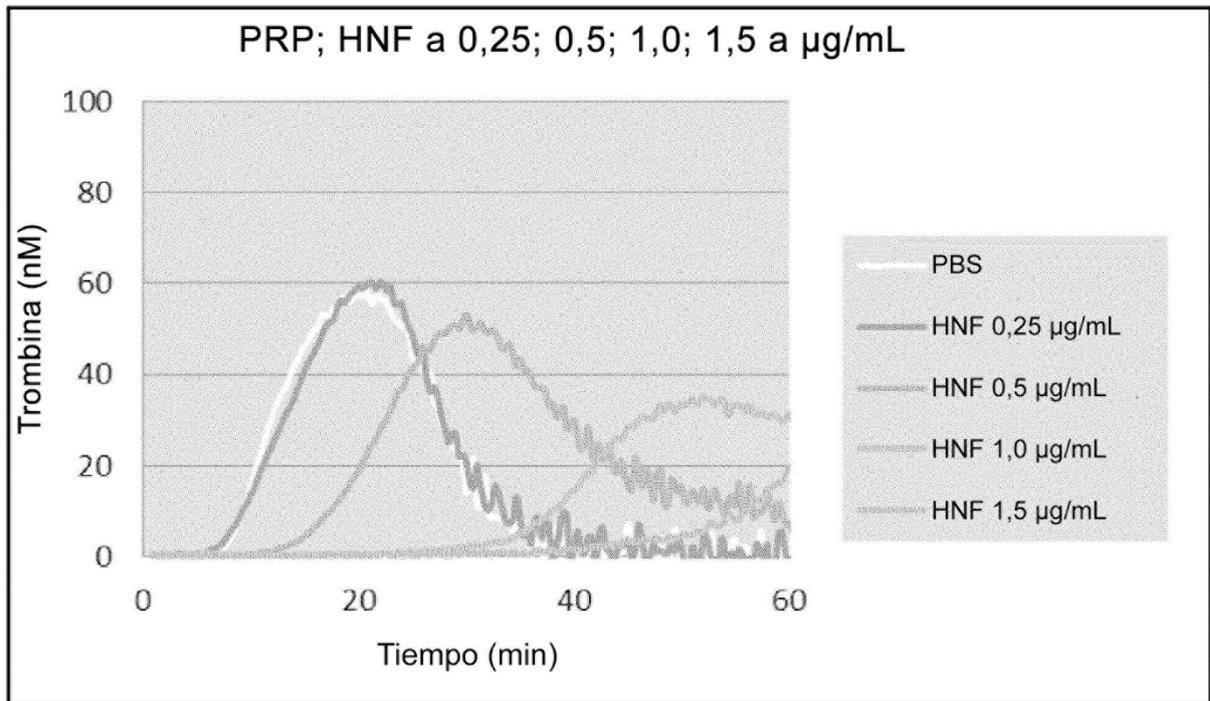


Figura 10

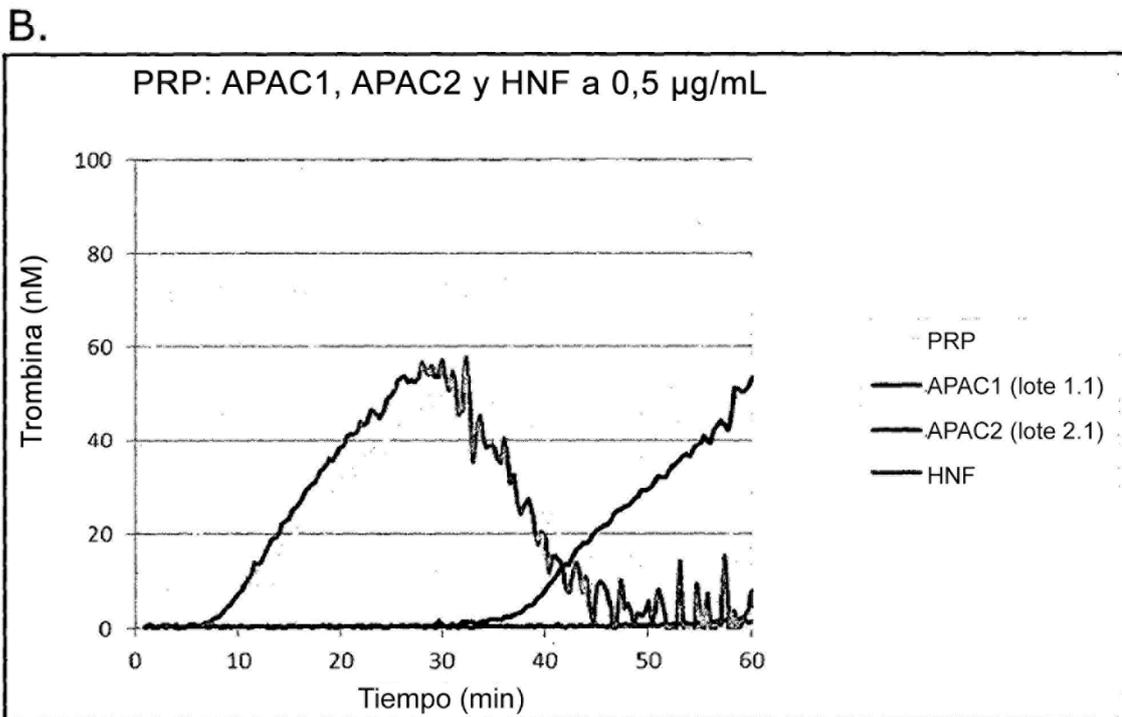
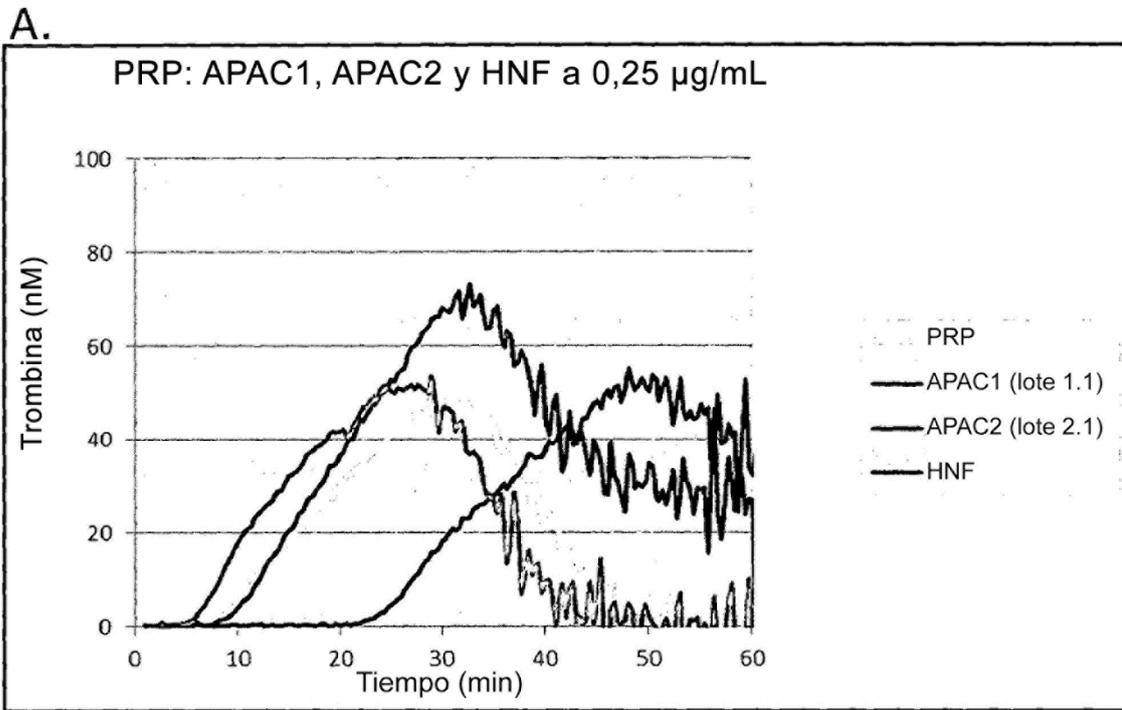


