



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 432**

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01969710 .1**

86 Fecha de presentación : **12.09.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1435985**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2004**

54 Título: **Fármaco que contiene antitrombina III activada.**

30 Prioridad: **12.09.2000 DE 100 45 047**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es: **Beate Kehrel**
Schöppingenweg 70
48149 Münster, DE

72 Inventor/es: **Kehrel, Beate y**
Brodde, Martin

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 283 432 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

Fármaco que contiene antitrombina III activada.

5 La invención se refiere a la utilización de antitrombina III modificada en su conformación, denominada en este documento antitrombina III activada (IDAAT= antitrombina activada de defensa inmune), como fármaco.

10 La antitrombina III es un importante inhibidor fisiológico de la coagulación, que inhibe, sin requerir una activación preliminar, las serinproteasas circulantes.

15 Después de la formación del complejo, la proteasa deshace la unión arginina 393-serina 394, por lo que se produce la modificación de la conformación de la antitrombina III y la formación del complejo proteasa-inhibidor. La heparina acelera considerablemente la formación del complejo antitrombina-proteasa por la unión a la zona aminoterminal de la antitrombina III. Se supone que, *in vivo*, los glicosaminoglicanos, como el heparansulfato, adoptan el papel de la heparina en la superficie del endotelio.

20 La antitrombina III pertenece a la familia que comprende más de 100 miembros de los inhibidores de la serinproteasa (serpinas) y es una glicoproteína. Su cadena polipeptídica que comprende 432 aminoácidos tiene un peso molecular de 58000. La proteína contiene tres puentes disulfuro intramoleculares y cuatro sitios de glicosilación. Si se administra a dosis extremadamente elevadas, no fisiológicas, la antitrombina III disminuye, en experimentos animales, la mortalidad de la sepsis (Dickneite y Paques, 1993). Sin embargo, en seres humanos con sepsis no se pudo conseguir una mejora significativa de la mortalidad o morbilidad mediante preparados de antitrombina III disponibles en el mercado.

25 Además de la acción inhibitoria de las serinproteasas, particularmente de trombina, se observó un aumento de la síntesis de prostaciclina en células endoteliales humanas y bovinas por la antitrombina III (Yamauchi *et al.*, 1989). Este aumento produjo una supresión de leucocitos (Kainoh *et al.*, 1990) y la heparina lo influye negativamente (Uchiba *et al.*, 1996), de lo que se dedujo que este efecto de la antitrombina III se produce por su unión a receptores de glicosaminoglicanos similares a la heparina. Stangl *et al* 1999 describieron más allá de esto un ligero aumento (1,3-1,7 veces) de la liberación de endotelina-1, o de endotelina grande 1 del tejido pulmonar de ratas por la antitrombina III.

30 La antitrombina III se modifica en su forma por procesos mediados por inflamación. La inmunidad “natural”, “innata” o “constitutiva” es la primera estrategia de defensa frente a “intrusos” como bacterias, virus, parásitos, etc. y se presenta en todo el reino animal. Una parte importante de esta primera defensa consiste en que las células fagocitarias, particularmente monocitos y PMNL (granulocitos neutrófilos), pero también células dendríticas, eosinófilos, trombocitos y mastocitos, de manera aislada, o como asociaciones con otras células, migran hasta el lugar de la penetración del patógeno (quimiotaxis) y penetran a través de epitelios y del endotelio (diapédesis).

35 Las “células extrañas/intrusos” se neutralizan en el lugar de la inflamación mediante fagocitosis. Las células inflamatorias liberan proteasas, como por ejemplo, elastasa y catepsina G, y metaloproteasas y sustancias, que provocan una oxidación de lípidos, proteínas y péptidos.

40 A estas sustancias pertenecen el O₂, el superóxido, el peróxido de hidrógeno, los peroxinitritos, los radicales OH, el ácido hipocloroso HOCl, el gas Cl₂, la cloramina. La halogenación (principalmente cloración) es una vía importante para destruir células. En la zona de la inflamación, el valor del pH disminuye hasta debajo de pH 4,0 por la liberación de ácido láctico.

45 Las células defensivas también liberan proteínas y péptidos específicos para la defensa, como la proteína “bactericida/incrementadora de la permeabilidad” (BPI) de trombocitos y granulocitos y defensinas de granulocitos.

50 Si hay una herida u otra activación de la hemostasia, se producen trombina, Factor Xa y otras serinproteasas. Además se produce una activación de complemento (vía alternativa, vía de la properdina) y una síntesis y liberación aumentada de las denominadas “proteínas de fase aguda” como fibrinógeno, proteína C reactiva, proteína de unión a manosa (MBP), productos de los denominados “genes tempranos inmediatos” como trombospondina-1, y otros. Los mastocitos activados liberan el proteoglicano heparina soluble, que se puede unir a antitrombina (Linstedt *et al.*, 1992). La antitrombina III se modifica por estos procesos indirectamente o directamente y presenta funciones completamente nuevas.

55 En el marco de la invención se determinó que la antitrombina III, que se modifica por estos procesos directamente o indirectamente, presenta funciones completamente nuevas.

60 Además, en el marco de la presente invención se determinó que la antitrombina III también se puede transformar *in vitro* a esta forma activada, particularmente por procesos como oxidación, tratamiento con urea y clorhidrato de guanidina, separación proteolítica, calentamiento hasta 60°C, disminución del pH hasta 4,0 o adición de un péptido ATIII, que contiene la secuencia SEAAAS. Una secuencia críptica de la antitrombina se expone y permite a la proteína la interacción con proteínas como trombospondina, vitronectina, CD36, LDLox, integrina $\alpha_v\beta_5$ y otras.

Además, se determinó en el marco de la invención que la antitrombina III activada (IDAAT) polimeriza por auto-asociación. Estos polímeros tienen sitios de unión repetitivos para las proteínas que se adhieren y las inmovilizan. De este modo, las proteínas que se adhieren adquieren funciones que no tienen como proteínas solubles en el plasma, suero u otros fluidos corporales, y las proteínas de membrana se pueden estimular por tanto para la transducción de señales. Uno de los compuestos de interacción con la IDAAT es la trombospondina-1 (TSP-1). La TSP-1 es una glicoproteína modular compuesta de múltiples dominios, que se libera por muchas células y se introduce en la matriz extracelular. Particularmente los trombocitos contienen elevadas concentraciones de TSP-1 (Flicker y Kehrel, 1993) en sus gránulos α y la liberan durante su activación.

La concentración local de TSP-1 aumenta más de 1000 veces (Flicker y Kehrel, 1993). También las células endoteliales, las células del músculo liso, las células de la glía y los leucocitos secretan TSP-1. La TSP-1 es miembro de la familia de las trombospondinas, a la que además pertenecen la TSP-2, la TSP-3, la TSP-4 y la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP) (Lawler *et al.*, 1993). Las TSP-1 y TSP-2 son idénticas en algunas regiones, de manera que algunas funciones de la TSP-1 también pueden ser asumidas por la TSP-2. Las TSP-1 y TSP2 tienen la misma estructura de dominios y se pueden expresar como homómeros y heterómeros (Bornstein *et al.*, 1991). La TSP-1 es una glicoproteína trimérica con una masa aparente de 420000 Da. Sus 3 subunidades presentan en el sistema SDS-PAGE de Lämmli (Lawler y Hynes 1986) una masa molar de 180000 Da. Las imágenes de microscopía electrónica muestran la estructura trimérica que tiene el aspecto de una esfera con extremos globulares en los extremos amino y carboxilo de las cadenas polipeptídicas (Galvin *et al.* 1985). Cerca de los extremos amino globulares, las tres cadenas se unen entre sí mediante puentes disulfuro. Cada subunidad de TSP-1 contiene 69 restos de cisteína, de manera que cada cadena posee al menos un grupo SH libre. Las TSP-1 y TSP-2 contienen dominios funcionales similares, como la región N-terminal, una región homóloga al procolágeno, “repeticiones” de TSP de tipo 1 (zonas de repetición), “repeticiones” de TSP de tipo 2, “repeticiones” de unión de calcio de tipo 3 y la región del extremo carboxilo (Bornstein *et al.*, 1992).

Las regiones de unión con forma de bastón de las cadenas de TSP-1 muestran una dependencia de calcio de la estructura. En presencia de Ca^{2+} , esta estructura tiene una longitud de entre 16 y 29,1 nm, sin embargo, después del tratamiento con EDTA, de 38,3 nm (Lawler 1986).

La conformación de la TSP-1 depende fuertemente de la concentración de Ca^{2+} (Lawler *et al.* 1988) y de la unión al otro compuesto de la interacción. De este modo, la unión de la TSP-1 a fibronectina o heparina le confiere una conformación en ausencia de Ca^{2+} , que la molécula adoptaría en presencia de Ca^{2+} (Dardik y Lahav 1999).

La TSP inmovilizada adsorbida a superficies interviene en la adhesión de células endoteliales, células del músculo liso y monocitos. Esta adhesión depende del estado de conformación de Ca^{2+} de la TSP-1. El tratamiento con EDTA inhibe este proceso irreversiblemente (Lawler *et al.* 1988). La forma Ca^{2+} de la TSP-1 posibilita la unión a células RGD, con mediación de las integrinas. También la unión a CD36 provoca una modificación de la conformación en la molécula de TSP-1 (Leung *et al.* 1992). La TSP-1 se une a CD36 mediante un mecanismo de dos etapas. Solamente en la segunda etapa se une la TSP-1 con gran afinidad a CD36 por el “sitio de unión a células” en la “repetición de tipo 1” similar a la properidina.

La unión a CD36 por la secuencia peptídica 139-155 de la CD36 posibilita una modificación de la conformación de la TSP-1, que permite la unión de alta afinidad a la secuencia 93-110. En esta zona se encuentra la secuencia de CD36, cuya capacidad de unión se regula por fosforilación/desfosforilación (Thr 92) (Asch *et al.*, 1993). La CD36 fosforilada constitutiva se une a colágeno, la CD36 desfosforilada por activación celular adquiere la capacidad de unir la trombospondina. La conformación de la TSP-1 regula su capacidad de funcionamiento.

Además de la capacidad de unirse a células mediante integrinas y de mediar en la adhesión celular, también se controlan otras capacidades, como por ejemplo, modular la fibrinólisis, inhibir la elastasa y catepsina G, mejorar la cicatrización de heridas y fomentar el crecimiento de neuritas, por la conformación de la TSP.

Los ratones deficientes en TSP-1 desarrollan entre la 1ª y 4ª semana de vida neumonías bacterianas extensas organizadas agudas y crónicas con infiltración masiva de neutrófilos y macrófagos. Se observaron hemorragias alveolares difusas. En un momento posterior de la infección, en comparación con ratones control de la misma estirpe, que poseen la TSP-1, se produce un engrosamiento y ondulación del epitelio de las vías respiratorias (Lawler *et al.* 1998).

Estos resultados aclaran el significado de la TSP-1 para la defensa frente a infecciones. Los ratones negativos en TSP-1 produjeron significativamente menos descendencia que los animales control. Los “knock out” TSP-1 muestran una marcada curvatura lordótica de la columna vertebral. Esto demuestra el significado de la TSP-1 para el desarrollo/estabilización del esqueleto. Los animales deficientes en TSP-1 tenían un número muy significativamente superior de leucocitos, particularmente monocitos y eosinófilos, en sangre periférica.

La TSP-1 es una proteína multifuncional. Inmovilizada en superficies, fomenta la formación de plasmina (Silverstein *et al.* 1986) y protege mediante la inmovilización al mismo tiempo la plasmina de la inactivación por el inhibidor de la alfa2 plasmina. La invención descrita en este documento, el empleo de la IDAAT, provoca una inmovilización de TSP-1 en superficies celulares. El activador de plasminógeno uroquinasa (uPA) y el uPA de “cadena única” (scuPA) se unen a la TSP-1 inmovilizada y se mantienen proteolíticamente activos. La unión a la TSP inmovilizada protege al uPA frente a la inhibición por el Inhibidor del Activador de Plasminógeno Tipo 1 (PAI-1) (Silverstein *et al.*, 1990).

Si el scuPA se une a su receptor (scuPAR), queda libre un sitio de unión que posibilita la unión a TSP-1 asociada a célula y vitronectina (Vn) (Higazi *et al.*, 1996). De este modo, la TSP-1 inmovilizada posibilita procesos proteolíticos también en un microentorno en el que no hay fibrina.

5 Junto con la plasmina, la TSP-1 inmovilizada activa el factor de crecimiento transformante beta 1 “latente” (TGF- β -1) sobre la superficie de los macrófagos (Yehualaeshet *et al.*, 1999).

La TSP-1 activa el TGF- β también sobre la superficie del endotelio (Schultz-Cherry y Murphy-Ullrich, 1993, Schultz-Cherry *et al.*, 1994). El TGF- β inhibe la proliferación de células endoteliales y actúa de forma antiangiogénica. 10 La inhibición de la angiogénesis por la TSP-1 se ha descrito en diversas ocasiones (Iruela-Arispe *et al.*, 1999, Jiminez *et al.*, 2000). También una formación del complejo entre la TSP y el FGF- β 1 (factor de crecimiento fibroblástico básico) participa en esta función (Murphy-Ullrich, 1993). La falta de TGF- β conduce a fallos masivos en la defensa frente a infecciones, que conduce a la muerte (Kulkarni *et al.*, 1993, Shull *et al.*, 1992). Los animales deficientes en TGF- β mostraron adicionalmente una fuerte reactividad autoinmune (Letterio *et al.*, 1996) bajo influencia de la 15 expresión del antígeno MHC clase II (Geiser *et al.*, 1993).

Ya que la TSP-1 inmovilizada en superficies celulares puede activar el TGF- β , parece posible que la TSP-1 participe por el TGF- β en los procesos descritos de defensa frente a infecciones y reactividad autoinmune (Crawford *et al.*, 1998). La TSP-1 inmovilizada regula, junto con el TGF- β , la proliferación de células asesinas naturales (células 20 NK) (Pierson *et al.*, 1996). Los animales deficientes en TSP-1 muestran, aunque con una expresión más débil, los correspondientes defectos inmunes. Ya que la antitrombina activada descrita en esta invención por primera vez que se une a TSP-1, puede inmovilizar la TSP en superficies celulares, parece posible que la IDAAT influya indirectamente en la activación del TGF- β .

25 Sin embargo, la TSP-1 modula también por otros mecanismos procesos relevantes para la defensa inmunológica. De este modo, una gran cantidad de microorganismos, como por ejemplo, estafilococos coagulasa negativos (Li *et al.*, 2000), enterococos y *Porphyromonas gingivalis fimbriae* (Nakamura *et al.*, 1999), se adhieren a la TSP-1 inmovilizada.

Los eritrocitos infestados con el agente etiológico de la malaria tropica se adhieren a la TSP-1 inmovilizada (Roberts *et al.*, 1985) y al receptor de TSP-1 CD36. 30

El propio parásito tiene una proteína de membrana, que contiene regiones homólogas a la TSP-1. Mediante esta proteína TRAP (proteína anónima (adhesiva) relacionada con la trombospondina) transportada a la membrana de los eritrocitos, el parásito puede producir la adhesión de los eritrocitos infestados a la pared vascular (Wegelnik *et al.*, 1999, Kappe *et al.*, 1999). 35

También otros agentes patógenos, como por ejemplo *Cryptosporidium parvum* o *Eimeria tenella*, tienen dominios homólogos a la TSP o al receptor de la TSP que usan para la adhesión celular (Sulaiman *et al.*, 1999).

40 El virus VIH-1 usa, en su proteína de superficie GP 120, un dominio CD36 (receptor de TSP) con el que el virus VIH se puede unir a TSP y a CD4 en las células hospedadoras (Crombie *et al.*, 1998). La TSP-1 purificada, por lo tanto, puede inhibir las infecciones por VIH-1 (Crombie *et al.*, 1998).

Varias proteínas de complemento, C9, C8 alfa y C8 beta, tienen módulos con gran homología con uno de los 45 módulos de “repetición” de la trombospondina (Patthy, 1988). Otros dominios homólogos a la TSP también tienen antistasina, properdina y F-spondina. La F-spondina es, como la propia trombospondina, una sustancia eficaz para mejorar las lesiones del sistema nervioso (documento US 5750502).

Uniéndose al mismo tiempo a granulocitos neutrófilos apoptóticos (PMNL) y a macrófagos, la TSP puede mediar 50 en la fagocitosis de PMNL apoptóticos. La interacción simultánea de la TSP con sus receptores integrina $\alpha_v\beta_3$, CD36 y CD47 es responsable de este proceso (Savill *et al.*, 1992). La fagocitosis de PMNL apoptóticos regula las reacciones inflamatorias y evita una explosión incontrolada. Al contrario que la fagocitosis de PMNL necróticos o de PMNL con degradación avanzada, la fagocitosis mediada por la TSP-1 de PMNL apoptóticos se realiza sin liberación de 55 mediadores proinflamatorios (Stern *et al.*, 1996).

De este modo, la fagocitosis a tiempo mediada por la TSP evita una reacción inflamatoria exagerada. Adicionalmente, se inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias activamente por los macrófagos que han incluido los PMNL apoptóticos, (Fadok *et al.*, 1998). La unión del receptor de TSP CD47 sobre monocitos mediante la TSP-1, como se consigue mediante la invención descrita en este documento, conduce adicionalmente a una inhibición de la 60 liberación de interleucina 12 (IL-12) activa (Armant *et al.*, 1999, Demeure *et al.*, 2000). La interleucina-12 es un importante mediador de la sepsis (Steinhauser *et al.*, 1999).

La inmovilización de la TSP-1 a PMNL apoptóticos y a monocitos es por lo tanto una buena manera de influir positivamente mediante medicamentos en afecciones con inflamaciones persistentes, crónicas. A estas enfermedades 65 también pertenecen todas en las que una reacción inflamatoria exagerada constituye una parte de la propia enfermedad, como los diferentes daños por reperusión, reacciones de rechazo en transplantes de órganos y enfermedades reumáticas.

No solamente los granulocitos neutrófilos apoptóticos se fagocitan por la intervención de la TSP, sino también eosinófilos senescentes (Stern *et al.*, 1996). Esto demuestra que la inmovilización de la TSP en la superficie celular, como se consigue mediante la invención descrita en este documento, también es una manera de combatir la respuesta proinflamatoria no deseada en enfermedades mediadas por eosinófilos, como alergia, asma, enfermedades parasitarias, determinados tumores y enfermedades del tejido conjuntivo, mediante medicamentos. De este modo se evita que se liberen sustancias altamente tóxicas por los eosinófilos que dañan o destruyen el tejido.

La TSP se une a quimioquinas, como RANTES, y evita de este modo la unión de la quimioquina a su receptor (Barnes *et al.*, 1998). También de esa manera la TSP modula las reacciones inflamatorias y la defensa inmune.

Un medicamento que influye en la función de la TSP modificando su conformación o que fomenta la inmovilización a la superficie celular de células inmunocompetentes, limita la respuesta inmune no deseada en enfermedades, como, pero sin limitación, artritis reumatoide, síndrome de Goodpasture, diabetes insulino dependiente, pénfigo, penfingoide, cirrosis biliar primaria, colitis ulcerosa, lupus eritematoso, enfermedad de injerto contra huésped, sepsis.

La inmovilización de la TSP a superficies celulares conduce a una unión de su receptor CD47. Esta unión de CD47 sobre células de leucemia linfocítica crónica (células CLL) provoca específicamente la muerte celular de estas células tumorales (Mateo *et al.*, 1999).

Una sustancia que provocara la unión de la TSP a células de leucemia sería por lo tanto un medicamento eficaz para combatir la CLL, una enfermedad mortal, para la que todavía no existe un medicamento específico eficaz.

La trombospondina inhibe la neoangiogénesis no solamente por su acción sobre el TGF- β , sino también por inmovilización de, unión a y activación de CD36.

El tratamiento de tumores en ratones con TSP-1 conduce a una inhibición de la neoangiogénesis y a la apoptosis de células endoteliales (Jiminez *et al.*, 2000).

La inhibición de la angiogénesis tumoral es una buena manera de limitar mediante medicamentos el crecimiento de tumores (Roberts *et al.*, 1996). Una sustancia que media en la unión de la TSP a células endoteliales en tumores adquiere de este modo características de antiangiogénesis y de combate de cáncer.

La neoangiogénesis también es una causa de la ceguera, por ejemplo, debida a Diabetes mellitus (Kaplan *et al.*, 1999, Shafiee *et al.*, 2000), degeneración macular debida a la edad o de nacimientos prematuros. Para combatir esta neoangiogénesis también se puede emplear una sustancia que medie en la unión de la TSP a células endoteliales, de forma medicamentosa.

Después de una lesión las concentraciones de TSP en el tejido alrededor de la región lesionada aumentan de manera significativa. Después de una cateterización de balón, por ejemplo, 1 hora después de la lesión ya se puede detectar TSP en las superficies de las células (Watkins *et al.*, 1990, Munjal *et al.*, 1990). La TSP sobre la superficie celular sigue aumentando en los días posteriores y después también se acumula cada vez más en la matriz.

Cuando la cicatrización de la herida aumenta, la TSP desaparece de nuevo de las membranas celulares de los tejidos lesionados.

Uno de los objetivos que la TSP desarrolla en la herida es la mejora de la cicatrización de heridas (Patente de Estados Unidos 5.155.038). Una sustancia que inmoviliza la TSP-1 en la herida debería mejorar la cicatrización.

La TSP en la herida se expresa por las células de los tejidos, pero también se libera por trombocitos durante su activación.