Figura 11

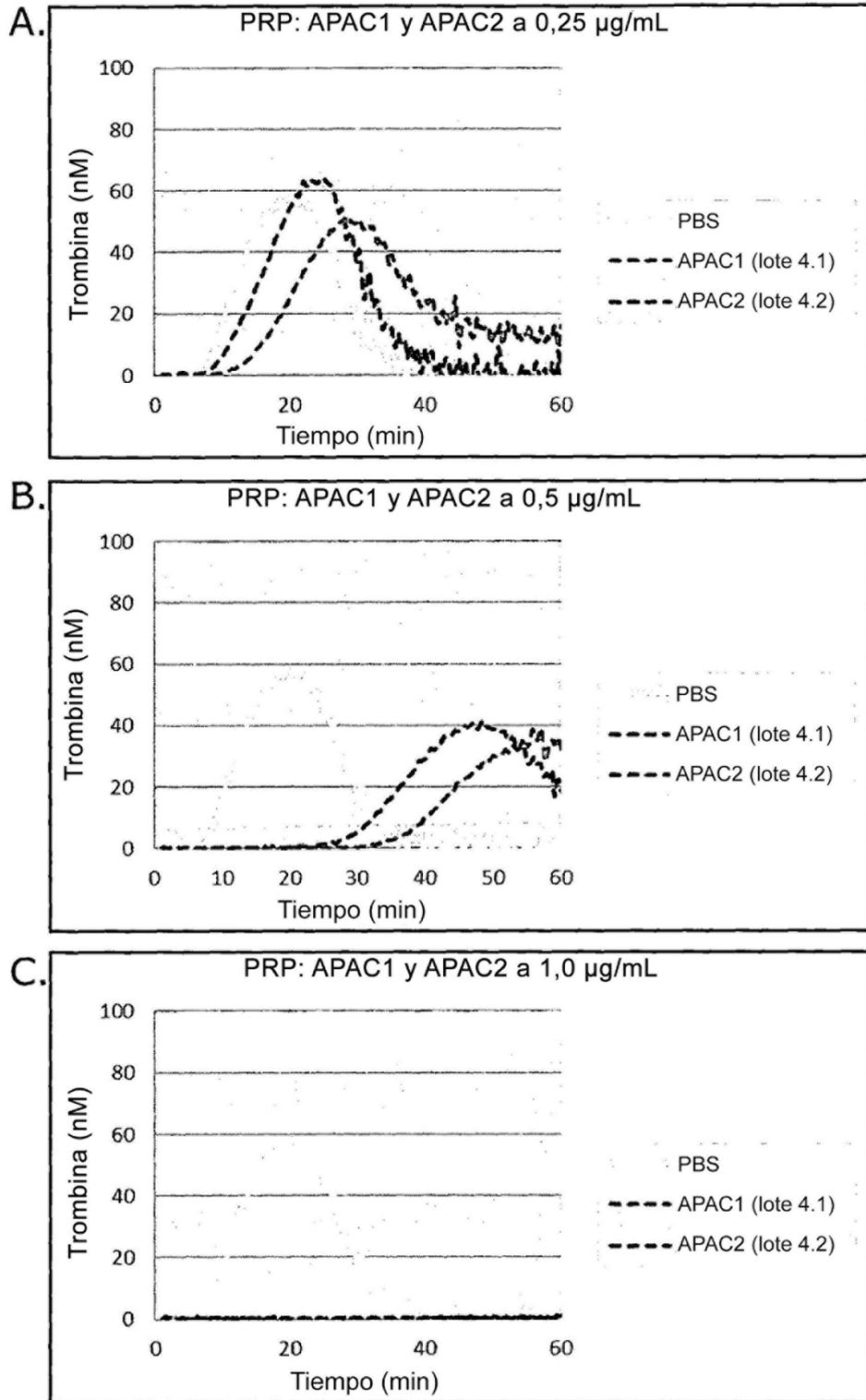


Figura 12

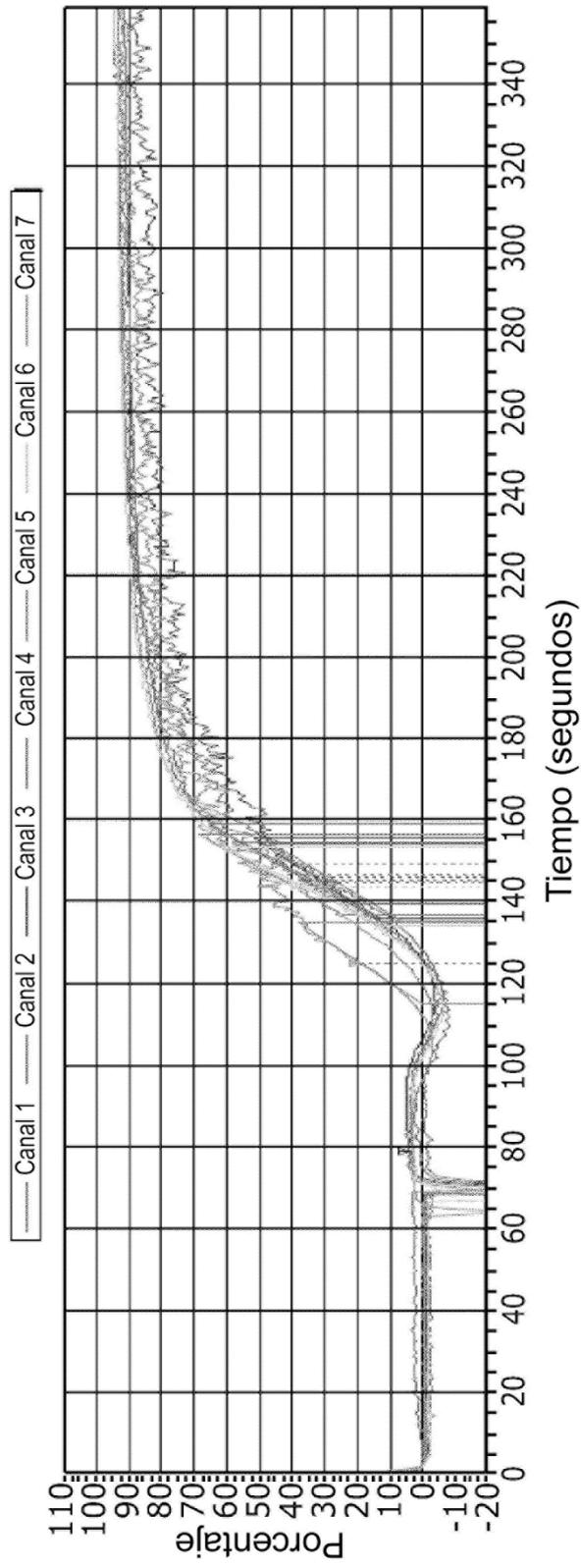


Figura 13A Concentración de heparina a 1 µg/mL

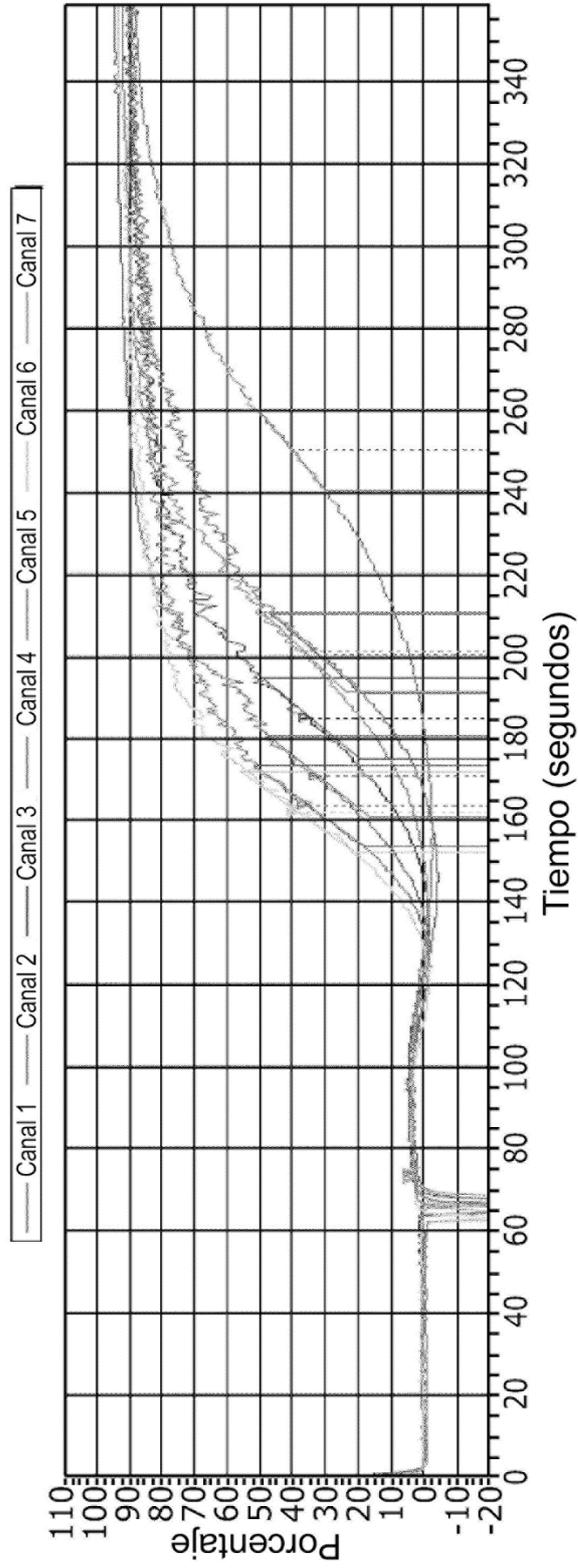


Figura 13B Concentración de heparina a 10 µg/mL

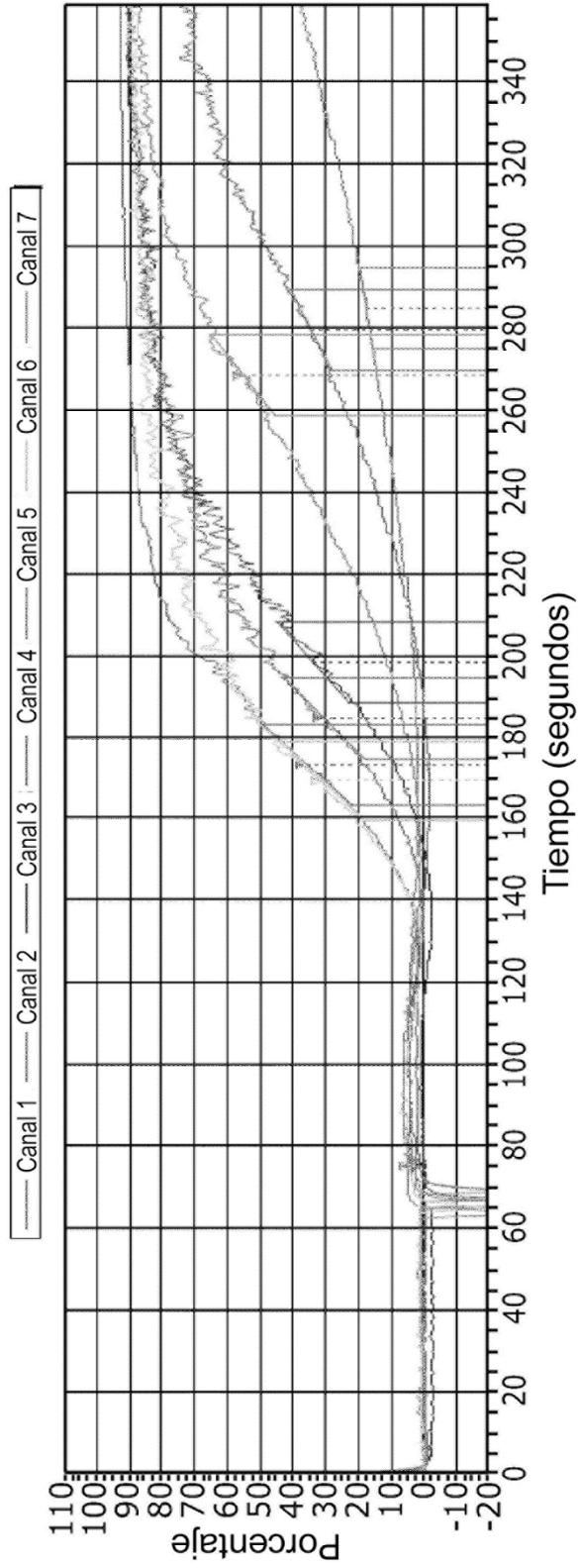