Aproximadamente un 1% de todas las proteínas de las plaquetas y aproximadamente $\frac{1}{4}$ del contenido de los gránulos α de las plaquetas es trombospondina-1 (Kehrel, *et al.*, 1996). La trombospondina liberada fomenta la agregación plaquetaria inducida por colágeno (Kehrel, *et al.*, 1988). En el extremo C, la TSP contiene una secuencia, RFYVVMWK, que por CD47 activa las plaquetas (Chung *et al.*, 1999 y 1997). Sin embargo, la TSP soluble, añadida a la sangre, a suspensión de plaquetas o a plasma rico en plaquetas no desencadena por sí sola una agregación.

Mientras que las plaquetas en suspensión solamente pueden unir la TSP en su forma Ca^{2+} , las plaquetas se adhieren a la forma Ca^{2+} "alta" y "baja" de la trombospondina inmovilizada en la matriz.

El objetivo de la presente invención es por tanto proporcionar un fármaco que pueda desempeñar las funciones que se han mencionado anteriormente y por tanto, que pueda realizar las acciones esperadas.

Este objetivo se resuelve mediante un fármaco que contiene antitrombina III activada (IDAAT), péptidos IDAAT.

En el marco de la presente invención se ha observado, como se ha explicado anteriormente, que la IDAAT activada, mediante sus características y funciones, observadas por primera vez en el marco de la presente invención, desencade-

na o media en una pluralidad de reacciones en el cuerpo que se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades. Estas funciones y características se describirán a continuación con más detalle, al igual que las enfermedades o afecciones que se pueden tratar con ellas. También se puede producir una profilaxis en muchos casos con ayuda de la IDAAT.

5 En el marco de la presente invención, el fármaco puede contener la IDAAT completa, que se puede producir, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en los ejemplos. En teoría, también se puede aislar IDAAT del cuerpo formada después de reacciones de defensa. Además se puede concebir usar péptidos IDAAT que median en la interacción con proteínas como trombospondina, vitronectina, CD36, LDLox, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, integrina $\alpha_v\beta_3$ y otras.
10 Tales péptidos adecuados se pueden obtener fácilmente mediante ensayos preparatorios, ensayando por ejemplo su interacción con una de las proteínas que se han mencionado anteriormente.

También los análogos de la IDAAT, que también median en la interacción con las proteínas mencionadas, se describen en el marco de la presente invención, también se describen miméticos de IDAAT, que, debido a su estructura o/y grupos funcionales pueden mostrar los mismos efectos e interacciones que la IDAAT.
15

En el marco de la presente invención se prefiere usar IDAAT recombinante, para lo que se trata de manera adecuada antitrombina III producida recombinantemente para obtener antitrombina III activada (véase ejemplos y esta descripción). También los péptidos o análogos de IDAAT se sintetizan preferiblemente de forma recombinante y después se activan.
20

Un fármaco de acuerdo con la invención puede contener evidentemente otras sustancias auxiliares o/y de soporte farmacéuticamente aceptables, donde el fármaco se formula para la administración local, intradérmica, superficial, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular u oral o se posibilita su administración por vesículas. El fármaco de acuerdo con la invención contiene por tanto preferiblemente aquellas sustancias auxiliares y de soporte, que posibilitan el correspondiente tipo de administración preferido.
25

El fármaco de acuerdo con la invención puede contener, además de la IDAAT, otras sustancias, como por ejemplo antibióticos, inmunosupresores, etc. Según la enfermedad que se tiene que tratar, puede ser ventajoso tratar a manera de refuerzo con fármacos conocidos. Por lo tanto, una combinación correspondiente de este fármaco con la IDAAT o sus análogos es, en un caso dado, una realización preferida de la presente invención.
30

Mediante los procesos en el cuerpo observados en el marco de la presente invención, que se pueden producir por antitrombina III activada, el fármaco de acuerdo con la invención se puede usar para una pluralidad de indicaciones. A continuación se realizan ejemplos para nuevas funciones de la IDAAT, que no comprenden los preparados de antitrombina y particularmente preparados comerciales de antitrombina:
35

1) La IDAAT media específicamente y de manera dependiente de la dosis en la unión de TSP-1 a monocitos, líneas celulares monocitarias y células monocitarias, como macrófagos.
40

Mientras que sin adición de TSP-1 purificada y sin adición de IDAAT solamente ~1% de los monocitos humanos purificados se puede detectar en el citómetro de flujo por un anticuerpo (clon P10), que reconoce la TSP-1 sobre la superficie celular, el número aumenta por la adición de 10 $\mu\text{g/ml}$ de TSP-1 purificada a aproximadamente el 5%.
45

La adición de IDAAT (sin adición de TSP-1 purificada) media en la unión de TSP1 de TSP endógena a los monocitos. Aproximadamente el 18% de los monocitos eran positivos para TSP-1.

50 Por la adición simultánea de TSP e IDAAT casi todos (> 90%) de los monocitos en sangre periférica empleados fueron fuertemente positivos para TSP (véase la Figura 1).

2) La IDAAT media en la unión de la TSP a PMNL apoptóticos
55

Por envejecimiento (24 h de incubación en medio de cultivo celular en el incubador de acuerdo con Savill 1992) los PMNL hechos apoptóticos unen la TSP. Este proceso aumenta específicamente por la adición de IDAAT de manera dependiente de la dosis (véase la Figura 2). La adición simultánea de TSP purificada + IDAAT sigue aumentando el efecto.
60

3) La IDAAT une mediante la TSP los PMNL apoptóticos con monocitos

65 La adición de TSP e IDAAT conduce de manera dependiente de la dosis a la asociación de PMNL apoptóticos con monocitos (véase la Figura 3).

ES 2 283 432 T3

4) La IDAAT fomenta de manera dependiente de la dosis la trans migración de monocitos por el endotelio

Se realizaron experimentos de trans migración como se describe por Kielbassa *et al.*, 1998. La adición de IDAAT al medio de cultivo de los monocitos durante un experimento de trans migración aumenta, de manera dependiente de la dosis, la trans migración de monocitos por el endotelio 2-3 veces (véase la Figura 4).

También la adición de TSP purificada (25 $\mu\text{g/ml}$) fomenta la trans migración de los monocitos. La adición de TSP + IDAAT conduce, a pequeñas concentraciones de TSP e IDAAT, a un aumento de la trans migración, que es mayor que por la sola adición de las sustancias individuales.

10

5) La IDAAT activa monocitos

La IDAAT induce de manera dependiente de la dosis un flujo de Ca^{2+} en los monocitos. Las mediciones de Ca^{2+} se realizaron según Sorrani *et al.*, 1993. Se lavaron monocitos purificados ($5 \times 10^6/\text{ml}$) a temperatura ambiente con tampón Hepes-Tyrode pH 7,4 y a continuación se marcaron durante 15 min con Fura2/AM 1 μM a 37°C, se lavaron dos veces en tampón Hepes-Tyrode sin Ca^{2+} y después se incluyeron en Hepes-Tyrode con Ca^{2+} 1 mM.

Las señales de Ca^{2+} inducidas por la IDAAT, el péptido TSP RFYVVMWK, y sustancias activas como controles positivos o negativos, se determinaron fluorométricamente en el Hitachi F-2000.

20

La IDAAT (100 $\mu\text{g/ml}$) activa los monocitos y provoca una clara señal de Ca^{2+} (véase la Figura 5).

6) La IDAAT media en la unión de TSP-1 a células T y a células dendríticas

La IDAAT media en la unión de TSP secretada por células T y TSP exógena añadida a células T humanas (en este documento, como ejemplo, células Jurkat) (véase la Figura 6).

30

7) La IDAAT aumenta de manera dependiente de la dosis el efecto activador de fMLF sobre el estallido oxidativo de los PMNL

La inducción del estallido oxidativo se realizó esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el ensayo de fagos/ensayo de estallido de la empresa Orpegen (Heidelberg) en el citómetro de flujo, sin embargo, se incubaron primero los PMNL con el sustrato DHR123 y a continuación se activaron los PMNL.

35

La IDAAT aumenta de manera dependiente de la dosis el efecto activador de fLMF sobre el estallido oxidativo. La IDAAT y fLMF tienen ambos un efecto aditivo. La IDAAT no solamente aumenta el efecto activador de otros agonistas sobre el estallido oxidativo de los PMNL, sino que también lo libera como agonista automático independiente (véase la Figura 7). De este modo, la IDAAT es una herramienta valiosa para el aumento de la defensa frente a infecciones.

40

8) La IDAAT inhibe específicamente y de manera dependiente de la dosis la liberación de interleucina 12 (IL-12) activa por los monocitos activados

45

La IL-12 activa juega un papel clave negativo en las reacciones inflamatorias y la sepsis. Los monocitos activados con interferón γ (INF γ) y *Staphylococcus aureus* producen IL-12 y la liberan.

Esta reacción se pudo inhibir por la IDAAT de manera dependiente de la dosis. La concentración de IL-12 activa en el medio de cultivo de los monocitos se determinó mediante ELISA.

50

Por la incubación de los monocitos con IDAAT se inhibió completamente la liberación de IL-12 (véase la Figura 8).

55

Al contrario que la secreción de IL-12, la secreción de IL-10, que tiene un efecto protector frente a la sepsis, aumentó por la IDAAT de manera dependiente de la dosis (véase la Figura 9). Esto muestra el efecto modulador de la defensa frente a infecciones de la IDAAT y sugiere la utilidad de la IDAAT en reacciones sépticas. La liberación de otra interleucina "perjudicial", el TNF α , se inhibe por la IDAAT (Figura 10).

60

9) La IDAAT inhibe reacciones inflamatorias *in vivo*

En la oreja de ratones Balb-C se desencadenó, por inyección local de anti-BSA en el momento 0 e inyección simultánea de BSA unida a FITC en el peritoneo, una reacción de Arthus. A los animales control (controles negativos) solamente se les inyectó FITC (sin BSA) en el peritoneo. Después de aproximadamente 6 horas se observó una reacción inflamatoria muy pronunciada con hinchazón de la oreja (edema), penetración de FITC, infiltración de PMNL y hemorragias petequiales en el tejido en los animales tratados con anti BSA y BSA-FITC.

65

ES 2 283 432 T3

A 8 ratones se les inyectó adicionalmente en el momento 0 y después de 0 + 3 horas respectivamente 50 μg de IDAAT en tampón por vía intraperitoneal.

6 ratones control obtuvieron en el momento 0 y 0 + 3 horas en vez de IDAAT solamente el tampón, tampón 5 Tris/HCl 50 mM con NaCl 150 mM pH 7,4, en el que se disuelve habitualmente la IDAAT.

La reacción de Arthus se evita casi completamente por la IDAAT. Los ratones tratados con IDAAT mostraron pene-
traciones significativamente menores de FITC, grosos de oreja significativamente menores y casi ninguna petequia
en comparación con los animales tratados con “tampón” (véase la Figura 11).

10

10) La IDAAT inhibe la infección por VIH-1 de células monocitarias de sangre periférica (PBMC)

Las PBMC activadas por PHA se incubaron junto con suero humano negativo 1:100 (control negativo), con an-
ticuerpo específico V3loop neutralizante (control positivo), con IDAAT (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y un aislado primario de VIH-1
15 con tropismo por CCR5 (903) de un paciente y después de cinco días se investigó la producción de virus mediante
ELISA de p24.

Para ello se incluyeron PBMC recientemente activadas por PHA en medio RPMI 1640 + FKS al 20% + 100U/ml de
20 IL-2 en una concentración celular de 2×10^6 células/ml y se repartieron con respectivamente 200.000 células/pocillo/100
 μl en una placa de fondo plano de 96 pocillos.

Sustancias que se tienen que ensayar para inhibición,

25 control positivo: anticuerpo humano neutralizante anti V3loop 1:100,

control negativo: suero humano negativo 1:100 y

sustancia a investigar: IDAAT (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$),

30

se añadieron a las células en el medio RPMI y se incubaron durante 30 minutos a 37°C/CO₂ al 5%. A continuación
se añadió el virus VIH-1 al sedimento: respectivamente 10 μl /pocillo de sobrenadante de aislado primario de VIH-1
903 (CCR5-trópico) con 20000 TCID₅₀ (dosis infectiva del 50% del cultivo tisular)/ml

35 $\cong 1000$ TCID₅₀/ml en el pocillo.

Estos sedimentos se incubaron durante una noche a 37°C/CO₂ al 5%. Al día siguiente se lavaron las células tres
veces con RPMI 1640 y se añadió medio de cultivo nuevo. El 5° día después de la infección se realizaron las investi-
gaciones ELISA de p24.

40

ELISA de P24:

Los anticuerpos α -p24 usados (11-G7 [Niedrig, Berlin] y D7320 [Biochrom]) reconocen la proteína p24 de la
variante de aislado primario usada 903. Se recubrieron placas Maxi-Sorb-ELISA (Nunc) con estos anticuerpos durante
45 una noche. El sobrenadante de virus del ensayo de inhibición se inactivó con TritonX-100 al 1%. El sobrenadante de
virus inactivado y el anticuerpo de detección conjugado con fosfatasa alcalina (BC1071-AP [Aalto]) se transfirieron
después de lavar los pocillos recubiertos con PBS, conjuntamente a los pocillos y se incubaron en los mismos durante
5 horas a 37°C. Los pocillos se volvieron a lavar con PBS, se añadió sustrato disuelto para la fosfatasa alcalina p-
nitrofenil-fosfato [Sigma] a los pocillos y se midió el desarrollo de color después de 20 minutos a 405 nm en el
50 fotómetro ELISA. Los valores paralelos en el ELISA de p24 usado variaban hasta en 0,02 unidades de densidad óptica
(DO) alrededor de un valor medio común.

Mientras que la DO a 405 nm para el control negativo \cong sin inhibición estaba en 0,8 lag, redujo el anticuerpo
neutralizante (control positivo) la DO a 0,12. 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IDAAT redujeron la DO a 0,10.

55

Por la adición de IDAAT se pudo inhibir la infección de VIH-1 de las PBMC de manera eficaz.

60 11) La IDAAT media en la unión de *S. aureus* a las células capaces de fagocitar y de defensa frente a bacterias
(trombocitos, monocitos, PMNL)

Los trombocitos se marcaron con un anticuerpo anti GPIX específico de trombocitos conjugado con ficoeritrina
(clon Beb 1). Las bacterias (diferentes cepas de *S. aureus*) se ajustaron con soluciones salinas tamponadas con Tris
(TBS) hasta un número de 250.000 bacterias/ μl y se marcaron mediante el colorante de ARN Syto13 [MoBiTec,
65 Göttingen] a una concentración de 2 μM . Las bacterias marcadas y los trombocitos marcados se coincubaron en una
proporción de 10:1 durante 10 minutos.

ES 2 283 432 T3

Las poblaciones celulares se analizaron en el citómetro de flujo. Las células positivas a ambos fluorocromos se valoraron como asociaciones (véase la Figura 12 a). La estimulación de trombina y la liberación de TSP de los gránulos α de las plaquetas aumentaron la cantidad porcentual de las plaquetas con bacterias en relación a la cantidad total de trombocitos en un factor de 2,5. Este aumento no se observó usando plaquetas de 2 pacientes con Síndrome de las Plaquetas Grises, cuyas plaquetas carecen de TSP (véase la Figura 12 b).

La IDAAT fomentó de manera dependiente de la dosis la unión de *S. aureus* a trombocitos (véase la Figura 12 c).

Ya que los trombocitos tienen una llamada “proteína microbicida” que puede destruir las bacterias, también esta función de la IDAAT se tiene que valorar como contribución valiosa a la defensa frente a infecciones.

12) La IDAAT mejora la hemostasia

15 a) La IDAAT media en la unión de la trombospondina a trombocitos

Se marcó TSP-1 con FITC y se añadió en una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de trombocitos filtrados por gel (50.000/ μl) en tampón Hepes-Tyrode con BSA. La IDAAT se añadió en concentraciones crecientes y se incubó durante 60 minutos junto con las plaquetas a temperatura ambiente. Se cuantificó la TSP-FITC unida sobre la superficie de los trombocitos en el citómetro de flujo. La IDAAT mediaba en la unión de la trombospondina a trombocitos (véase la Figura 13).

b) La IDAAT fomenta la unión de fibrinógeno a trombocitos

A plaquetas filtradas en gel 50.000/ μl en tampón Hepes-Tyrode BSA o plasma rico en plaquetas anticoagulado con PPACK (50.000/ μl) se le añadió fibrinógeno (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) conjugado con FITC. Las suspensiones de plaquetas se activaron con colágeno tipo I met., como describen Kehrel *et al.*, 1998. Una parte de las pruebas se mezcló con IDAAT en concentraciones crecientes. Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, las plaquetas se fijaron, se lavaron y se determinó de forma cuantitativa la unión de fibrinógeno en el citómetro de flujo. La IDAAT refuerza la unión del fibrinógeno a las plaquetas inducida por la activación por colágeno (véase la Figura 14a).

La adición de trombospondina purificada + IDAAT en concentraciones crecientes por sí misma tenía una característica de activación de plaquetas y condujo a la unión de fibrinógeno a la membrana de las plaquetas (véase la Figura 14b).

35 c) La IDAAT fomenta la adhesión de trombocitos a proteínas de adhesión como trombospondina, fibrinógeno, fibronectina, vitronectina y colágeno.

La adhesión de los trombocitos se realizó de acuerdo con Santoro *et al.*, 1994. Se “recubrieron” placas de microtitulación (96 pocillos) con proteínas de adhesión en una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante una noche a 4°C y las placas se bloquearon mediante BSA. 100 μl de plaquetas filtradas en gel o plasma rico en plaquetas anticoagulado con hirudina (300.000 plaquetas/ μl) se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en una cámara húmeda en los pocillos. Los trombocitos no adheridos se lavaron a conciencia. El número de las plaquetas adheridas se determinó por la lisis de las plaquetas con Triton X-100 y la comprobación de la enzima lisosomal hexosaminidasa.

Para la calibración del ensayo de adhesión, sobre la placa de microtitulación se puso una serie de calibrado con una cantidad creciente conocida de plaquetas y se determinó la extinción del sustrato p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminidasa transformado en proporción al número de plaquetas. La IDAAT aumentó de manera dependiente de la dosis la adhesión de trombocitos a las proteínas de adhesión ensayadas (véase la Figura 15a). Los preparados comerciales de ATIII no mostraron este efecto (véase la Figura 15b).

El aumento de la adhesión de trombocitos por IDAAT es una reacción mediada por integrina ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha\text{IIb}\beta_3$) y CD36 (véase las Figuras 16 y 17).

La adhesión de trombocitos mediada por la IDAAT no está mediada por trombina y por lo tanto también se produce en la sangre anticoagulada con hirudina (véase la Figura 18).

El heparansulfato (0-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y sulfátido (0-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) no inhiben la adhesión mediada por la IDAAT.

La adhesión de trombocitos mediada por la IDAAT es dependiente de iones bivalentes. El EDTA 5 mM inhibe esta adhesión a trombospondina y a colágeno completamente (véase la Figura 19). El Mg^{2+} 20 μM , Ca^{2+} 1 mM u otros iones bivalentes aumentan la adhesión de trombocitos al colágeno mediada por la IDAAT.

La TSP-1 soluble inhibe la adhesión de trombocitos mediada por la IDAAT a colágeno o TSP-1 inmovilizada (véase la Figura 20).

La adición de monocitos a los trombocitos aumenta la adhesión de los trombocitos a trombospondina y a colágeno, mientras que la adición de eritrocitos inhibe la adhesión de trombocitos a TSP y a colágeno (véase la Figura 21).

ES 2 283 432 T3

La adhesión de trombocitos mediada por la IDAAT a trombospondina se puede inhibir completamente mediante el inhibidor de la PI-3-quinasa wortmanina y LY294002 (véase la Figura 22).

d) La IDAAT media en la agregación de trombocitos mediada por la TSP

Se investigaron plaquetas filtradas en gel (200.000/ μ l) en tampón Hepes-Tyrode pH 7,4 con adición de fibrinógeno (100 μ g/ml) en el medidor de la agregación de Born. Mientras que la trombospondina purificada (25 μ g/ml) por sí misma no desencadena agregación, la adición de IDAAT condujo de manera dependiente de la dosis a la agregación, que se reforzó marcadamente por la adición simultánea de TSP y IDAAT (véase la Figura 23).

e) La IDAAT media en la formación de micropartículas de trombocitos

Se activaron plaquetas filtradas en gel con el péptido TSP-1 RFYVVMWK (40 μ M). La formación de micropartículas, después del marcado con un anticuerpo antiGPIX específico de trombocitos conjugado con ficoeritrina según Dörmann *et al.*, 1999, se midió en el citómetro de flujo. La adición de IDAAT condujo de manera dependiente de la dosis a la formación de micropartículas de las plaquetas activadas (véase la Figura 24).

f) La IDAAT media en la asociación de trombocitos y leucocitos

Para la detección en el citómetro de flujo de los asociados de plaquetas-leucocitos, se marcaron los trombocitos con un anticuerpo monoclonal conjugado con FITC contra el antígeno específico de plaquetas GPIX (clon Beb 1) y los monocitos con un anticuerpo monoclonal conjugado con PE contra CD14 (clon:M ϕ P9) en concentraciones de saturación después de la activación celular y la fijación celular. La cuantificación de los asociados se realizó mediante la detección de partículas positivas a CD14 y GPIX. La cantidad porcentual de leucocitos, que se presentaban asociados con plaquetas, se puso en proporción respecto a la población total de leucocitos. Los trombocitos (25.000/ μ l) y monocitos (3000/ μ l) se incubaron juntos durante 30 minutos. Antes, los trombocitos se preincubaron durante 30 minutos con IDAAT y a continuación se lavaron. La IDAAT aumentó el índice de asociación desde un 11,7% a un 17,3% (5 μ g/ml de IDAAT) o 20,5% (10 mg/ml de IDAAT).