Figura 13C Concentración de heparina a 30 µg/mL

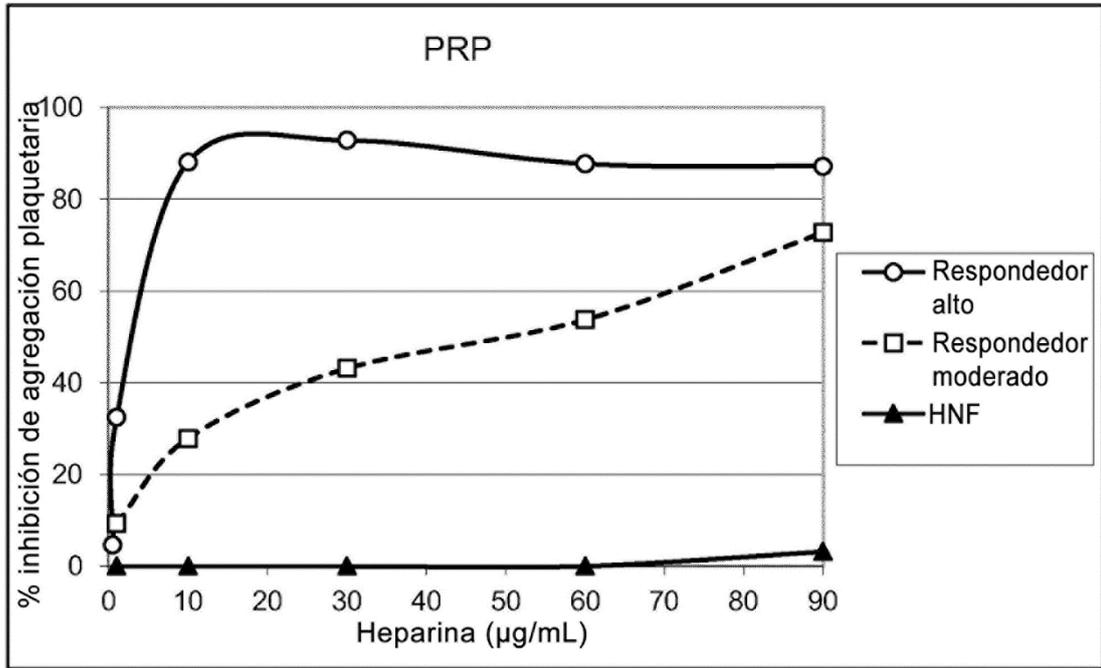


Figura 14

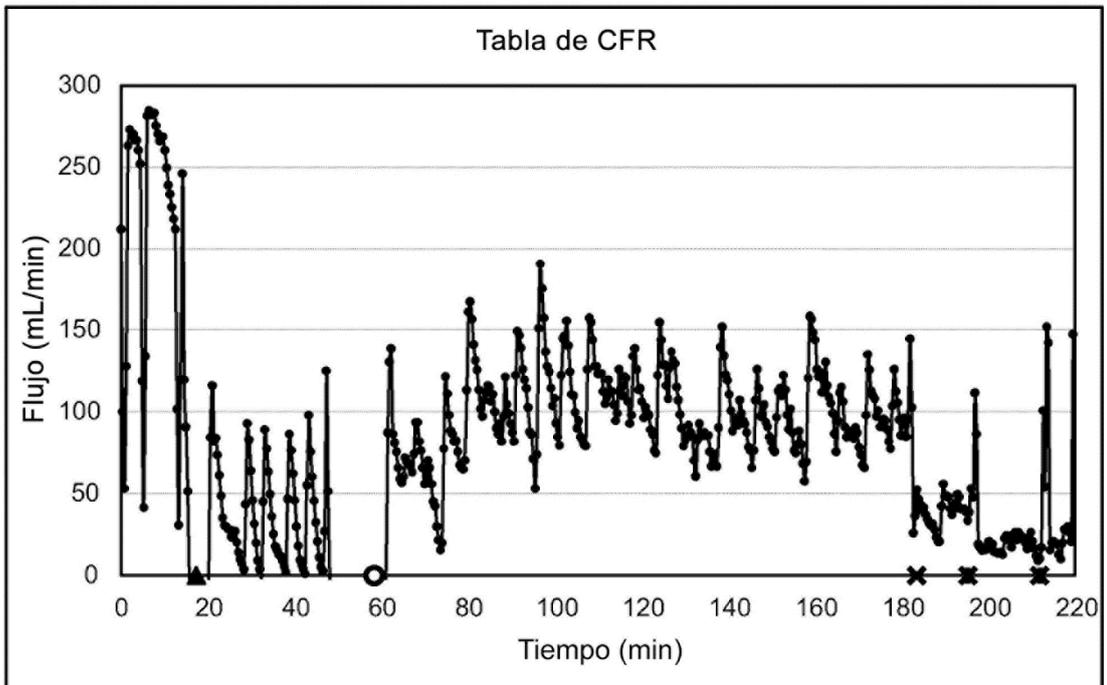


Figura 15

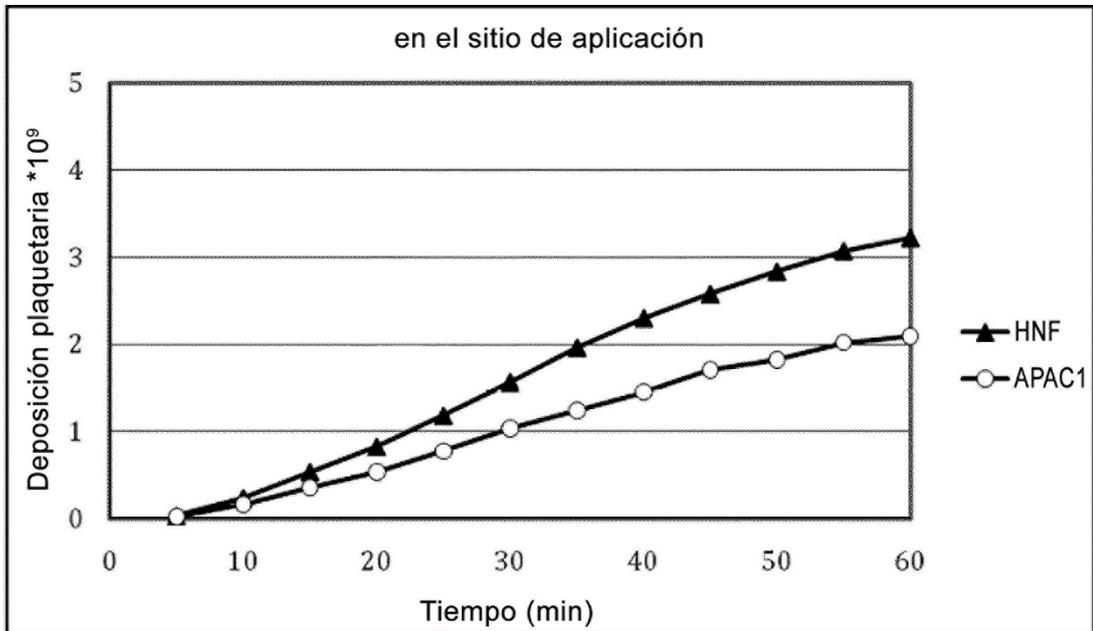


Figura 16A

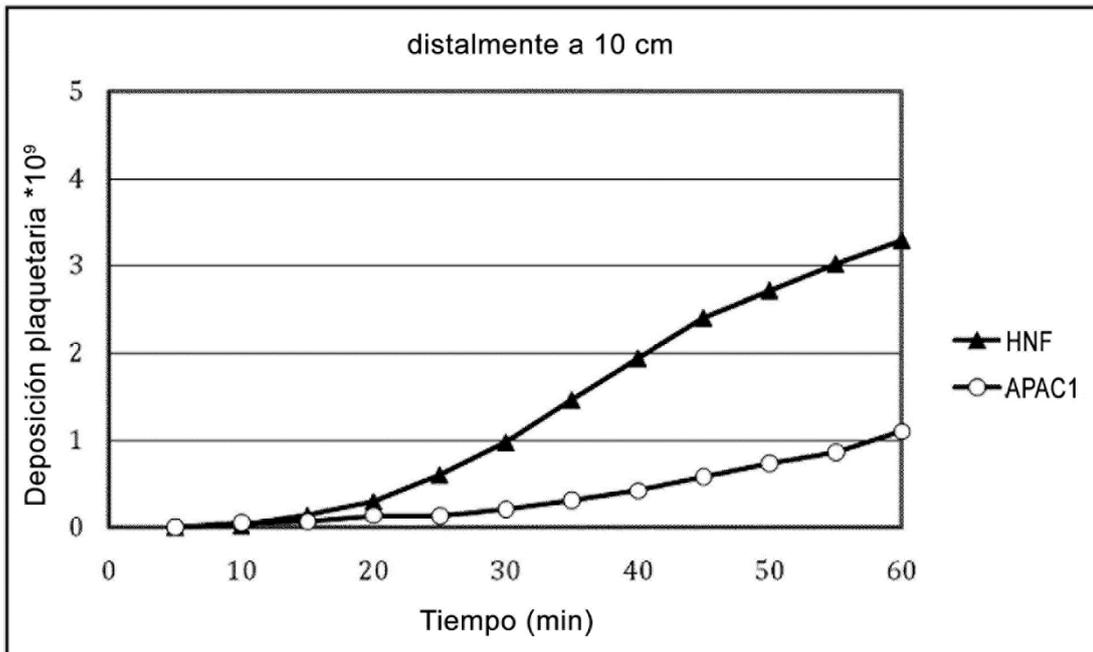


Figura 16B

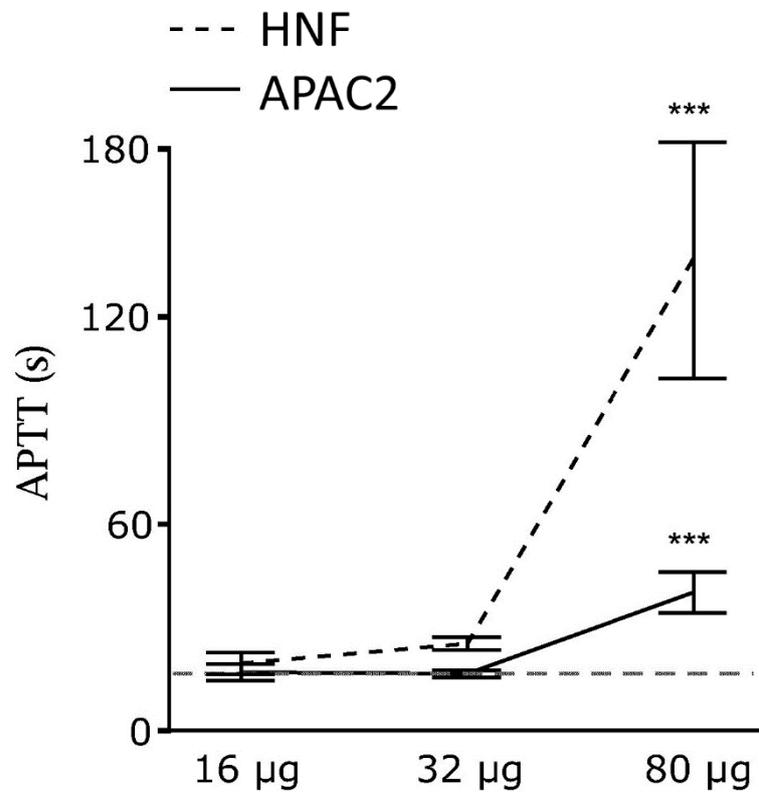