13) La IDAAT media en/refuerza la unión de la TSP a células endoteliales

Se incubaron células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1) (3000/ μ l) en medio RPMI 1640 durante 30 minutos a temperatura ambiente con IDAAT o TSP-1 (25 μ g/ml) con IDAAT. Las células endoteliales se fijaron, se lavaron y se detectó la TSP con un anticuerpo monoclonal anti TSP conjugado con PE (clon P10) en el citómetro de flujo. La mediana de la fluorescencia, que refleja la unión del anticuerpo anti TSP, aumentó desde 79 (sin IDAAT) a 138 (5 μ g/ml de IDAAT). La adición de TSP-1 exógena (25 μ g/ml) aumentó la mediana de la fluorescencia a 268 con la adición simultánea de IDAAT (5 μ g/ml) (véase la Figura 25).

14) La IDAAT media en la unión de trombocitos a “perlas” de látex recubiertas de vitronectina

Se recubrieron perlas de látex (3,2 μ m) durante una noche a 4°C con vitronectina activa (25 μ g/ml) y después se lavaron. Las perlas con vitronectina se incubaron con trombocitos filtrados en gel (25.000/ μ l) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de IDAAT durante 1 hora a temperatura ambiente.

Los trombocitos se marcaron con antiGPIX (clon Beb1) y se cuantificaron los asociados de perlas recubiertas de vitronectina con trombocitos en el citómetro de flujo. La IDAAT aumentó de manera dependiente de la dosis la unión de trombocitos a las perlas recubiertas de vitronectina (véase la Figura 26).

15) La IDAAT se compone de ATIII polimerizada

La IDAAT, los agregados de IDAAT-TSP-1, la ATIII comercial y la ATIII comercial con adición de TSP-1 se representaron por microscopía electrónica mediante el método de “Sombreado Rotatorio” según Jander *et al* (1984). La IDAAT se componía de moléculas de ATIII poliméricas, mientras que los preparados comerciales de ATIII presentaban una estructura monomérica (véase las Figuras 27 a y b). La adición de TSP-1 a la IDAAT condujo a la formación de grandes complejos de IDAAT-TSP-1, mientras que esto no se observó con ATIII comercial (véase las Figuras 27 c y d).

16) La IDAAT adquiere nuevas características de unión de proteínas

La IDAAT se une directamente a proteínas, a las que la antitrombina no activada no se puede unir, como CD4 (por ejemplo de las células T) (Figura 28), GP120 del virus de la IH (Figura 29), trombospondina (Figura 30), vitronectina activa (Figura 31), CD36, integrina α _{IIb} β 3. La unión de IDAAT a estas proteínas se realizó mediante ELISA en proteínas purificadas o recombinantes. La purificación de TSP-1, vitronectina activa, integrina α _{IIb} β 3 y CD36 se realizó como se describe por Kehrel *et al.* 1993, Yatohgo *et al.* 1988 y Kronenberg, Grahl y Kehrel 1998.

La producción de IDAAT en el marco de la presente invención se puede realizar, por ejemplo, del siguiente modo:

Se oxida antitrombina III comercial con NaOCl y se pasa por una columna de Sephadex (Ejemplo 1). Antes de la oxidación se puede incubar la antitrombina III preferiblemente con elastasa de granulocitos neutrófilos (véase Ejemplo 2). Antes de la oxidación, al antitrombina III también se puede escindir con metaloproteinasa de matriz (véase Ejemplo 3). La antitrombina III también se puede activar mediante la reacción con defensina 2 (véase Ejemplo 4).

Este método para la producción de IDAAT es otro objeto de la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es el uso de un fármaco de acuerdo con la invención, donde se pueden tratar las enfermedades o afecciones de seres humanos o animales que se enumeran a continuación. El fármaco de acuerdo con la invención se puede usar para la profilaxis y como tratamiento. Son indicaciones las infecciones agudas, particularmente infecciones con agentes etiológicos que se unen directamente o indirectamente a la IDAAT o a otro compuesto de interacción, muy particularmente: el grupo de los virus de la IH, parásitos como *Plasmodium falciparum* y *Pneumocystis carinii*, y bacterias como por ejemplo *Staphylococcus aureus*; mejorar la defensa inmune y como medio para la profilaxis de la sepsis en pacientes con un alto riesgo de infección, como por ejemplo, después de una operación con un alto riesgo de infección, politraumatismos, quemaduras, intoxicaciones, en quimioterapia, en pacientes inmunosuprimidos y pacientes con predisposición de debilidad inmunitaria; para influir mediante medicamentos en reacciones inflamatorias agudas, crónicas o alérgicas, particularmente para la modulación de reacciones inflamatorias en las que los PMNL apoptóticos y los granulocitos eosinófilos se tienen que convertir en inocuos; como tratamiento para combatir el crecimiento y metastatización de tumores; como inhibidor de la angiogénesis para combatir neoangiogénesis no deseada, por ejemplo en tumores o pacientes con retinopatía; como tratamiento de leucemia, particularmente leucemia linfática crónica; para mejorar la cicatrización de heridas, particularmente en heridas que cicatrizan mal y en cirugía plástica; para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso, particularmente en enfermedades en las que se desea un crecimiento de las neuritas; para mejorar la hemostasia, particularmente en pacientes con alteraciones de la coagulación innatas o adquiridas o con trombocitopatías innatas o adquiridas, en terapia con anticoagulantes, o en operaciones con máquina de circulación extracorpórea; para evitar las lesiones tisulares debidas a inflamaciones, por ejemplo en a) reperfusiones (por ejemplo infarto, infarto de miocardio, estrangulamientos) b) trasplantes de órganos (evitar el rechazo de trasplantes) y c) reacciones alérgicas (incl. neurodermitis, asma bronquial).

Cuando el fármaco de acuerdo con la invención se usa para la profilaxis de enfermedades, se puede emplear solo o en combinación con otros compuestos de interacción o con otros medicamentos también como adición en soluciones de lavado, por ejemplo, para boca, vagina, ano y ojos, como adición para la prevención de la transmisión de infecciones durante contactos sexuales (como por ejemplo, condones, diafragmas, etc.) y en soluciones, tiritas y vendas para curar heridas.

El empleo del fármaco de acuerdo con la invención se puede concebir local, intradérmico, superficial, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, oral o mediante vesículas en una de las formas de administración que se han mencionado anteriormente.

La presente invención también comprende otros tipos posibles de administración.

La presente invención se describe a continuación mediante las Figuras y la descripción de las mismas:

Figura 1: La IDAAT media en la unión de TSP-1 a monocitos

Se marcaron monocitos positivos a TSP-1 con el anticuerpo monoclonal anti TSP clon P10, que estaba conjugado con ficoeritrina, y se midió la fluorescencia de los monocitos en el citómetro de flujo

- a) 3000 monocitos medidos: monocitos con tampón Hepes-Tyrode pH 7,4 incubados 30 min; lavados y marcados con P10-PE.
- b) 3000 monocitos medidos: monocitos con TSP-1 (10 $\mu\text{g/ml}$) en tampón Hepes-Tyrode pH 7,4 incubados 30 min a TA; lavados y marcados con P10-PE.
- c) 3000 monocitos medidos: monocitos con TSP-1 (10 $\mu\text{g/ml}$) e IDAAT (10 $\mu\text{g/ml}$) en tampón Hepes-Tyrode pH 7,4 incubados 30 min a TA; lavados y marcados con P10-PE.
- d) monocitos con y sin adición de TSP-1 (10 $\mu\text{g/ml}$) con IDAAT incubados en concentraciones crecientes (véase arriba); la IDAAT media en la unión de TSP-1 añadida exógenamente y presente endógenamente.

Figura 2: La IDAAT media en la unión de TSP-1 a granulocitos polimorfonucleares apoptóticos (PMNL)

- a) Los PMNL se convirtieron por incubación en medio de cultivo celular durante 24 horas en el incubador según Savill *et al.*, 1992 en apoptóticos. Los PMNL apoptóticos se incubaron 30 min con tampón Hepes-Tyrode pH 7,4, se lavaron, se marcaron con AC anti TSP P10-PE y se midió la fluorescencia de 3000 células mediante un citómetro de flujo.

ES 2 283 432 T3

b) Los PMNL se convirtieron por incubación en medio de cultivo celular durante 24 horas en el incubador según Savill *et al.*, 1992 en apoptóticos. Los PMNL apoptóticos se incubaron 30 min con TSP-1 (5 $\mu\text{g/ml}$) e IDAAT (10 $\mu\text{g/ml}$) en tampón Hepes-Tyrode pH 7,4, se lavaron, se marcaron con AC TSP P10-PE y se midió la fluorescencia de 3000 células mediante un citómetro de flujo.

c) Realización de forma análoga a a y b: Se emplea la IDAAT en concentraciones crecientes. La IDAAT media en la unión de trombospondina presente endógenamente y añadida exógenamente (10 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 3: La IDAAT une los PMNL apoptóticos con monocitos mediante TSP

Se incubaron PMNL purificados y monocitos purificados juntos con TSP e IDAAT a diferentes concentraciones durante 30 min a TA y las células se fijaron. Los PMNL se marcaron con un anticuerpo monoclonal conjugado con FITC contra CD16b y los monocitos con anti CD14-PE. Los asociados positivos a PE y FITC se midieron con el citómetro de flujo.

Figura 4: En cámaras de cultivo celular "Transwell" (Costar, Bodenheim) se puso respectivamente una bandeja "Transwell" recubierta de una membrana microporosa de policarbonato por cada una de las 24 cavidades. La membrana de policarbonato, con un tamaño de poros de 5 μm , se recubrió con fibronectina y sobre ella se cultivaron células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1) hasta la confluencia.

Se pusieron monocitos aislados por centrifugación en gradiente de densidad (200 μl con 2×10^7 células/ml en DMEM de sangre periférica) después de un día en cultivo en la anterior bandeja "Transwell" y se incubaron durante 4 horas a 37°C, CO₂ al 7% con la monocapa de HMEC-1. Como medida para la velocidad de trans migración se determinó el número de los monocitos en el compartimento "Transwell" inferior debajo de la bandeja "Transwell".

Para investigar la influencia de diferentes preparados de ATIII sobre la velocidad de trans migración de los monocitos, se preincubaron monocitos o células endoteliales durante 10 min con las sustancias de ensayo y se lavaron o se añadieron las sustancias de ensayo al medio en la cámara de "Transwell" anterior y las sustancias de ensayo se dejan allí durante todo el ensayo de trans migración. En esta Figura se representa la adición al medio durante la trans migración.

Después de 4 horas de trans migración se retiraron las bandejas cuidadosamente, la placa de cultivo celular se puso sobre hielo durante 30 min para el desprendimiento de los monocitos adheridos y se recontó el número de monocitos trans migrados.

Figura 5: La IDAAT activa monocitos y provoca una señal de Ca²⁺. La metodología empleada se representó detalladamente en la descripción del Ejemplo.

Figura 6: La IDAAT media en la unión de TSP-1 a células T

Se incubaron células T humanas (células Jurkat) durante 1 hora a TA con IDAAT o IDAAT con TSP-1 en las concentraciones indicadas. La TSP-1 unida a las células T se marcó con el anticuerpo monoclonal anti TSP conjugado con PE (clon P10) y se midió en el citómetro de flujo. La IDAAT media en la unión de TSP presente endógenamente y añadida exógenamente a células T.

- sin adición de TSP-1; sin adición de IDAAT; marcado con AC anti TSP-PE.
- adición de TSP-1 (25 $\mu\text{g/ml}$); sin adición de IDAAT; marcado con AC anti TSP-PE.
- adición de TSP-1 (25 $\mu\text{g/ml}$); adición de IDAAT (1 $\mu\text{g/ml}$); marcado con AC anti TSP-PE.
- adición de TSP-1 (25 $\mu\text{g/ml}$); adición de IDAAT (5 $\mu\text{g/ml}$); marcado con AC anti TSP-PE.
- Con/sin TSP-1 (25 $\mu\text{g/ml}$); IDAAT en concentraciones crecientes; marcado con AC anti TSP-PE.

Figura 7: La IDAAT refuerza el efecto activador de fLMF sobre el estallido oxidativo de PMNL.

- fLMF desencadena de manera dependiente de la dosis el estallido oxidativo de los PMNL.
- La IDAAT aumenta el estallido oxidativo desencadenado por fLMF y es, independiente de otros agonistas, por sí misma capaz de inducir el estallido oxidativo en PMNL.

Figura 8: La IDAAT inhibe la liberación de interleucina 12 activa por los monocitos activados con interferón γ + *S. aureus*. La metodología empleada se representó en la descripción del Ejemplo detalladamente.

Figura 9: La secreción de IL-10 por los monocitos activados con *S. aureus* e interferón γ aumenta mediante la IDAAT. De este modo, la IDAAT fomenta la secreción de una interleucina, que en experimentación animal protege de letalidad inducida por LPS. La metodología empleada se realizó de forma análoga a la Figura 8. La IL-10 se determinó mediante ELISA.

ES 2 283 432 T3

Figura 10: La secreción de TNF α por monocitos activados con *S. aureus* e interferón γ se inhibe por el péptido TSP-1 RFYVVMWK (10a). LA IDAAT aumenta el efecto inhibitor del péptido TSP-1 (25 μ M) (10b). El TNF α se determinó mediante ELISA. La metodología empleada se realizó de forma análoga a la Figura 8.

5 Figura 11: La IDAAT inhibe la reacción de Arthus en la oreja de ratones Balb-C

a) ratones tratados dos veces en el momento 0 y 0 + 3 horas respectivamente con 50 μ g de IDAAT i. p.. Reacción de Arthus en la oreja izquierda.

10 b) ratones tratados dos veces con el tampón control i. p.. Reacción de Arthus en la oreja izquierda.

c) BSA-FITC que ha penetrado en las orejas como medida de la reacción de Arthus en ratones tratados con IDAAT o tampón control. Reacción de Arthus en la oreja izquierda.

15 Figura 12:

a) representación en diagrama de puntos de la asociación de trombocitos-bacterias.

A: trombocitos marcados con anticuerpo antiGPIX (Beb 1) conjugado con PE

20

B: bacterias (*S. aureus*) marcadas con Syto 13

C: Ambos asociados de bacterias-trombocitos emisores de fluorescencia

25 b) Asociados de *S. aureus* (Cowan 1)-trombocitos

Uso de los trombocitos de los pacientes A. P. y W. K. con “síndrome de plaquetas Grises”. El aumento del índice de asociación por la activación con trombina está ausente en el uso de plaquetas “grises”, a las que les falta la trombospondina-1.

30

**p < 0,005

***p < 0,0001

35 c) La formación de asociados de *S. aureus* (Cowan-1)-trombocitos aumenta por la IDAAT. La adición suplementaria de TSP-1 conduce a un aumento adicional del número de asociados.

40 Figura 13: Se conjugó TSP-1 purificada que contenía Ca²⁺ de trombocitos humanos con FITC (TSP-1-FITC) y se añadió a las plaquetas filtradas en gel. Este sedimento se incubó durante 1 hora a TA con IDAAT (2 μ g/ml y 5 μ g/ml) y se midió en el citómetro de flujo (5000 trombocitos)

Figura 14:

45 a) Se mezclaron trombocitos humanos filtrados en gel (50.000/ μ l) con 150 μ /ml de fibrinógeno conjugado con FITC y se incubaron con colágeno en concentraciones crecientes en ausencia o presencia de IDAAT (5 μ g/ml). Después de una incubación de 30 minutos se midieron los trombocitos en el citómetro de flujo.

50 b) Se mezclaron trombocitos humanos filtrados en gel (50.000/ μ l) con 150 μ /ml de fibrinógeno conjugado con FITC e IDAAT sin TSP o con TSP-1 (10 μ g/ml) se añadieron en concentraciones crecientes. Después de una incubación de 1 hora se midieron los trombocitos en el citómetro de flujo.

Figura 15:

55 a) La IDAAT aumenta la adhesión de trombocitos a proteínas de adhesión: fibronectina, vitronectina, fibrinógeno, trombospondina-1 y colágeno

b) Comparación de IDAAT y preparados comerciales de ATIII respecto al efecto de la adhesión de plaquetas. La metodología empleada se representó detalladamente en la descripción del Ejemplo.

60 Figura 16:

a) La adhesión de trombocitos a trombospondina-1 inmovilizada mediada por la IDAAT se inhibió mediante integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ (5 μ g/ml) o $\alpha_v\beta_3$ (5 μ g/ml) solubles completamente. La metodología empleada se representó detalladamente en la descripción del Ejemplo.

65

b) La adhesión de trombocitos a vitronectina inmovilizada mediada por la IDAAT se inhibió parcialmente por integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ (5 μ g/ml) o $\alpha_v\beta_3$ (5 μ g/ml) solubles. La metodología empleada se representó detalladamente en la descripción del Ejemplo.

ES 2 283 432 T3

Figura 17: La adhesión de trombocitos a TSP-1 inmovilizada mediada por IDAAT se inhibe completamente por el anticuerpo específico de CD36 clon 37, con bloqueo simultáneo del receptor del Fc por IV.3. El bloqueo solamente del receptor del Fc no tiene influencia. La metodología empleada se representó detalladamente en la descripción del Ejemplo.

Figura 18: La adhesión de trombocitos mediada por la IDAAT se realizó con plasma rico en plaquetas anticoagulado con hirudina (20 U/ml). La metodología empleada se representó detalladamente en la descripción del Ejemplo.

Figura 19: La adhesión de trombocitos a TSP1 mediada por la IDAAT es dependiente de iones bivalentes.

El EDTA (5 mM) inhibe completamente este efecto de la IDAAT. El Ca^{2+} 1 mM aumenta este efecto de la IDAAT marcadamente. La metodología empleada se representó detalladamente en la descripción del Ejemplo.

Figura 20: La adición de TSP-1 soluble inhibe la adhesión de trombocitos a colágeno de manera dependiente de la dosis, mientras que la IDAAT, que inmoviliza la TSP-1, aumenta la adhesión de trombocitos a colágeno de manera dependiente de la dosis. La metodología empleada se representó detalladamente en la descripción del Ejemplo.

Figura 21: La adición de monocitos (100/ μl) a trombocitos (300.000/ μl) aumenta la adhesión de trombocitos a TSP-1, mientras que la adición de eritrocitos (20.000/ μl) tiene un efecto inhibitorio. La metodología empleada se representó detalladamente en la descripción del Ejemplo.

Figura 22: La adhesión de trombocitos inducida por la IDAAT se inhibió por inhibidores de la PI-3-quinasa wortmanina (20 nM) y LY294002 (50 μM). La wortmanina y LY294002 para ello se preincubaron durante 10 min antes de la adición de la IDAAT.

Figura 23: La IDAAT produce la agregación de trombocitos mediada por trombospondina

La agregación de trombocitos se realizó según Born 1962. A plaquetas filtradas en gel (200.000/ μl) en tampón Hepes-Tyrode pH 7,4 con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fibrinógeno se pipeteó, en una cubeta de agregación, TSP-1 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La TSP-1 soluble no desencadenó agregación. La adición de IDAAT condujo a una débil reacción de agregación. La adición simultánea de IDAAT y TSP-1 soluble condujo a una fuerte formación de agregados.

Figura 24: La IDAAT media en la formación de micropartículas de trombocitos

Se añadieron plaquetas filtradas en gel (50.000/ μl) al péptido TSP-1 RFYVVMWK (40 μM) activado e IDAAT en concentraciones crecientes. Después de 30 min de incubación se marcaron las plaquetas y las micropartículas producidas a partir de las plaquetas con anti GPIX-PE y se midió la cantidad de las micropartículas producidas en relación a 5000 plaquetas contadas en el citómetro de flujo.

Figura 25: La IDAAT media en la unión de TSP-1 a células endoteliales

La metodología se representó detalladamente en la descripción del Ejemplo. La IDAAT aumenta la unión de la TSP-1 a células endoteliales.

Figura 26: La IDAAT aumenta la unión de trombocitos a perlas de látex recubiertas de vitronectina. La metodología se representó detalladamente en la descripción del Ejemplo.

Figura 27:

- a) La IDAAT se compone de ATIII polimérica, representada con el método de microscopía electrónica "sombreado rotatorio".
- b) La ATIII comercial se compone de moléculas monoméricas globulares; imagen de microscopía electrónica después de aplicación por vaporización con rotación.
- c) La IDAAT (1 mg/ml) y TSP-1 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se incubaron juntas durante 1 hora a TA. La IDAAT y TSP-1 juntas forman grandes asociados; imagen de microscopía electrónica después de aplicación por vaporización con rotación.
- d) ATIII comercial (1 mg/ml) y TSP-1 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se incubaron juntas durante 1 hora a TA. La ATIII comercial y la TSP-1 no reaccionaron juntas; imagen de microscopía electrónica después de aplicación por vaporización con rotación

Figura 28: La IDAAT se une directamente a CD4

Se unió CD4 recombinante (1 $\mu\text{g}/100$ μl /pocillo) al fondo de una placa de ELISA (Nunc-Maxisorb). La placa se lavó a conciencia con PBS pH 7,4, Tween 20 al 0,5% y los sitios libres sobre la superficie del plástico se bloquearon con BSA al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se volvió a lavar y a continuación se añadió IDAAT o

ES 2 283 432 T3

ATIII comercial en concentraciones crecientes de entre 0-5 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiraron las soluciones de ATIII, se lavó la placa a conciencia y se incubó con un anticuerpo policlonal mono específico contra ATIII del conejo (DAKO, Hamburgo) en una dilución de 1:15000 en PBS, NGS (suero normal de cabra) al 1%. La placa se volvió a lavar y a continuación se incubó con un anticuerpo de cabra contra IgG de conejo purificado por afinidad, que estaba conjugado con peroxidasa (BIORAD, Munich) en una dilución de 1:3000. La placa se lavó varias veces y se mezcló con solución de sustrato (100 $\mu\text{l/pocillo}$) (20 mg orto-fenildiamina, H_2O_2 al 5% en un tampón de 12,15 ml de ácido cítrico 0,1 M y 12,85 ml de Na_2HPO_4 0,2 M con 25 ml de agua destilada).