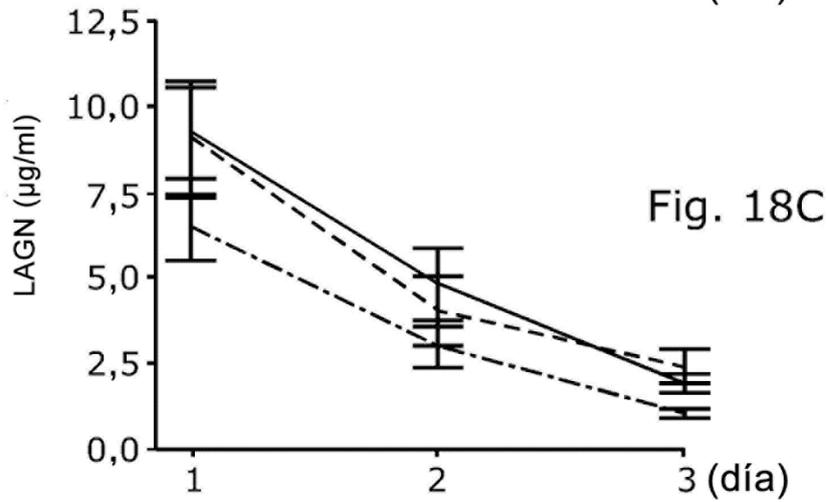
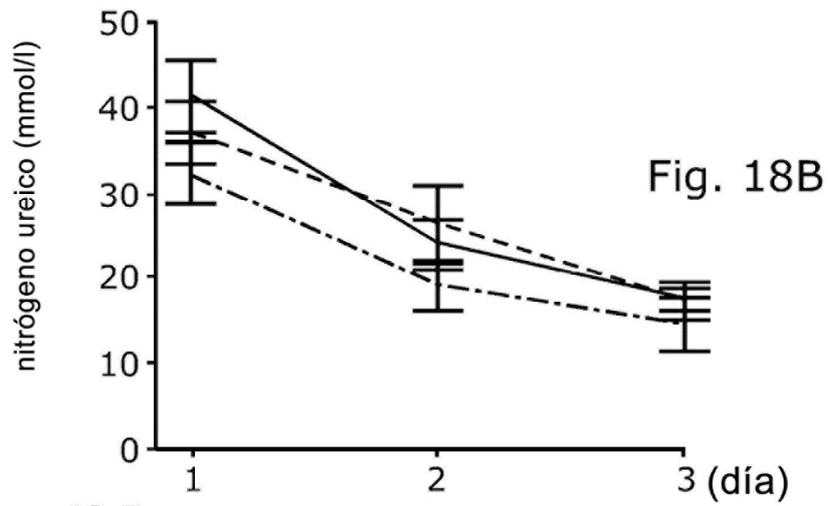
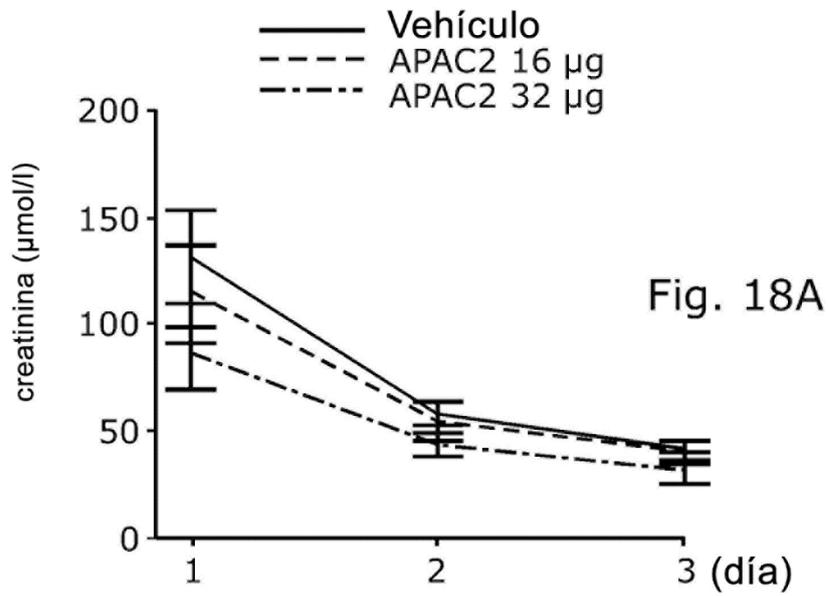


Figura 17



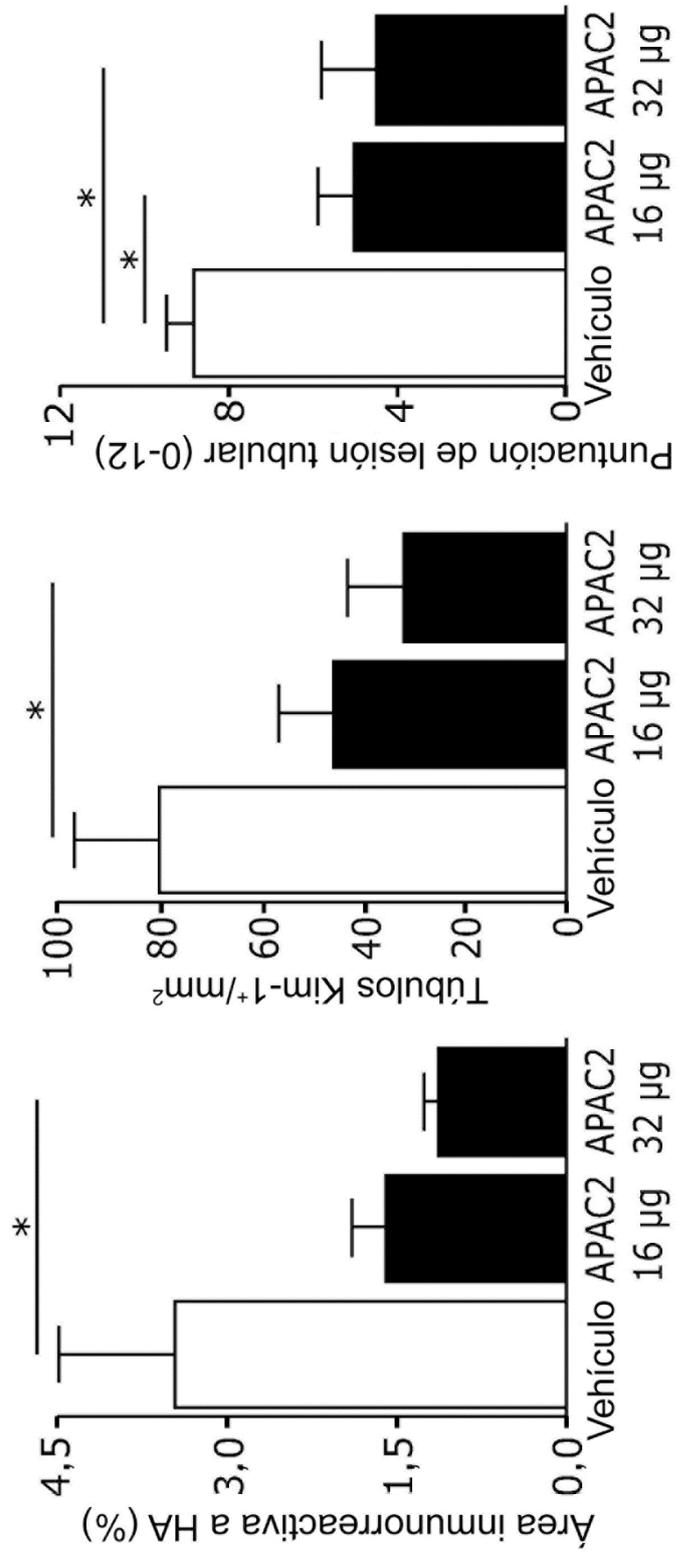


Figura 19A

Figura 19B

Figura 19C

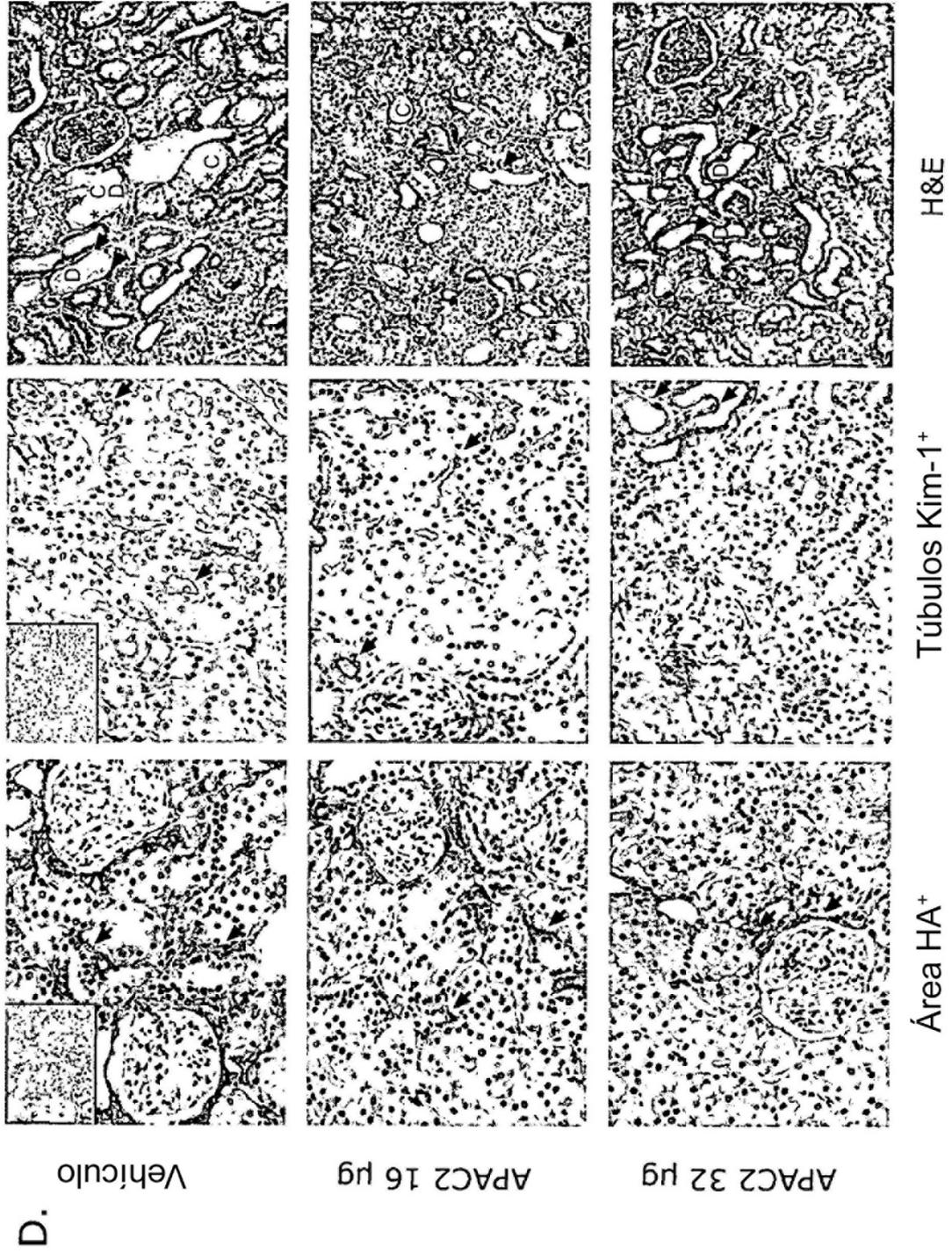


Figura 19D (continuación)