La extinción medida a 405 nm en el fotómetro de ELISA refleja la cantidad de antitrombina unida. La reacción se paró con 50 $\mu\text{l/pocillo}$ de H_2SO_4 4 N y se midió la extinción a 490 nm. La reacción muestra claramente que la IDAAT no solo produce la TSP-1, sino que también se puede unir directamente a CD4.

Figura 29: La IDAAT se une directamente a GP120 del VIH

Se unió GP120 recombinante del VIH (1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l/pocillo}$) al fondo de una placa de ELISA (Nunc-Maxisorb). La placa se lavó a conciencia con PBS pH 7,4, Tween 20 al 0,05% y los sitios libres sobre la superficie del plástico se bloquearon con BSA al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se volvió a lavar y a continuación se añadió IDAAT o ATIII comercial en concentraciones crecientes de entre 0-5 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiraron las soluciones de ATIII, se lavó la placa a conciencia y se incubó con un anticuerpo policlonal mono específico contra ATIII del conejo (DAKO, Hamburgo) en una dilución de 1:15000 en PBS, NGS (suero normal de cabra) al 1%. La placa se volvió a lavar y a continuación se incubó con un anticuerpo de cabra contra IgG de conejo purificado por afinidad, que estaba conjugado con peroxidasa (BIORAD, Munich) en una dilución de 1:3000. La placa se lavó varias veces y se mezcló con solución de sustrato (100 $\mu\text{l/pocillo}$) (20 mg orto-fenildiamina, H_2O_2 al 5% en un tampón de 12,15 ml de ácido cítrico 0,1 M y 12,85 ml de Na_2HPO_4 0,2 M con 25 ml de agua destilada).

La extinción medida a 405 nm en el fotómetro de ELISA refleja la cantidad de antitrombina unida. La reacción se paró con 50 $\mu\text{l/pocillo}$ de H_2SO_4 4 N y se midió la extinción a 490 nm. La reacción muestra claramente que la IDAAT no solo produce la TSP-1, sino que también se puede unir directamente a GP120 del VIH.

Figura 30: La IDAAT se une directamente a trombospondina

Se unió trombospondina-1 purificada (1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l/pocillo}$) al fondo de una placa de ELISA (Nunc-Maxisorb). La placa se lavó a conciencia con PBS pH 7,4, Tween 20 al 0,05% y los sitios libres sobre la superficie del plástico se bloquearon con BSA al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se volvió a lavar y a continuación se añadió IDAAT o ATIII comercial en concentraciones crecientes de entre 0-5 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiraron las soluciones de ATIII, se lavó la placa a conciencia y se incubó con un anticuerpo policlonal mono específico contra ATIII del conejo (DAKO, Hamburgo) en una dilución de 1:15000 en PBS, NGS (suero normal de cabra) al 1%. La placa se volvió a lavar y a continuación se incubó con un anticuerpo de cabra contra IgG de conejo purificado por afinidad, que estaba conjugado con peroxidasa (BIORAD, Munich) en una dilución de 1:3000. La placa se lavó varias veces y se mezcló con solución de sustrato (100 $\mu\text{l/pocillo}$) (20 mg orto-fenildiamina, H_2O_2 al 5% en un tampón de 12,15 ml de ácido cítrico 0,1 M y 12,85 ml de Na_2HPO_4 0,2 M con 25 ml de agua destilada).

La extinción medida a 405 nm en el fotómetro de ELISA refleja la cantidad de antitrombina unida. La reacción se paró con 50 $\mu\text{l/pocillo}$ de H_2SO_4 4 N y se midió la extinción a 490 nm. La reacción muestra claramente que la IDAAT se puede unir directamente a TSP-1.

Figura 31: La IDAAT se une directamente a vitronectina (forma activa)

Se unió vitronectina (1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l/pocillo}$) al fondo de una placa de ELISA (Nunc-Maxisorb). La placa se lavó a conciencia con PBS pH 7,4, Tween 20 al 0,05% y los sitios libres sobre la superficie del plástico se bloquearon con BSA al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se volvió a lavar y a continuación se añadió IDAAT o ATIII comercial en concentraciones crecientes de entre 0-5 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiraron las soluciones de ATIII, se lavó la placa a conciencia y se incubó con un anticuerpo policlonal mono específico contra ATIII del conejo (DAKO, Hamburgo) en una dilución de 1:15000 en PBS, NGS (suero normal de cabra) al 1%. La placa se volvió a lavar y a continuación se incubó con un anticuerpo de cabra contra IgG de conejo purificado por afinidad, que estaba conjugado con peroxidasa (BIORAD, Munich) en una dilución de 1:3000. La placa se lavó varias veces y se mezcló con solución de sustrato (100 $\mu\text{l/pocillo}$) (20 mg orto-fenildiamina, H_2O_2 al 5% en un tampón de 12,15 ml de ácido cítrico 0,1 M y 12,85 ml de Na_2HPO_4 0,2 M con 25 ml de agua destilada). La extinción medida a 405 nm en el fotómetro de ELISA refleja la cantidad de antitrombina unida. La reacción se paró con 50 $\mu\text{l/pocillo}$ de H_2SO_4 4 N y se midió la extinción a 490 nm. La reacción muestra claramente que la IDAAT se puede unir directamente a vitronectina activa.

Producción de IDAAT

Ejemplo 1

Se obtuvo antitrombina III no activada, no funcional en el sentido descrito, de Calbiochem, Sigma, Enzyme Research Laboratories, Pharmacia & Upjohn, Aventis, Baxter o Grifols, o se purificó de plasma humano. Se substituyó el

ES 2 283 432 T3

tampón de los preparados de antitrombina por solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4. Se llevaron 348 μg de antitrombina pura con PBS pH 7,4 y EDTA 0,1 mM hasta un volumen de 1 ml y la solución se enfrió sobre hielo. Se añadió NaOCl (832 μg) frío a un volumen de 10 μl y el sedimento se incubó durante 10 minutos sobre hielo. La reacción se terminó mediante filtración inmediata en gel a 4°C por Sephadex G25 (columnas PD10).

5 Ejemplo 2

Se sustituyó el tampón de antitrombina III no activada por PBS pH 8,0. Se mezclaron 500 μg de antitrombina III pura con 50 μg de elastasa de granulocitos neutrófilos (HNE) (humana, diluida en 50 μl de tampón) y el sedimento (500 μl de volumen) se incubó durante 16 horas a 37°C. La reacción se paró con fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM (concentración final) y se sustituyó el tampón de la antitrombina III con el método Centricon por PBS/ EDTA 0,1 mM pH 7,4. A continuación se realizó una oxidación con NaOCl como se describe en el Ejemplo 1.

15 Ejemplo 3

Se sustituyó el tampón de antitrombina III no activada por PBS pH 8,0. Se mezclaron 500 μg de antitrombina III pura con 12,4 μg de metaloproteínasa de matriz-2 (MMP-2) (disuelta en NaCl al 0,9%) en tampón Tris 25 mM/HCl/ NaCl 30 mM /Ca²⁺ 10 mM. Para activar la MMP-2 se pretrató durante 2 horas a TA con APMA (acetato de 4-aminofenilmercurio) 1 mM. El sedimento (500 μl volumen) se incubó durante 16 horas a 37°C. Se sustituyó el tampón de la antitrombina III con el método Centricon por PBS pH 7,4.

Ejemplo 4

25 Se sustituyó el tampón de la antitrombina III no activada por PBS pH 8,0. Se incubaron 200 μg de antitrombina III pura con defensina 2 (HNP-2, disuelta en NaCl al 0,9%, concentración final 10 μM) en PBS pH 8,0 durante 1 hora a TA.

Referencias

30 1. **Armant M, Avice MN, Hermann P, Rubio M, Kiniwa M, Delespesse G, Sarfati M:** CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* 190: 1175-1182, 1999.

35 2. **Asch AS, Liu 1, Briccetti FM, Barnwell JW, Kwakye-Berko F, Dokun A, Goldberger J, Pernambuco M:** Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of a ectodomain. *Science* 262: 1436-1440, 1993.

40 3. **Barnes DA, Tse J, Kaufhold M, Owen M, Hesseigesser J, Strieter R, Horuk R, Perez HD:** Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model. *J. Clin. Invest* 101: 2910-29199 1998.

4. **Born GV:** [The blood platelets in thrombogenesis. The mechanism and inhibition of the aggregation of blood platelets]. *Actual. Pharmacol.* (Paris) 18: 17-32, 1965.

45 5. **Bornstein P, Devarayalu S, Li P, Disteche CM, Framson P:** A second thrombospondin gene in the mouse is similar in organization to thrombospondin 1 but does not respond to serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88: 8636-8640, 1991.

50 6. **Bornstein P:** Thrombospondins: structure and regulation of expression [published erratum appears in FASEB J 1993 Jan;7 (1):237]. *FASEB J.* 6: 3290-3299, 1992.

7. **Chung J, Gao AG, Frazier WA:** Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *J. Biol. Chem.* 272: 14740-14746, 1997.

55 8. **Chung J, Wang XQ, Lindberg FP, Frazier WA:** Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ -mediated platelet activation. *Blood* 94: 642-6489 1999.

9. **Crawford SE, Stelimach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N:** Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β1 *in vivo*. *Cell* 93: 1159-1170, 1998.

60 10. **Crombie R, Sitverstein RL, MacLow C, Pearce SFA, Nachman RL, Laurence J:** Identification of a CD36-related thrombospondin 1-binding domain in HIV-1 envelope glycoprotein gp120: relationship to HIV-1-specific inhibitory factors in human saliva. *J. Exp. Med.* 187: 25-35, 1998.

65 11. **Dardik R, Lahav J:** Functional changes in the conformation of thrombospondin-1 during complexation with fibronectin or heparin. *Exp. Cell Res.* 248: 407-414, 1999.

12. **Demeure CE, Tanaka H, Mateo V, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M:** CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* 164: 2193-2199, 2000.

13. **Dickneite G, Paques EP**: Reduction of mortality with antithrombin 111 in septicemic rats: a study of *Klebsiella pneumoniae* induced sepsis. *Thromb. Haemost.* 69: 98-102, 1993.
14. **Dörmann D, Kardoeus J, Zimmermann RE, Kehrel B**: Flow cytometric analysis of agonist-Induced annexin V, factor Va and factor Xa binding to human platelets. *Platelets* 9: 171-177 1998.
15. **Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM**: Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest* 101: 890-8982, 1998.
16. **Galvin NJ, Dixit VM, O'Rourke KM, Santoro SA, Grant GA, Frazier WA**: Mapping of epitopes for monoclonal antibodies against human platelet thrombospondin with electron microscopy and high sensitivity amino acid sequencing. *J. Cell Biol.* 101: 1434-1441, 1985.
17. **Geiser AG, Letterio JJ, Kulkarni AB, Karlsson S, Roberts AB, Sporn MB**: Transforming growth factor beta 1 (TGF. beta 1 controls expression o major histocompatibility genes in the postnatal mouse: aberrant histocompatibility antigen expression in the pathogenesis of the TGF beta 1 null mouse phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90: 9944-9948, 1993.
18. **Higazi AA, Upson RH, Cohen RL, Manuppello J, Bognacki J, Henkin J, McCrae KR, Kounnas MZ, Strickland DK, Preissner KT, Lawler J, Cines DB**: Interaction of single-chain urokinase with its receptor induces the appearance and disappearance of binding epitopes within the resultant complex for other cell surface proteins. *Blood* 88:542-5511, 1996.
19. **Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Krutzsch HC, Lawler J, Roberts DD**: Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation* 100: 1423 14311, 1999.
20. **Jander R, Troyer D, Rauterberg J**: A collagen-like glycoprotein of the extracellular matrix is the undegraded form of typeVI collagen. *Biochemistry* 23: 3675-3681, 1984.
21. **Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N**: Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat. Med.* 6: 41-48, 2000.
22. **Kainoh M, Imai R, Umetsu T, Hattori M, Nishio S**: Prostacyclin and beraprost sodium as suppressors of activated rat polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 39: 477-4841, 1990.
23. **Kaplan HJ, Leibole MA, Tezei T, Ferguson TA**: Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath theretina. *Nat. Med.* 5: 292-297, 1999.
24. **Kappe S, Bruderer T, Gantt S, Fujioka H, Nussenzweig V, Menard R**: Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J. Cell Biol.* 147: 937-9441, 1999.
25. **Kehrel B, Balleisen L, Kokott R, Mesters R, Stenzinger W, Clemetson KJ, Van de LJ**: Deficiency of intact thrombospondin and membrane glycoprotein Ia en platelets with defective collagen-induced aggregation and spontaneous loss of disorder. *Blood* 71: 1074-10787, 1988.
26. **Kehrel B, Kronenberg A, Schwippert B, Niesing-Bresch D, Niehues U, Tschope D, Van de LJ, Clemetson KJ**: Thrombospondin binds normally to glycoproteinIIb deficient platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 985-991, 1991.
27. **Kehrel B, Flicker E**: Thrombospondin in Pathophysiology Thrombospondin in Relation with Disease Processes, en Lahav J (ed): Thrombospondin. Boca Raton, *CRC Press*, 1993, págs. 199-207.
28. **Kehrel B, Flicker E, Wigbels B, Osterfeld M, Van de LJ, Luscher EF**: Thrombospondin measured in whole blood-a indicator of platelet activation. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 7: 202-205, 1996.
29. **Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, Barnes MJ**: Glycoprotein VI is a major Collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and de Willebrand factor do not. *Blood* 91: 491-4991, 1998.
30. **Kielbassa K, Schmitz C, Gerke V**: Disruption of endothelial microfilaments selectively reduces the transendothelial migration of monocytes. *Exp. Cell Res.* 243: 129-141, 1998.
31. **Kronenberg A, Grahl H, Kehrel B**: Human platelet CD36 (BPIIIb, GPIV) binds to cholesteryl-hemisuccinate and can be purified by a simple two-step method making use of this property. *Thromb. Haemost.* 79: 1021-1024, 1998.

32. **Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S:** Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90: 770-774, 1993.
- 5 33. **Kulkarni AB, Karisson S:** Inflammation and TGF beta 1: lessons from the TGF beta 1 null mouse. *Res. Immunol.* 148: 453-456, 1997.
34. **Lawler J, Hynes RO:** The structure of human thrombospondin, a adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J. Cell Biol.* 103: 1635-1648, 1986.
- 10 35. **Lawler J:** The structural and functional properties of thrombospondin. *Blood* 67: 1197-1209, 1986.
36. **Lawler J, Weinstein R, Hynes RO:** Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J. Cell Biol.* 107: 2351-2361, 1988.
- 15 37. **Lawler J, Duquette M, Urry L, McHenry K, Smith TF:** The evolution of the thrombospondin gene family. *J. Mol. Evol.* 36: 509-516, 1993.
38. **Lawler J, Sunday M, Thibert V, Duquette M, George EL, Rayburn H, Hynes RO:** Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J. Clin. Invest* 101: 9829921, 1998.
- 20 39. **Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Dang H, Kong L, Nakabayashi T, Mackall CL, Gress RE, Roberts AB:** Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J. Clin. Invest* 98: 2109-2119, 1996.
- 25 40. **Leung LL, Li WX, McGregor JL, Albrecht G, Howard RJ:** CD36 peptides enhance or inhibit CD36-thrombospondin binding. A two-step process of ligand-receptor interaction. *J. Biol. Chem.* 267: 18244-18250, 1992.
- 30 41. **Li DQ, Lundberg F, Ljungh A:** Binding of von Willebrand factor by coagulase-negative staphylococci. *J. Med. Microbiol.* 49: 217-2259, 2000.
42. **Lindstedt KA, Kokkonen JO, Kovanen PT:** Soluble heparin proteoglycans released from stimulated mast cells induce uptake of low density lipoproteins by macrophages via scavenger receptor-mediated phagocytosis. *J. Lipid Res.* 33: 65-75, 1992.
- 35 43. **Mateo V, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, Sarfati M:** CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med.* 5: 1277-1284, 1999.
- 40 44. **Munjai ID, Crawford DR, Blake DA, Sabet MD, Gordon SR:** Thrombospondin: biosynthesis, distribution, and changes associated with wound repair in corneal endothelium [errata publicada aparece en Eur J Cell Biol 1991 Aug. 55 (2):IV]. *Eur. J. Cell Biol.* 52: 252-263, 1990.
- 45 45. **Murphy-Ullrich JE, Gurusiddappa S, Frazier WA, Hook M:** Heparin-binding peptides from thrombospondins 1 and 2 contain focal adhesion labilizing activity. *J. Biol. Chem.* 268: 26784-26789, 1993.
46. **Nakamura T, Amano A, Nakagawa I, Hamada S:** Specific interactions between *Porphyromonas gingivalis fimbriae* and human extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 175: 267-272, 1999.
- 50 47. **Patthy L:** Detecting distant homologies of mosaic proteins. Analysis of the sequences of thrombospondin, thrombospondin complement components C9, C8 alpha and C8 beta, vitronectin and plasma cell Membrane glycoprotein PC-1. *J. Mol. Biol.* 202: 689-6969, 1988.
- 55 48. **Roberts DD, Sherwood JA, Spitalnik SL, Panton LJ, Howard RJ, Dixit VM, Frazier WA, Miller LH, Ginsburg V:** Thrombospondin binds *falciparum malaria* parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. *Nature* 318: 64-66, 1985.
49. **Roberts DD:** Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J.* 10: 1183-1191, 1996.
- 60 50. **Santoro SA, Zutter MM, Wu JE, Staatz WD, Saelman EU, Keely PJ:** Analysis of collagen receptors. *Methods Enzymol.* 245: 147-1839, 1994.
51. **Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C:** Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Clin. Invest* 90: 1513-1522, 1992.
- 65

52. **Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE**: Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism [published erratum appears in *J Cell Biol* 1993 Sep; 122 (5): following 1143]. *J. Cell Biol.* 122: 923-932, 1993.
- 5 53. **Schultz-Cherry S, Lawler J, Murphy-Ullrich JE**: The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 269: 26783-26788, 1994.
54. **Shafiee A, Penn JS, Krutzsch HC, Inman JK, Roberts DD, Blake DA**: Inhibition of retinal angiogenesis by peptides derived from thrombospondin1. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:2378-23881, 2000.
- 10 55. **Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D**: Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359: 693-699, 1992.
- 15 56. **Silverstein RL, Nachman RL**: Thrombospondin-plasminogen interactions: modulation of plasmin Generation. *Semin. Thromb. Hemost.* 13:335-342, 1987.
57. **Silverstein RL, Nachman RL, Pannell R, Gurewich V, Harpel PC**: Thrombospondin forms complexes with single-chain and two-chain forms of urokinase [errata publicada aparece en *J Biol Chem* 1990 Sep 15; 265 (26): 16025]. *J. Biol. Chem.* 265: 11289-11294, 1990.
- 20 58. **Sozzani S, Molino M, Locati M, Luini W, Cerletti C, Vecchi A, Mantovani A**: Receptor-activated calcium influx in human monocytes exposed to monocyte chemotactic protein-1 and related cytokines. *J. Immunol.* 150:1544-15531 1993.
- 25 59. **Stangl K, Dschietzig T, Alexiou K, Brunner F**: Antithrombin increases pulmonary endothelins: inhibition by heparin and Ca²⁺ channel antagonism. *Eur. J. Pharmacol.* 370: 57-61, 1999.
60. **Steinhauser ML, Hogaboam CM, Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL**: Multiple roles for IL-12 in a model of acute septic peritonitis. *J. Immunol.* 162: 5437-5443, 1999.
- 30 61. **Stern M, Savill J, Hasielt C**: Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. *Am. J. Pathol.* 149:911-921, 1996.
- 35 62. **Sulaiman IM, Lal AA, Arrowood MJ, Xiao L**: Biallelic polymorphism in the intron region of beta-tubulin gene of *Cryptosporidium* parasites. *J. Parasitol.* 85:154-157, 1999.
63. **Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Okabe H, Takatsuki K**: Attenuation of endotoxin-induced pulmonary vascular injury by antithrombin 111. *Am. J. Physiol* 270:L921-L930, 1996.
- 40 64. **Watkins SC, Lynch GW, Kane LP, Slayter HS**: Thrombospondin expression in traumatized skeletal muscle. Correlation of appearance with post-trauma regeneration. *Cell Tissue Res.* 261: 73-84t 1990.
- 45 65. **Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, Robson KJ, Janse CJ, Bistoni F, Waters AP, Crisanti A**: The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *EMBO J.* 18: 5195-5204, 1999.
66. **Yamauchi T, Umeda F, Inoguchi T, Nawata H**: Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 1404-1411, 1989.
- 50 67. **Yatohgo T, Izumi M, Kashiwagi H, Hayashi M**: Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography. *Cell Struct. Funct.* 13: 281-292, 1988.
- 55 68. **Yehualaeshet T, O'Connor R, Green-Johnson J, Mai S, Silverstein R, Murphy-Ullrich JE, Khalil N**: Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *Am. J. Pathol.* 155: 841-851, 1999.
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

1. Un medicamento que contiene antitrombina III activada por oxidación (IDAAT) o péptidos IDAAT.

5 2. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la oxidación se realiza por tratamiento con NaOCl.

10 3. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque es IDAAT recombinante o péptidos o análogos de la misma.

4. El medicamento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes,

caracterizado porque contiene otras sustancias auxiliares y/o de soporte farmacéuticamente aceptables.

15 5. El medicamento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes,

caracterizado porque se formula para la administración local, intradérmica, superficial, intraperitoneal, intravenosa, oral o intramuscular, o se administra mediante vesículas.

20 6. El medicamento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes,

caracterizado porque contiene otras sustancias, como por ejemplo antibióticos, u otros componentes de interacción de la IDAAT en el cuerpo.

25 7. El medicamento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 para la profilaxis o terapia de infecciones agudas, sepsis, reacciones inflamatorias agudas, crónicas y/o alérgicas, de leucemia, para mejorar la cicatrización, para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso, para mejorar la hemostasia y para evitar daños tisulares debidos a inflamación, y para el aumento general de la defensa inmune y la inhibición de reacciones inflamatorias.

30 8. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** porque como infección aguda se trata una infección por VIH.

35 9. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** porque se trata particularmente leucemia linfocítica crónica.

10. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** porque se usa en pacientes con un riesgo de infección elevado, como después de operaciones con gran peligro de infección, politraumatismos, quemaduras, intoxicaciones en quimioterapia, en pacientes inmunosuprimidos y pacientes con predisposición a baja inmunidad.

40 11. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** porque se usa para la hemostasia, particularmente en pacientes con alteraciones de la coagulación innatas o adquiridas o trombocitopatías innatas o adquiridas, en terapia de anticoagulación o profilaxis de trombocitos o en operaciones con máquina de circulación extracorpórea.

45 12. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** porque se usa en reperfusiones, trasplantes de órganos o reacciones alérgicas.

13. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** porque se tratan afecciones parasitarias, particularmente malaria tropical.

50

55

60

65

Fig. 1:
La IDAAT media la unión de TSP-1 a monocitos

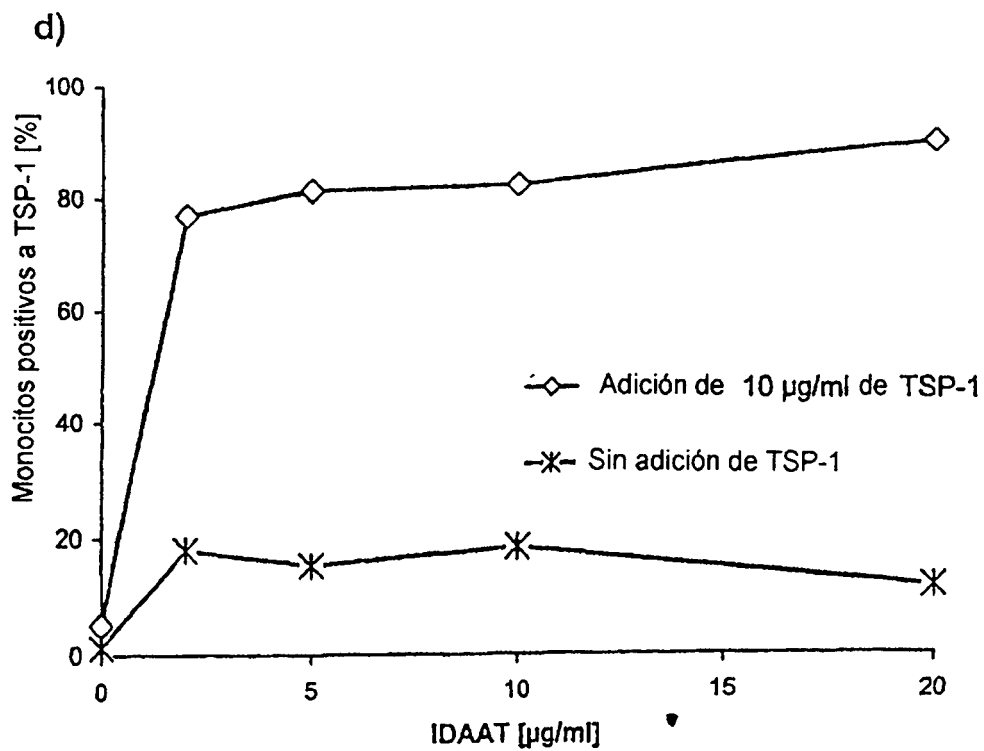
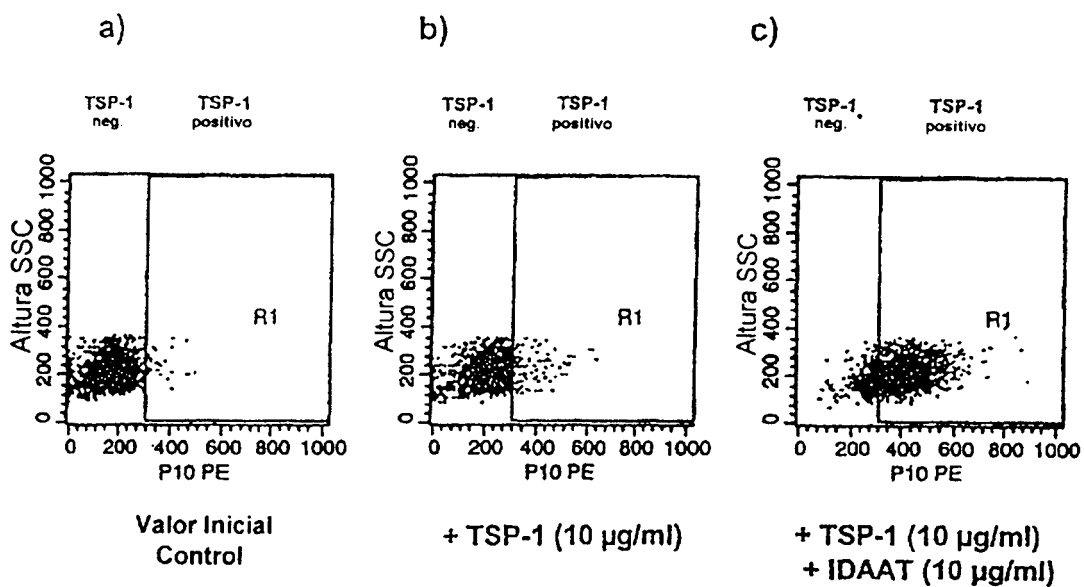


Fig. 2:

La IDAAT produce la unión de TSP-1 a PMNL apoptóticos

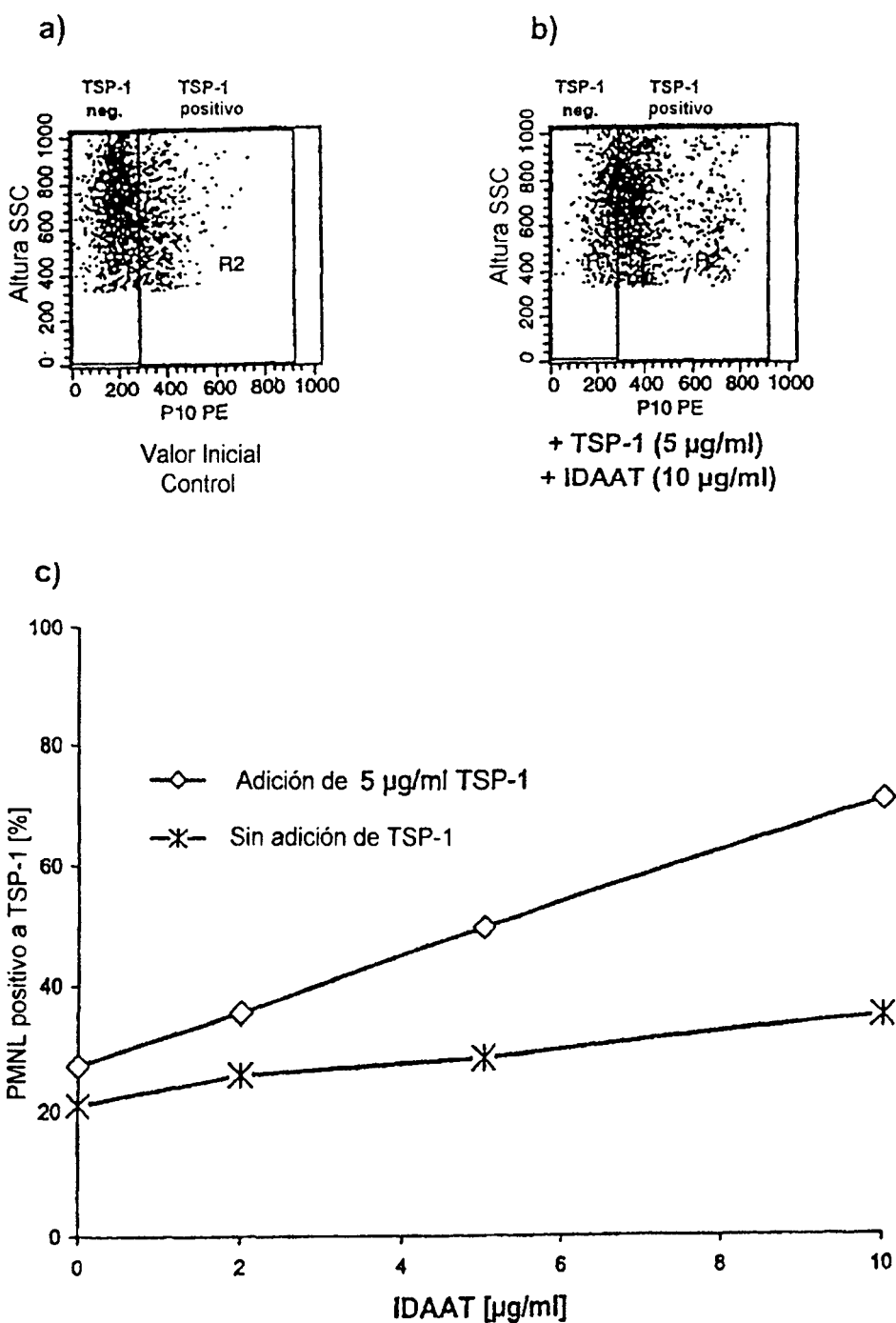


Fig. 3:

La IDAAT une los PMNL apoptóticos con monocitos mediante TSP

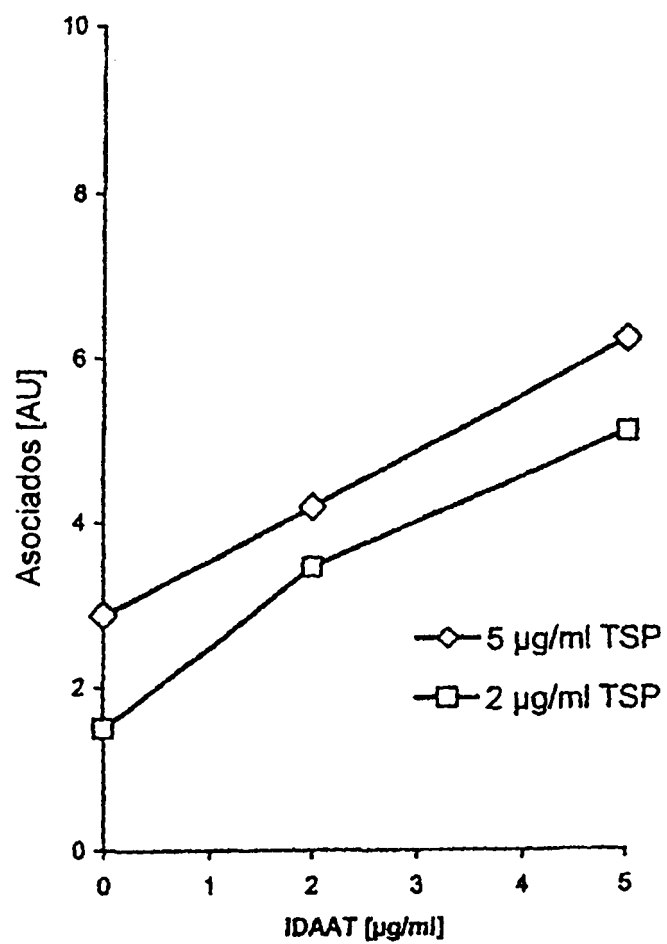


Fig. 4:

Transmigración de monocitos a través de una monocapa de HMEC-1
bajo la influencia de IDAAT y preparados comerciales de ATIII

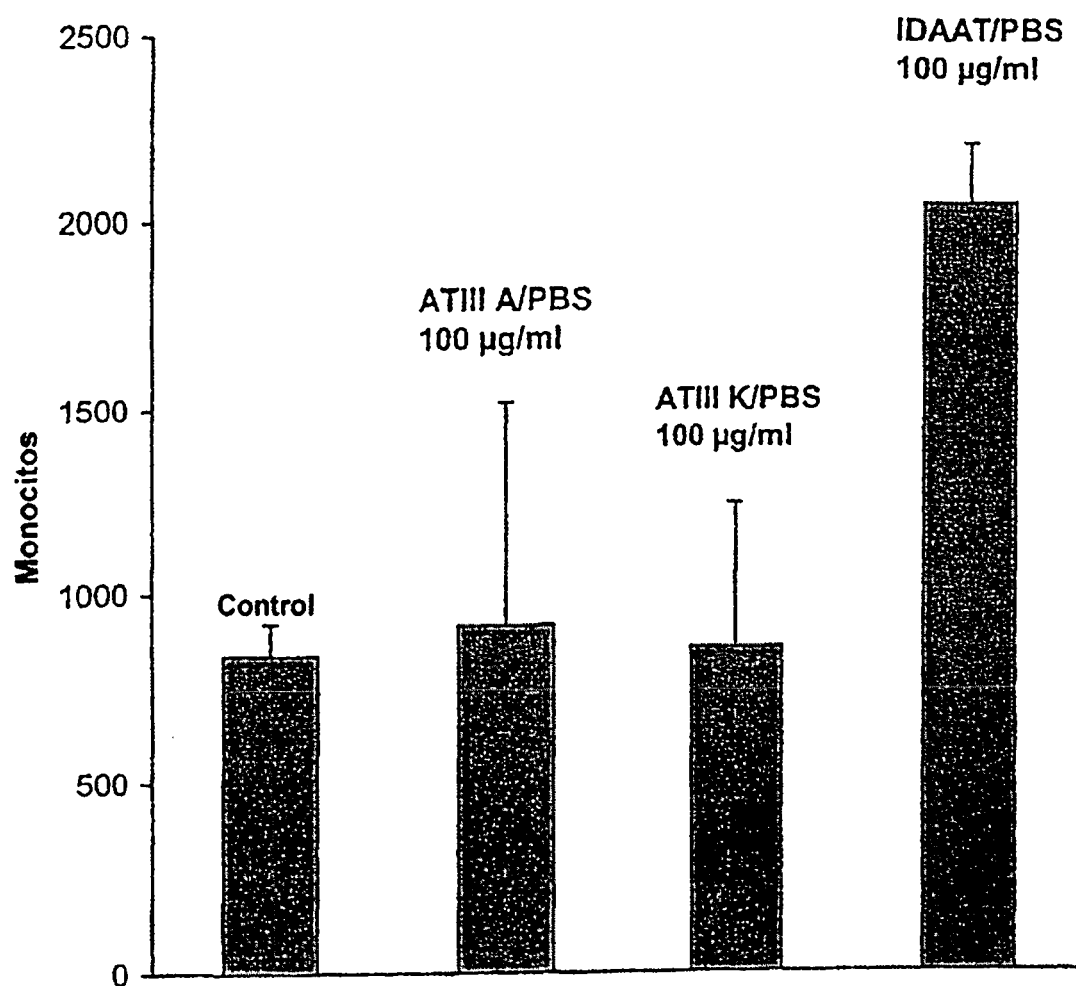


Fig. 5:
La IDAAT induce la señal de Ca^{2+} en trombocitos

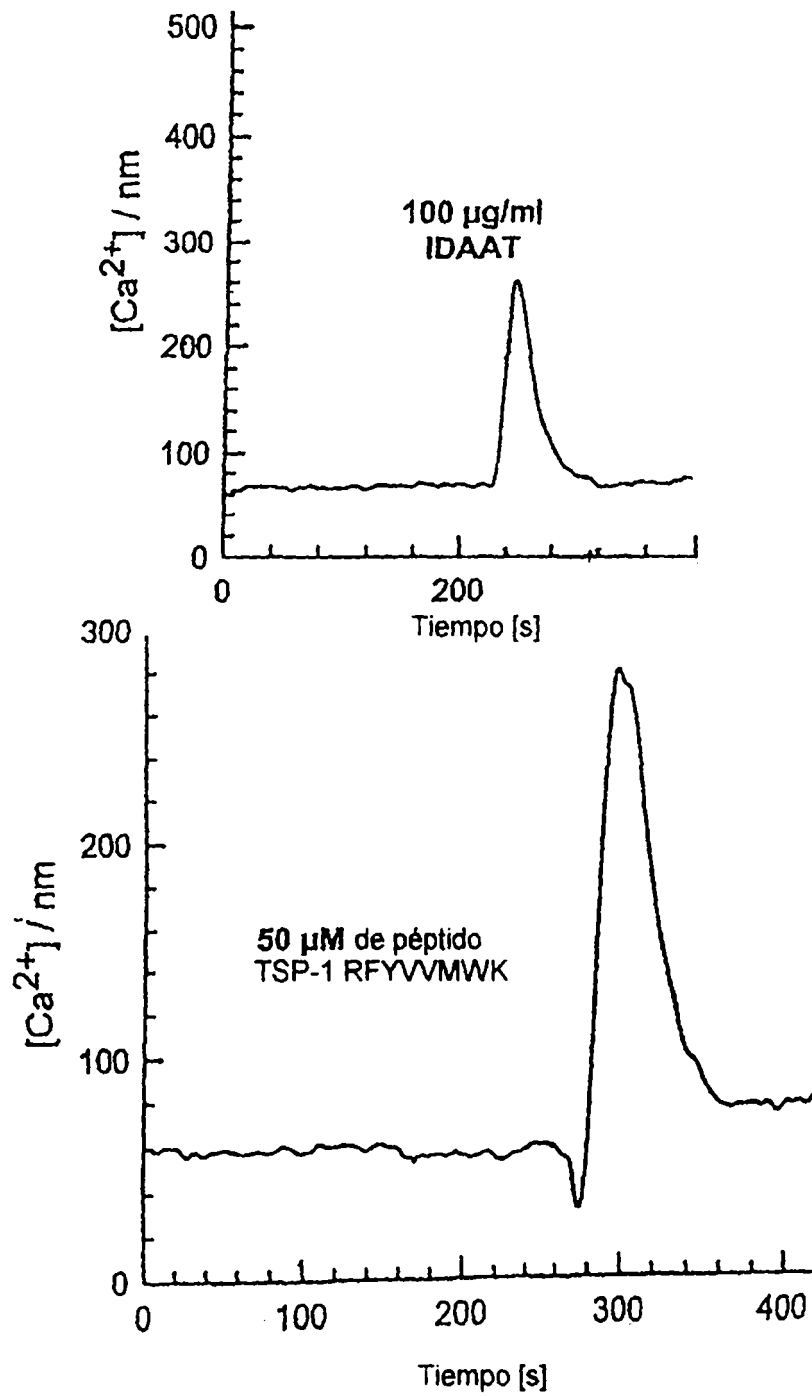


Fig. 6:

La IDAAT produce la unión de TSP-1 a células T

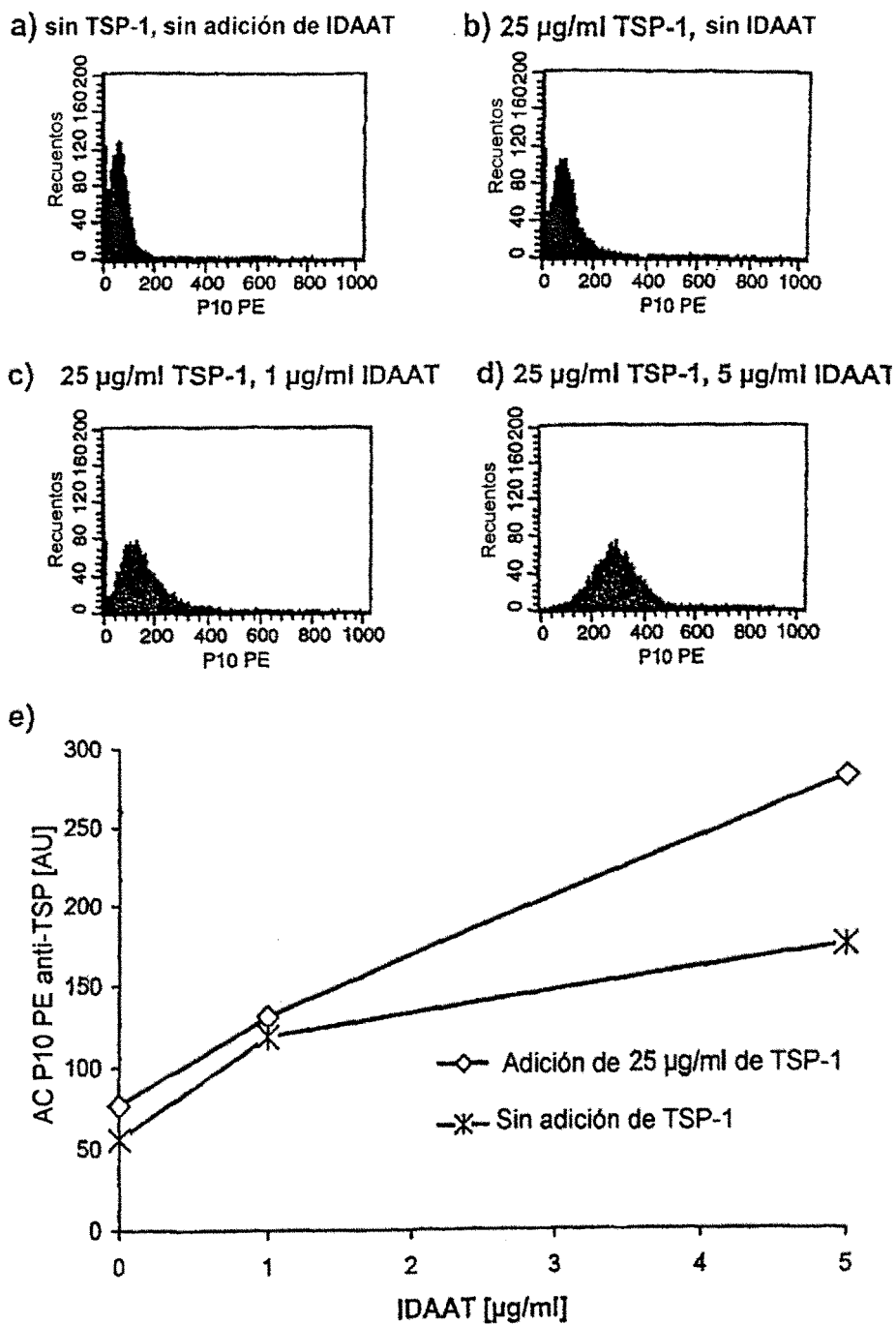


Fig. 7:
 La IDAAT refuerza el efecto activador de fLMF
 sobre el estallido oxidativo de PMNL