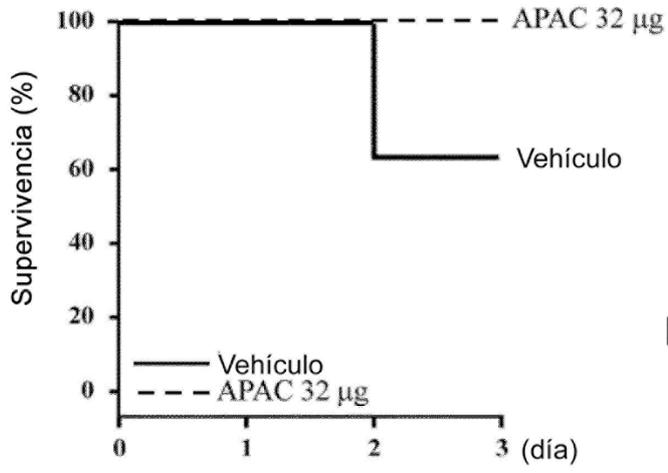


Figura 20A

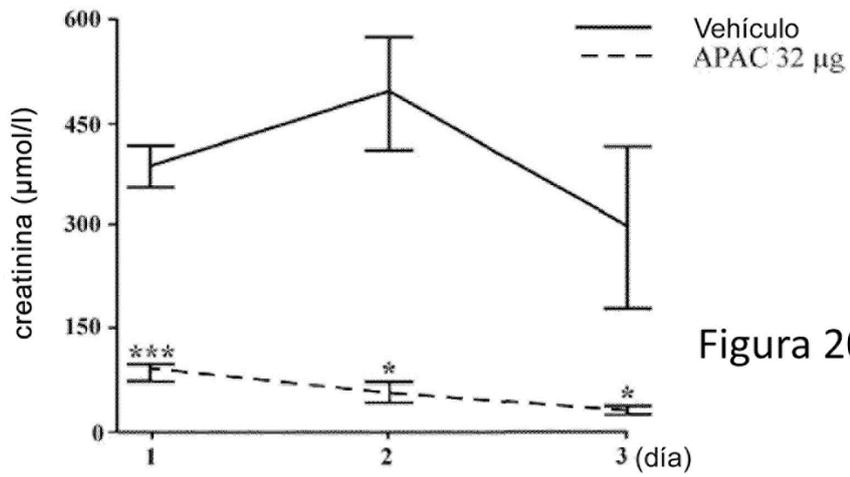


Figura 20B

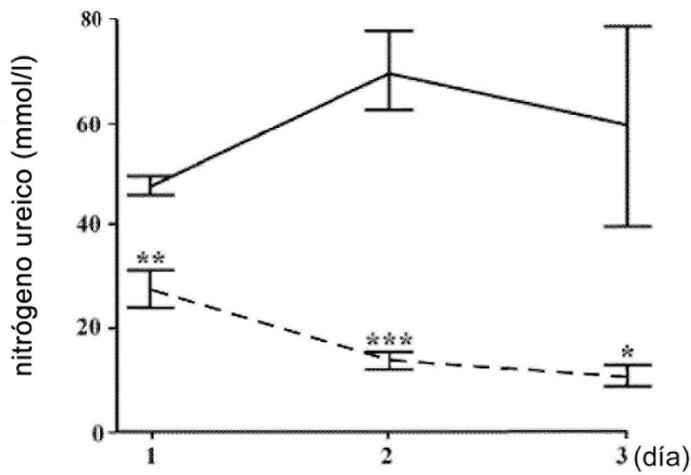


Figura 20C

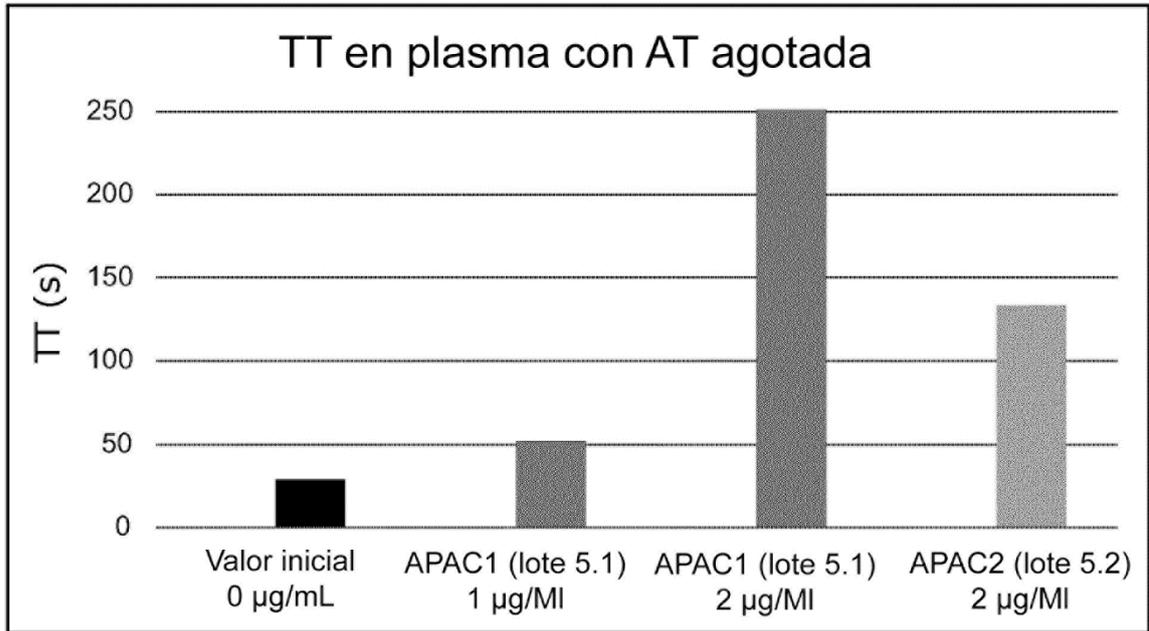


Figura 21

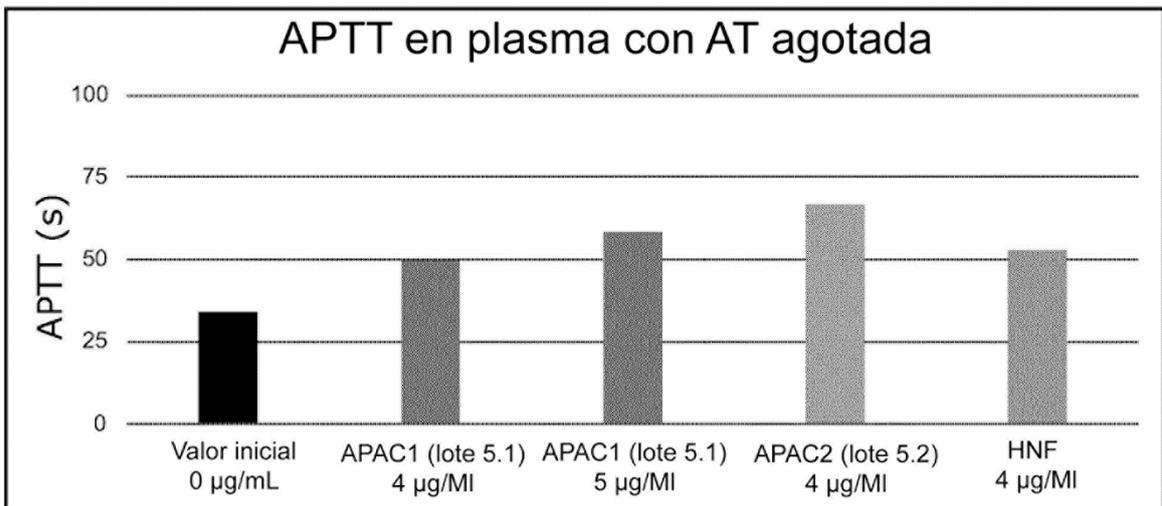


Figura 22