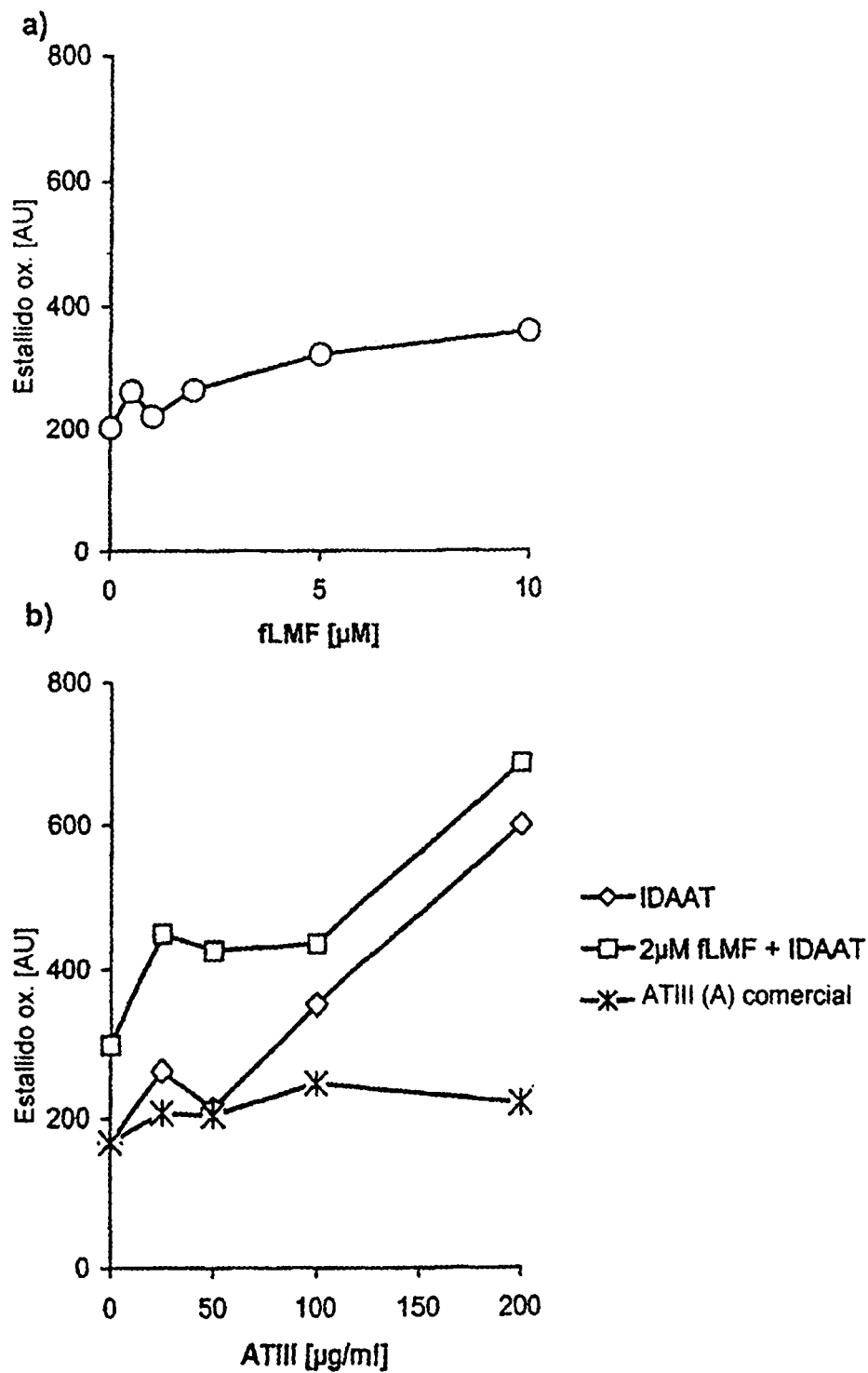


Fig. 8:

La IDAAT inhibe la liberación de interleucina 12 (IL-12) activa mediante monocitos activados con interferón γ + *S. aureus*

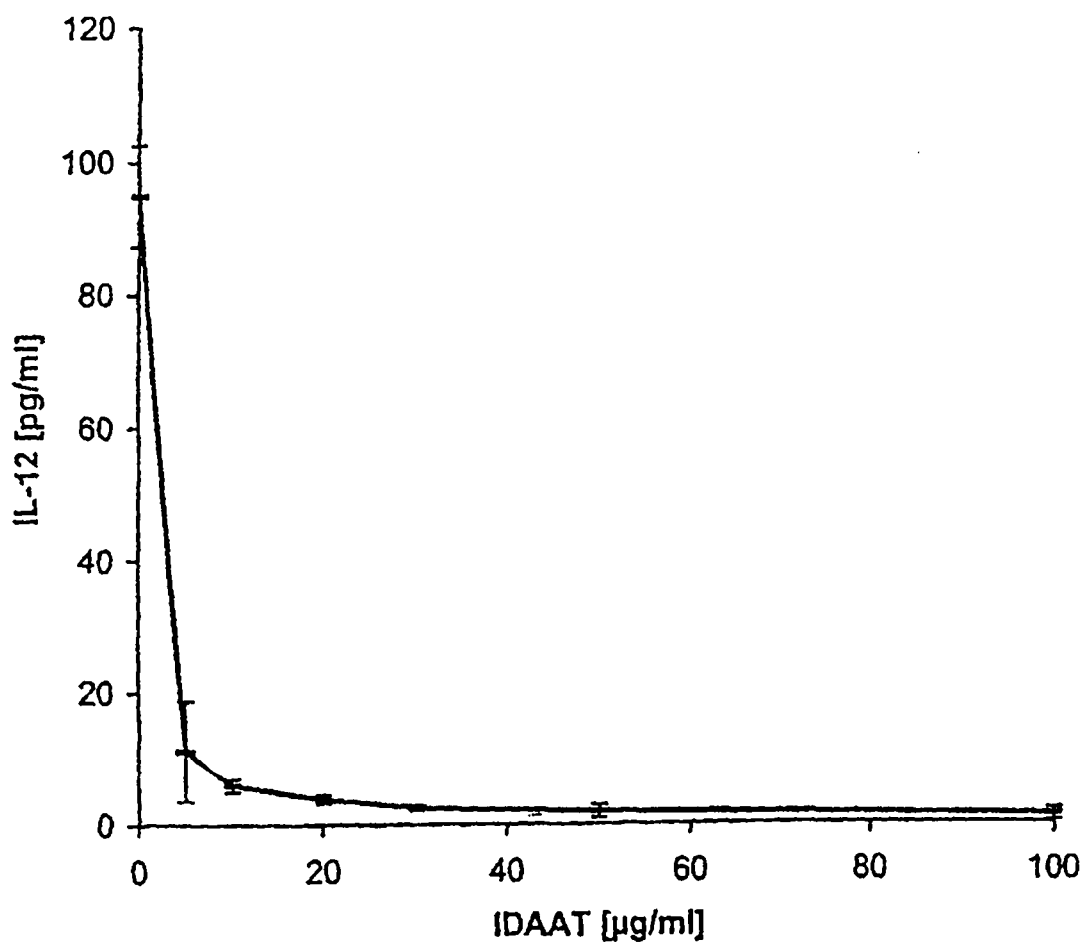


Fig. 9:
La IDAAT aumenta la secreción de IL-10 mediante monocitos activados con *S. aureus* e interferón gamma

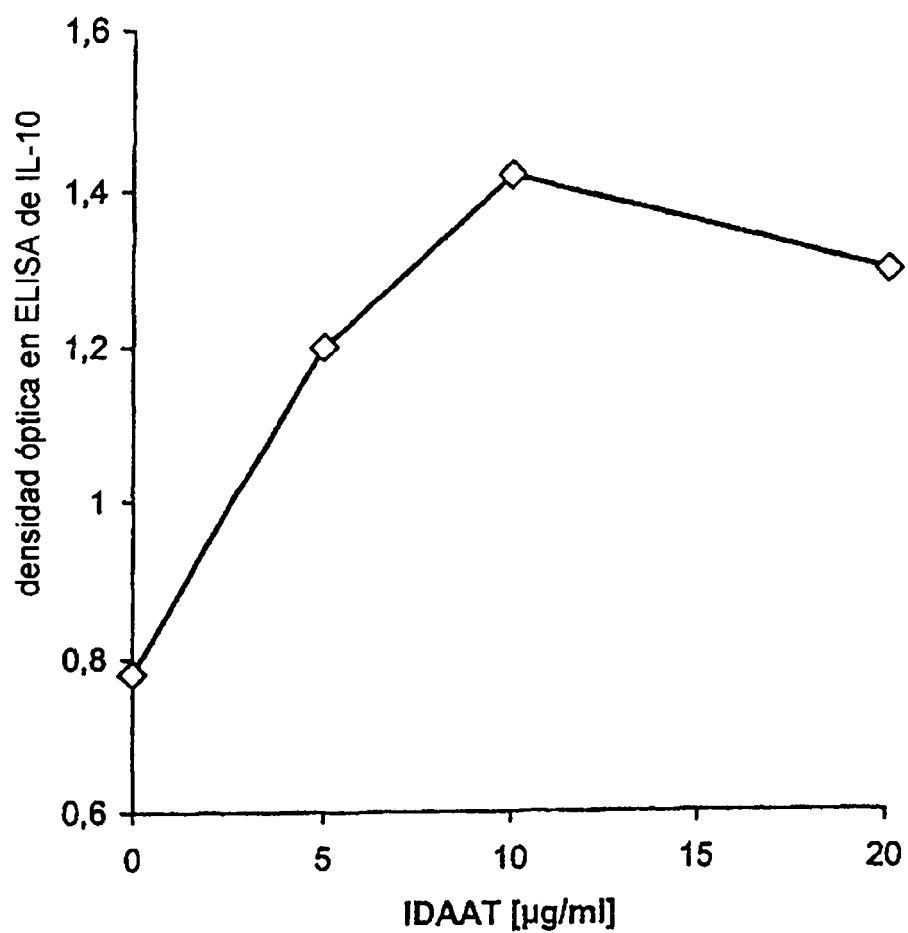


Fig. 10

La IDAAT aumenta la inhibición de la secreción de TNF-alfa por monocitos activados mediante el péptido de TSP-1 RFYVVMWK

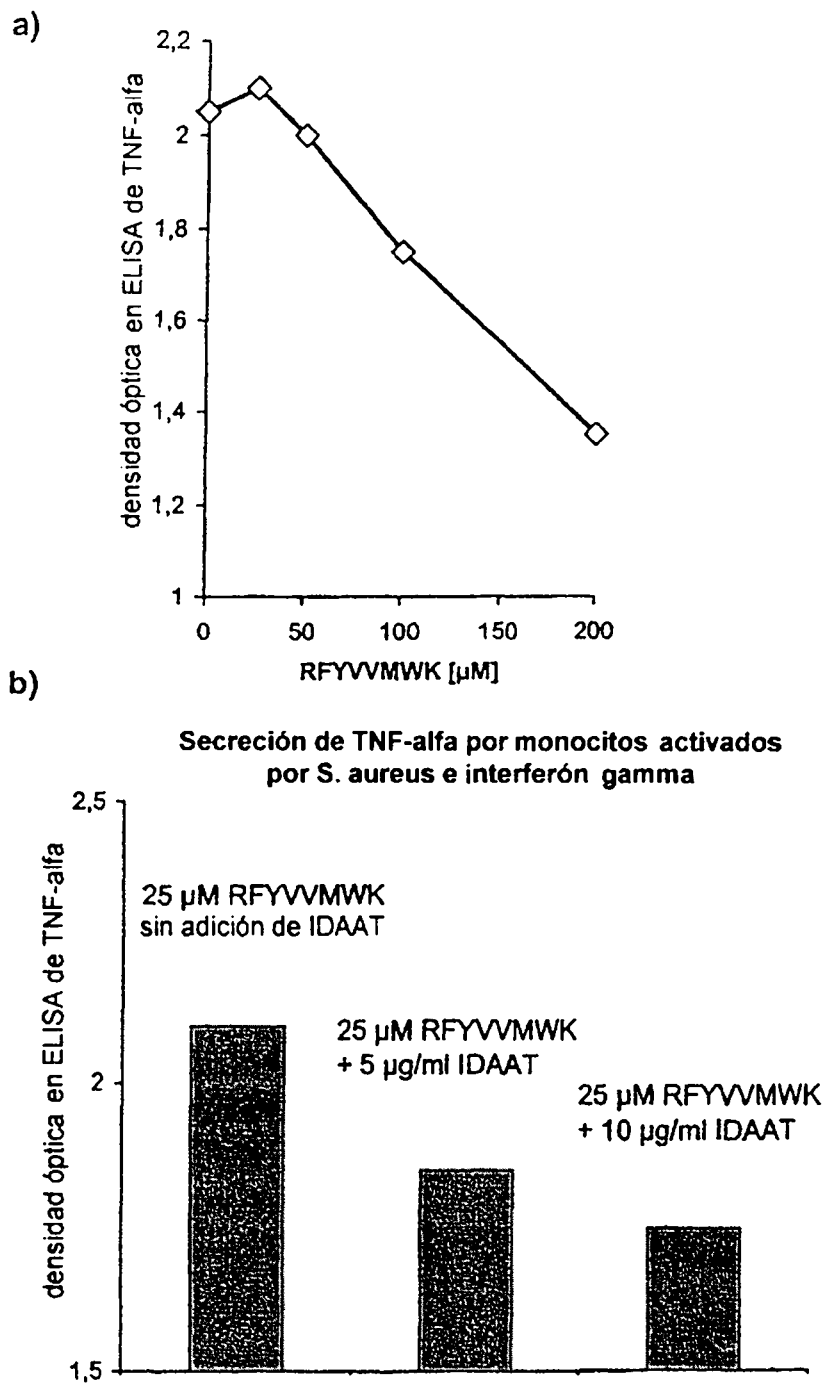
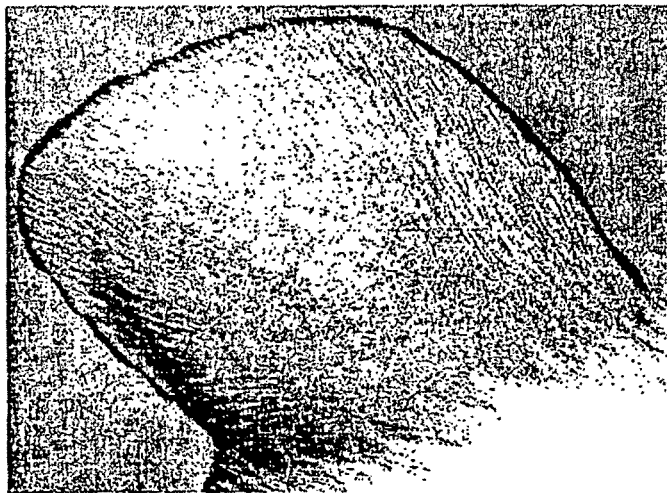


Fig. 11:
La IDAAT inhibe las reacciones inflamatorias
in vivo --- Reacción de Arthus
a)



b)

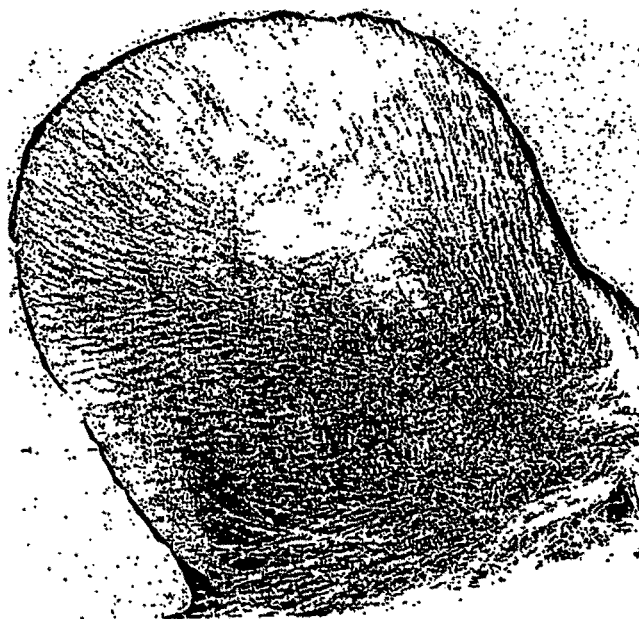


Fig. 11

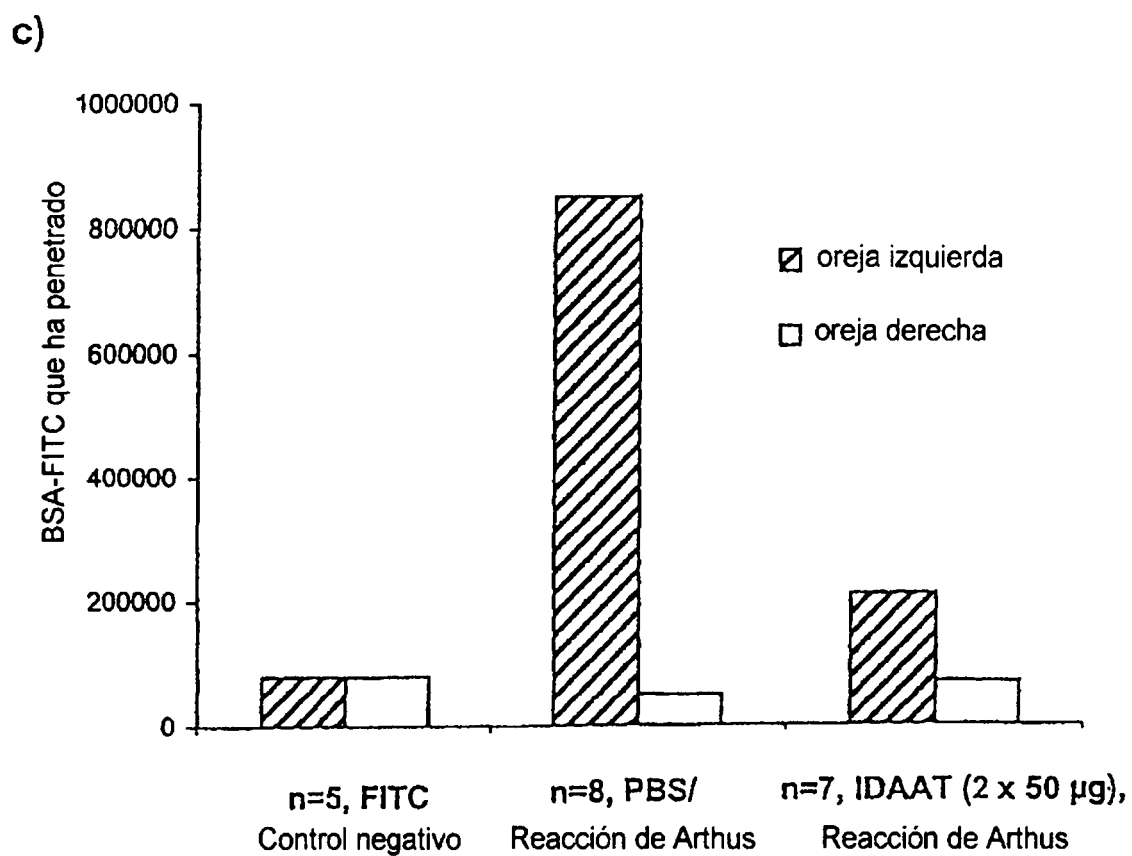


Fig. 12:

La IDAAT produce la unión de *S. aureus* a células que pueden fagocitar y defenderse contra bacterias

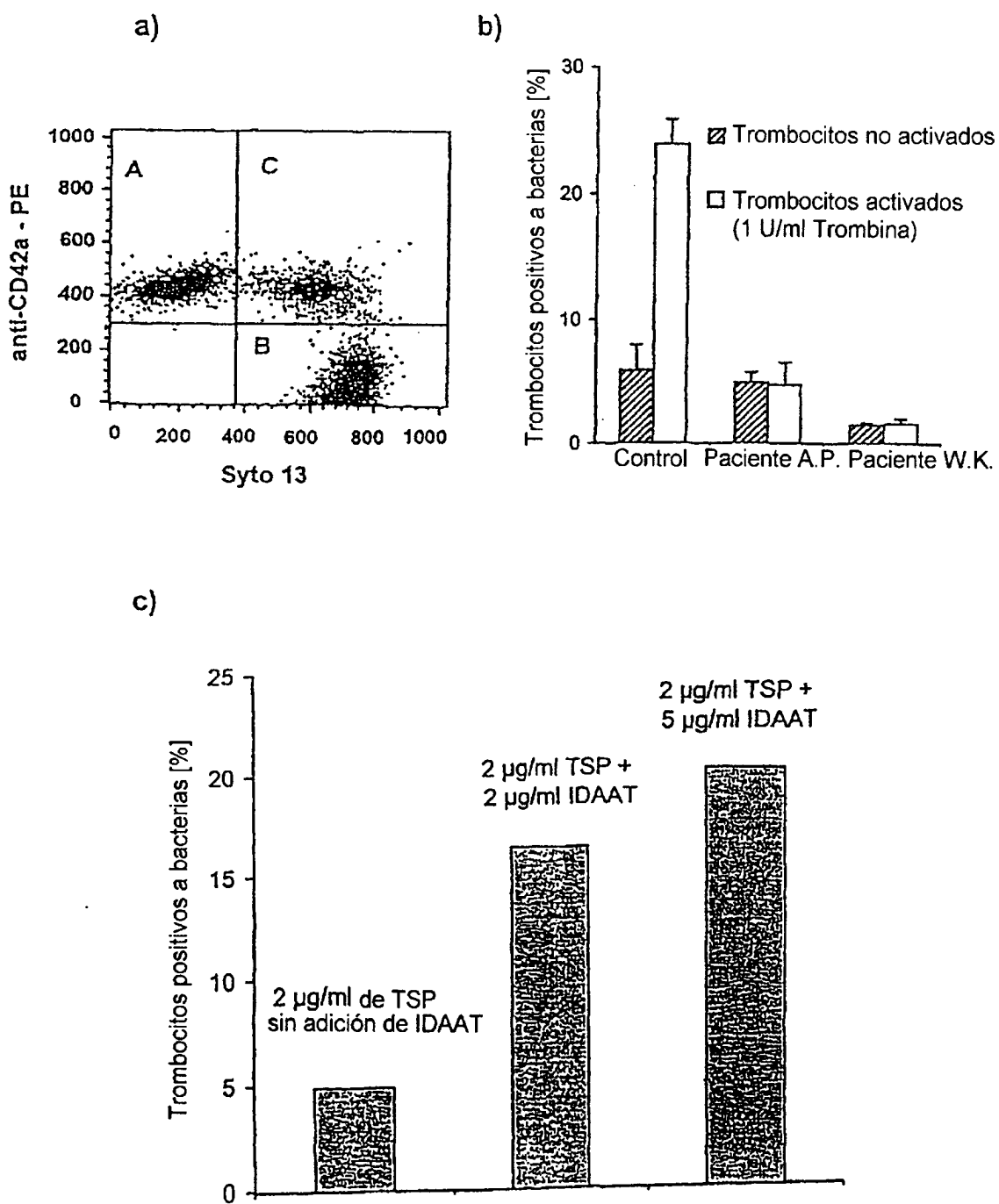


Fig. 13:

La IDAAT media la unión de trombospondina a trombocitos

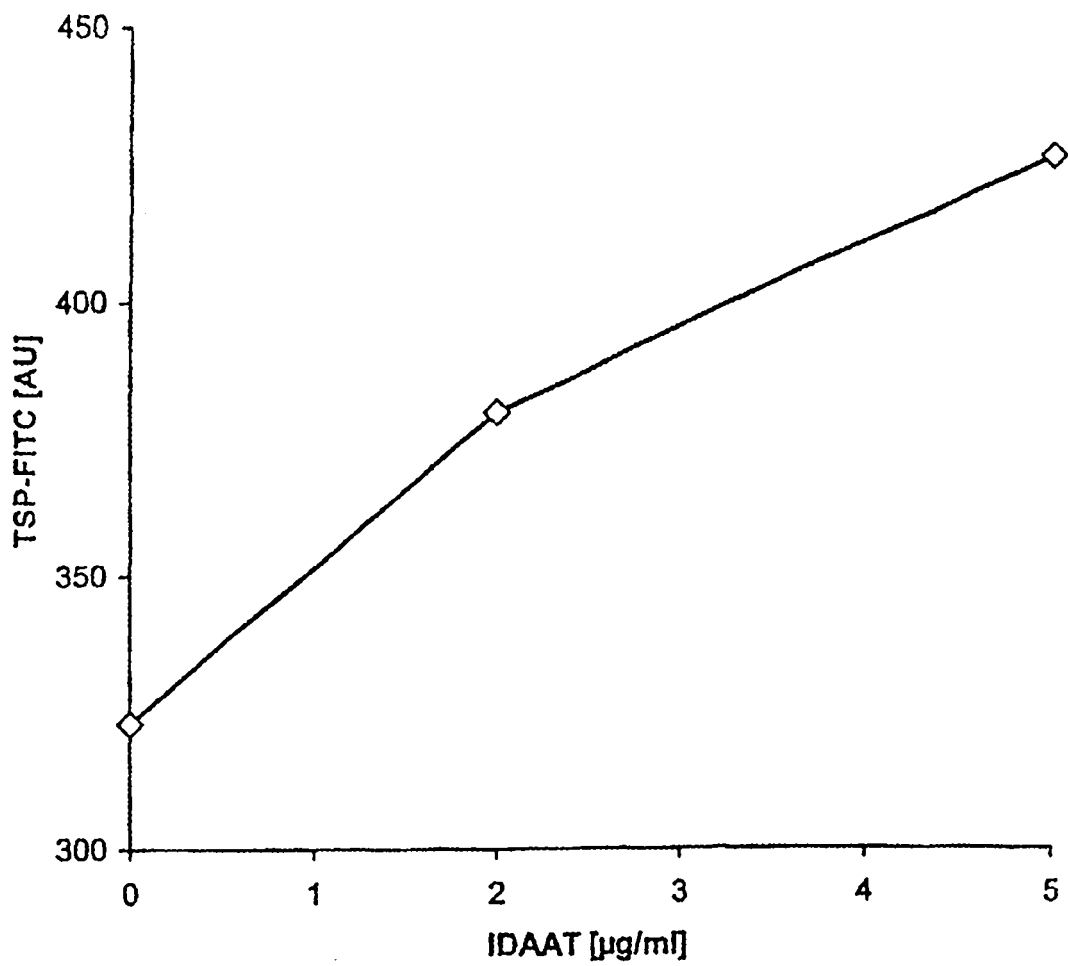


Fig. 14:

La IDAAT fomenta la unión de fibrinógeno a trombocitos

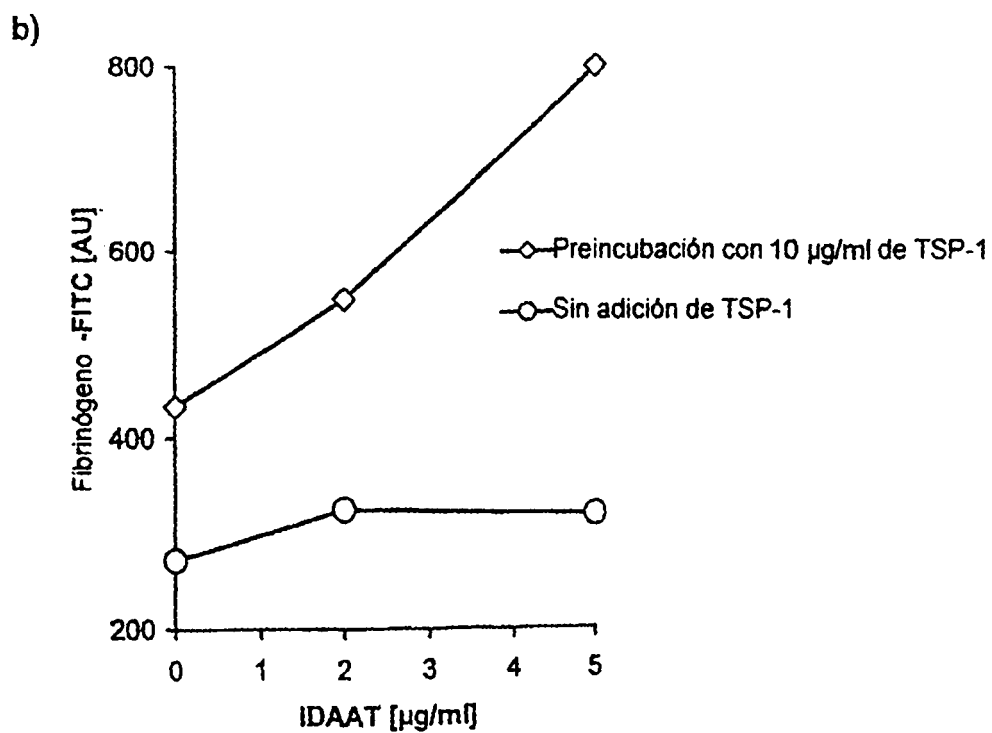
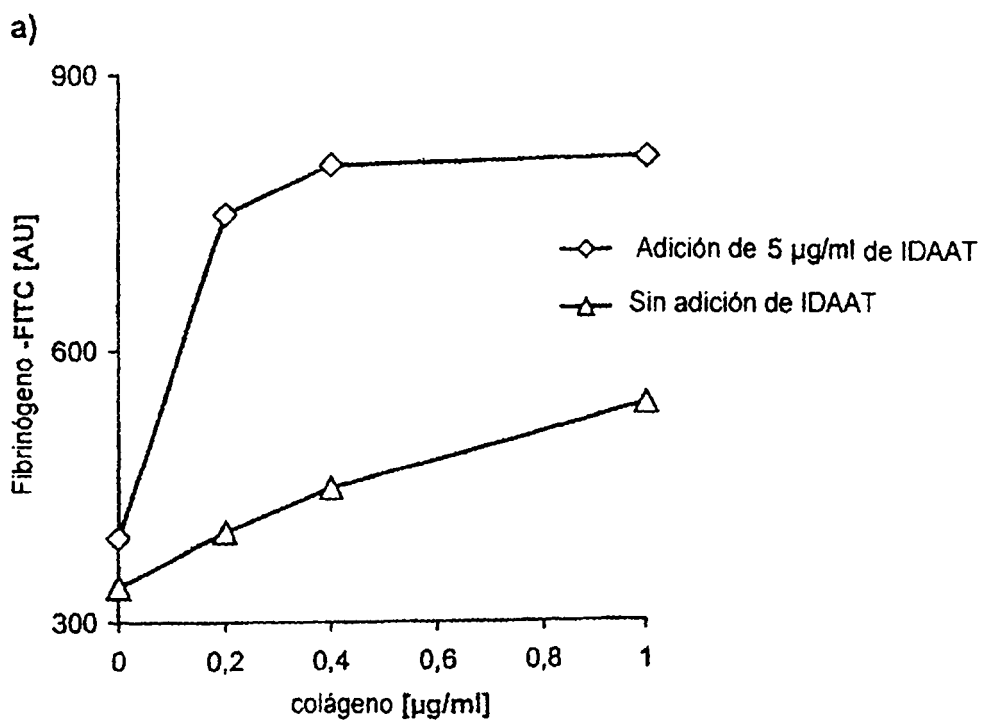


Fig. 15:

La IDAAT aumenta la adhesión de trombocitos a proteínas de adhesión

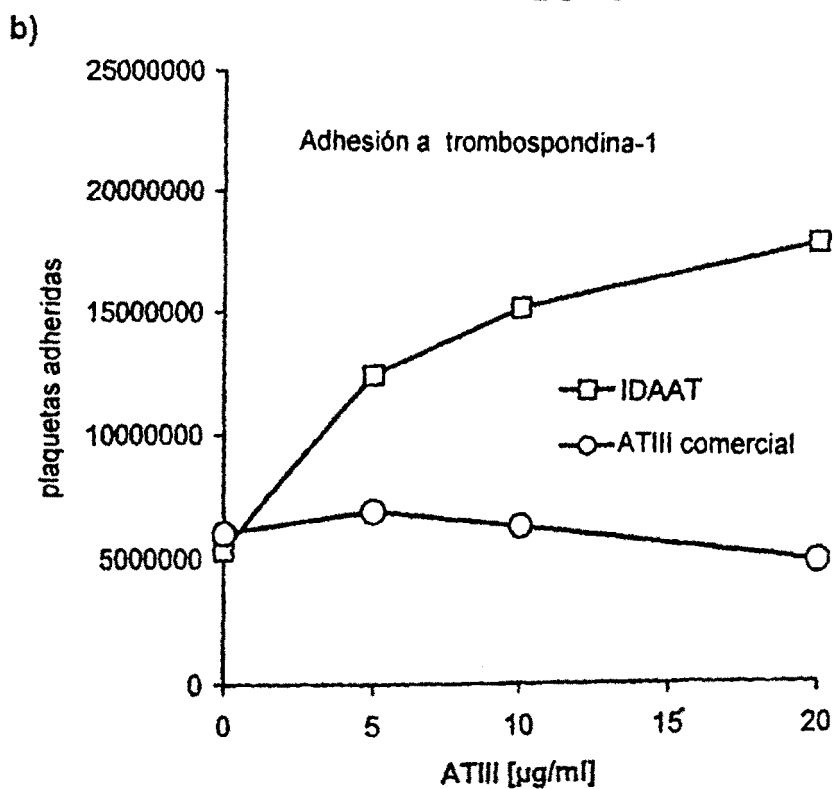
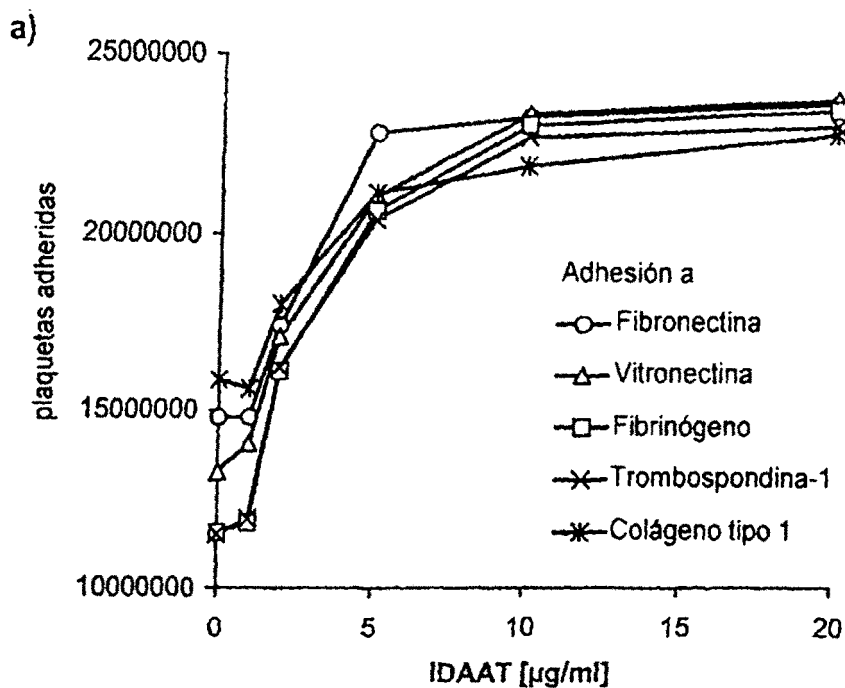


Fig. 16:
La adhesión de trombocitos mediada por la IDAAT es dependiente de la integrina

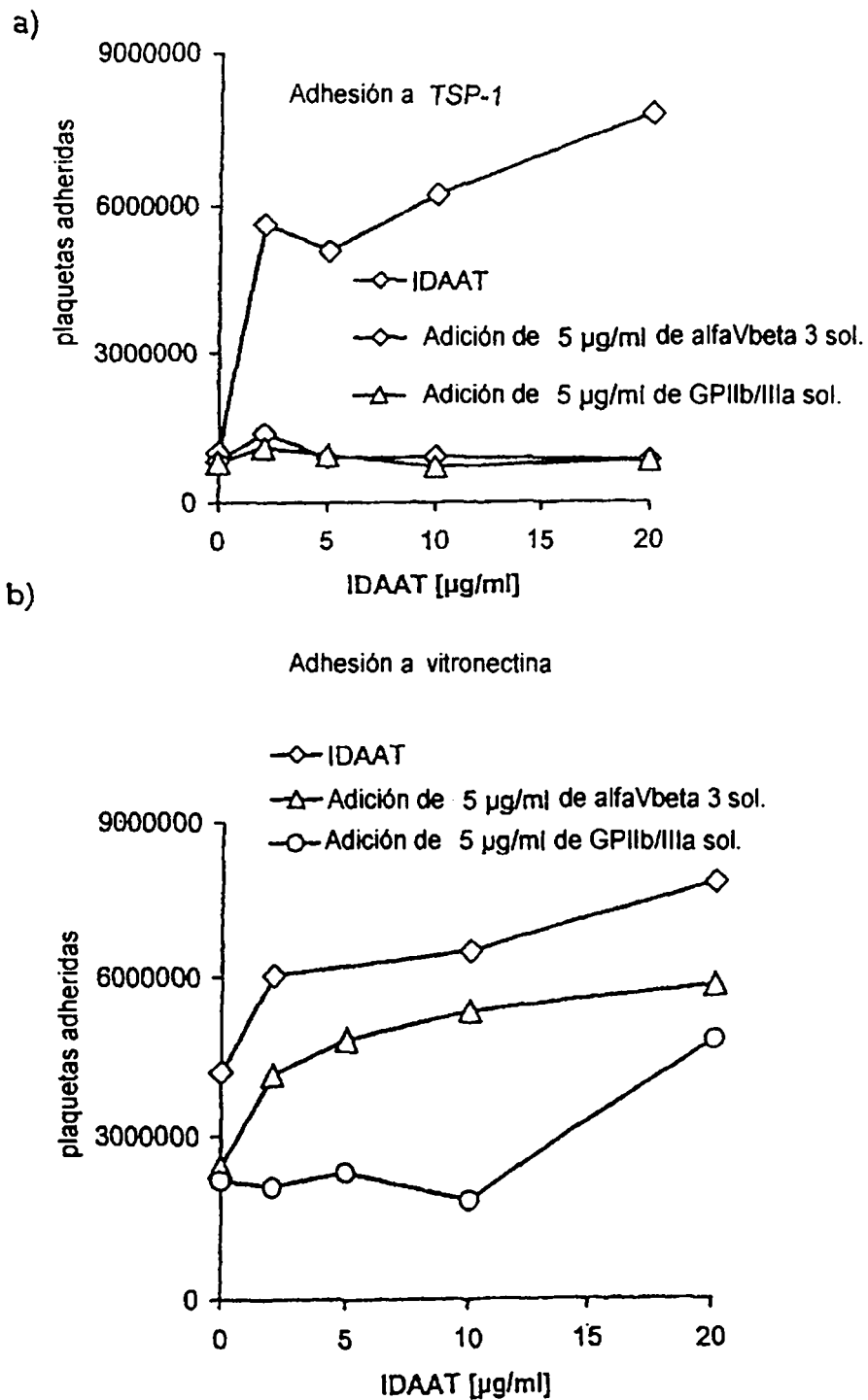


Fig. 17:

El aumento de la adhesión de trombocitos por IDAAT está mediado por CD36

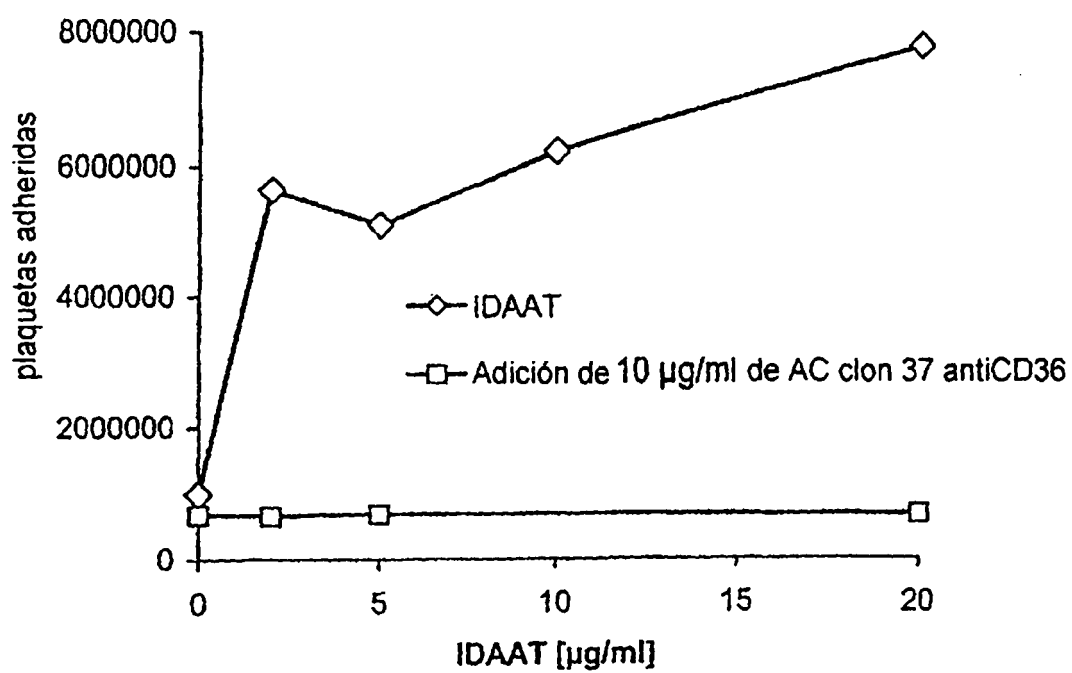


Fig. 18:

El efecto de la IDAAT es independiente de la trombina

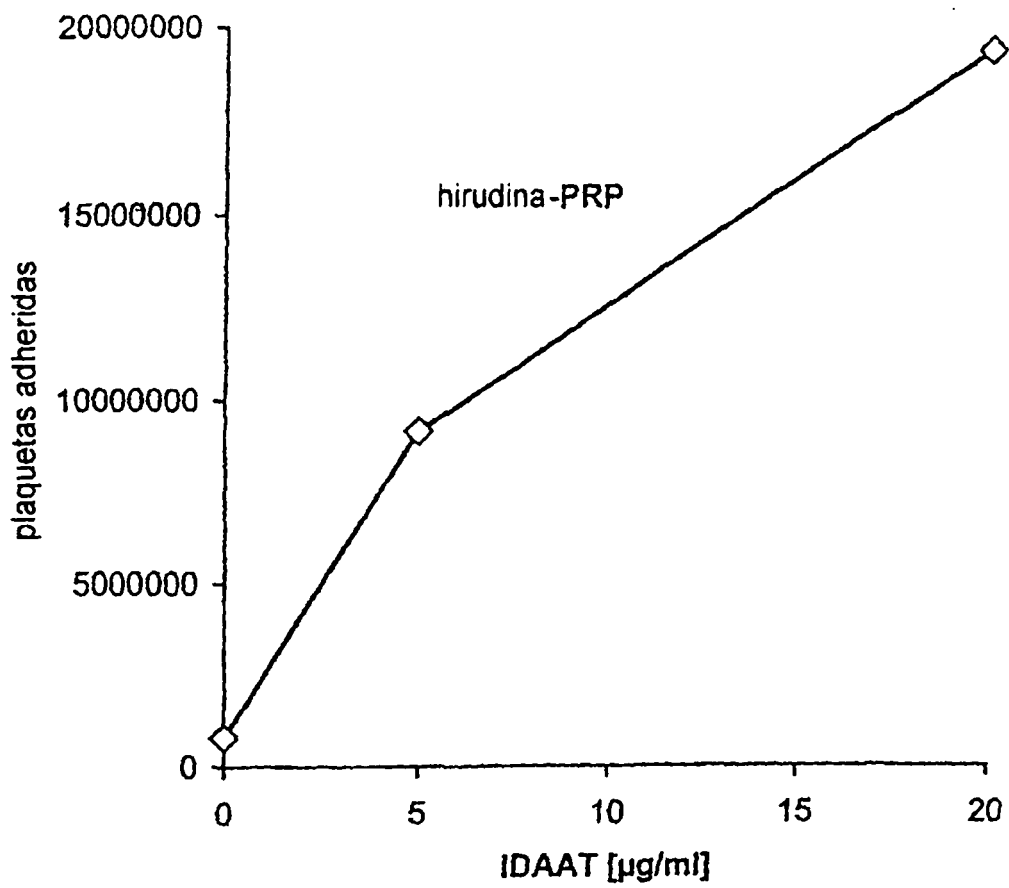


Fig. 19:

La adhesión de trombocitos mediada por la IDAAT es dependiente de iones bivalentes

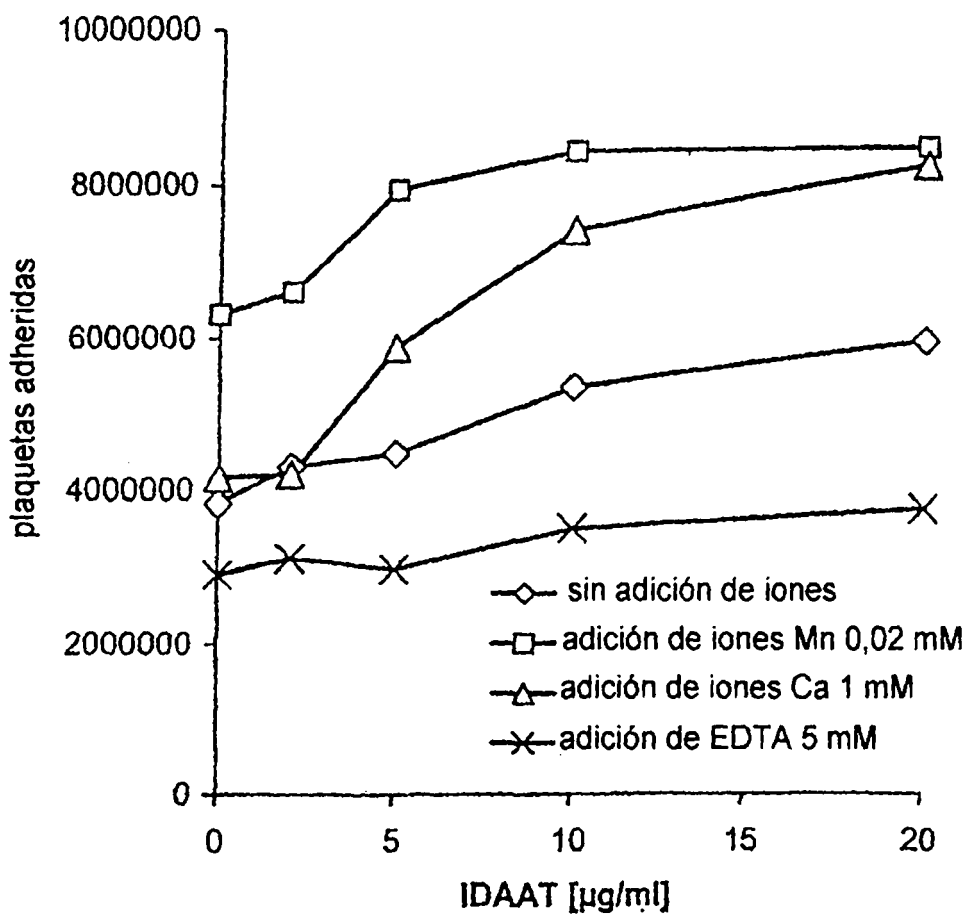


Fig. 20:

La trombospondina-1 soluble inhibe la adhesión de trombocitos a colágeno

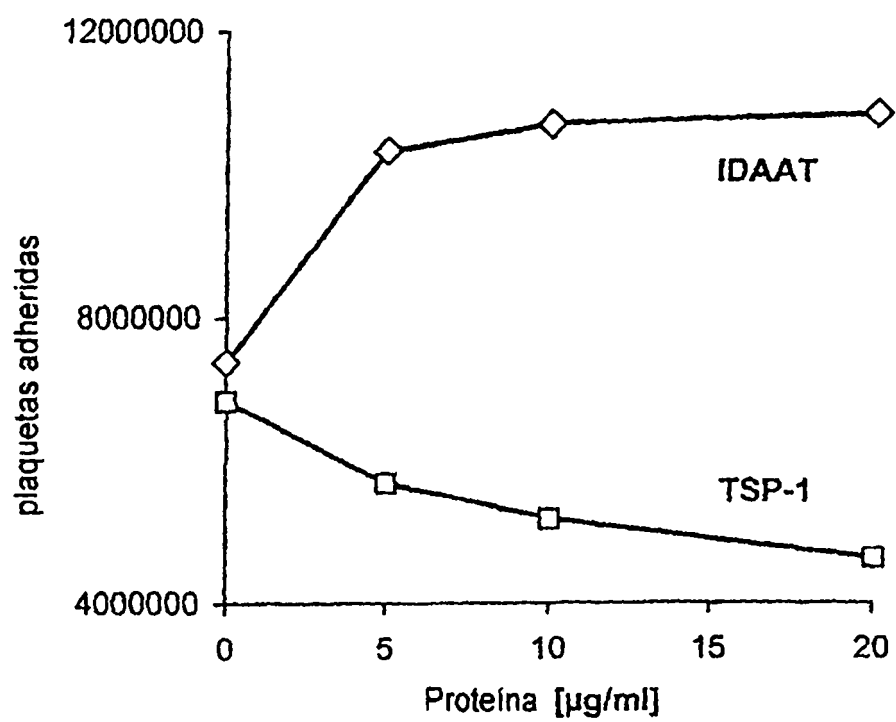


Fig. 21:
Influencia de células sanguíneas sobre la adhesión de trombocitos mediada por la IDAAT

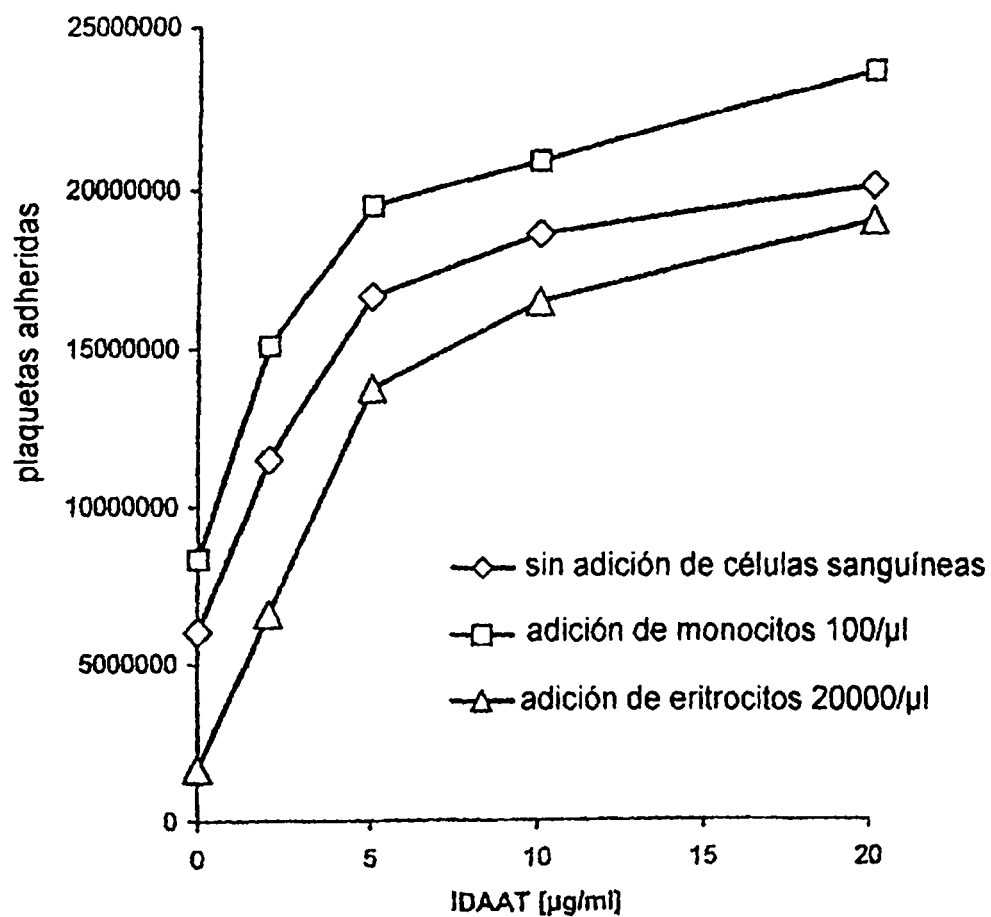


Fig. 22:
La adhesión de trombocitos inducida por IDAAT
se inhibe mediante inhibidores de
la PI-3-quinasa

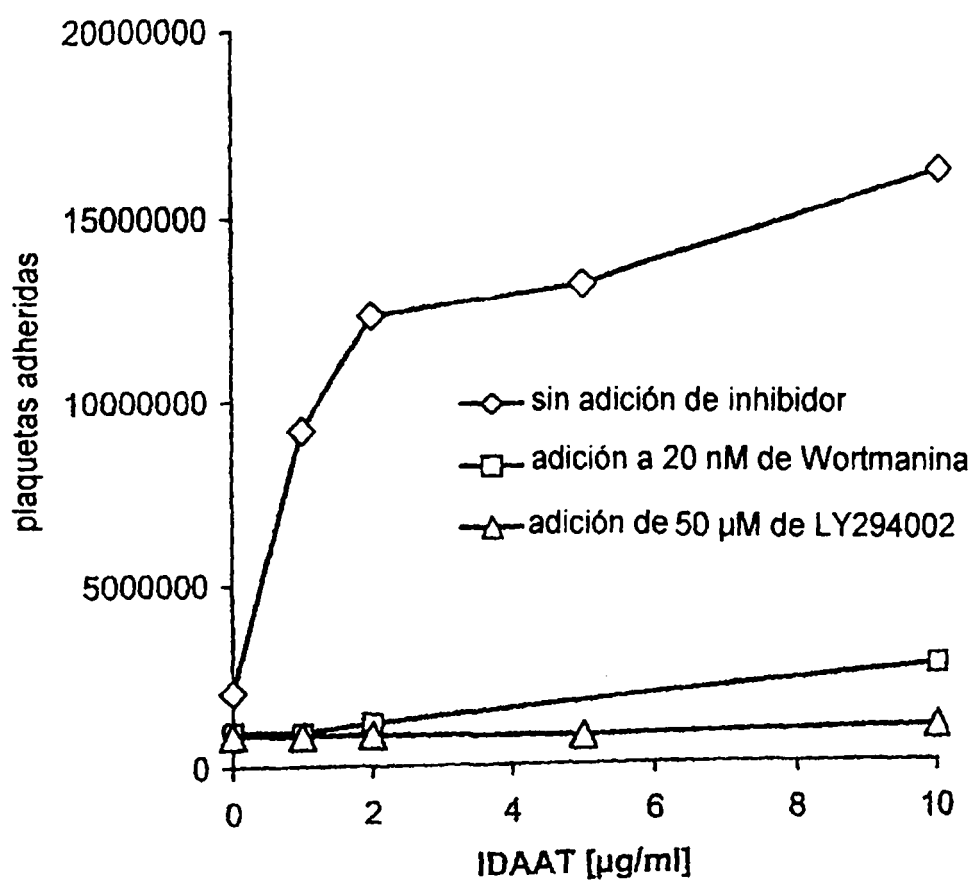


Fig. 23:

La IDAAT interviene en la agregación de trombocitos mediada por trombospondina

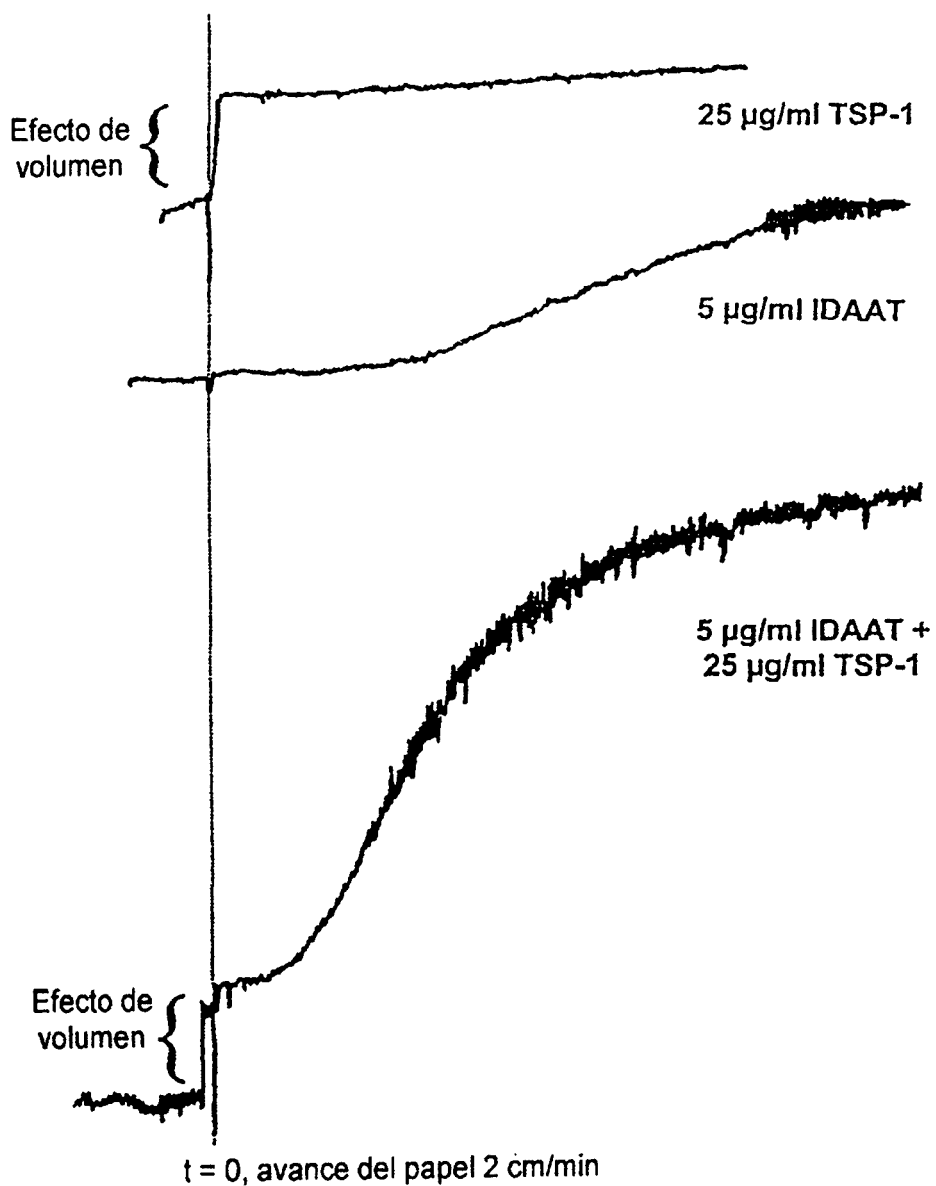


Fig. 24:
La IDAAT interviene en la formación de
micropartículas por trombocitos

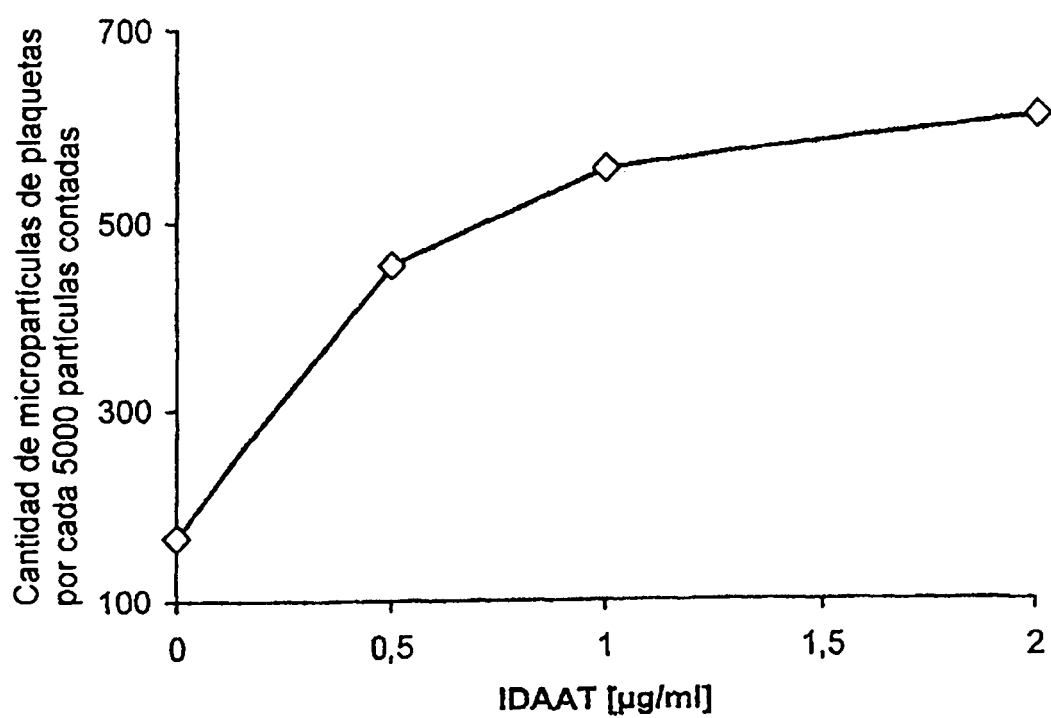
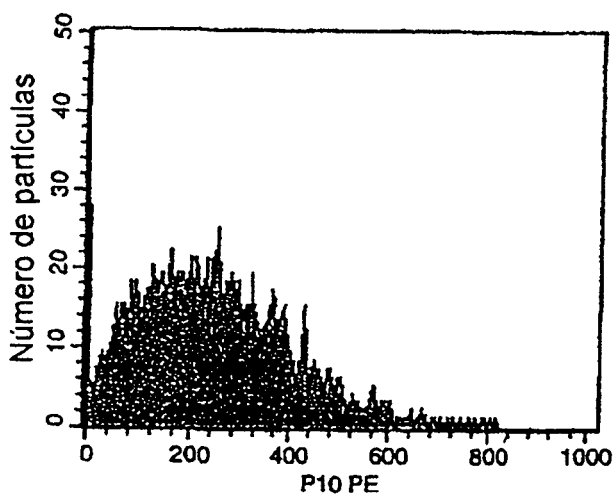


Fig. 25:

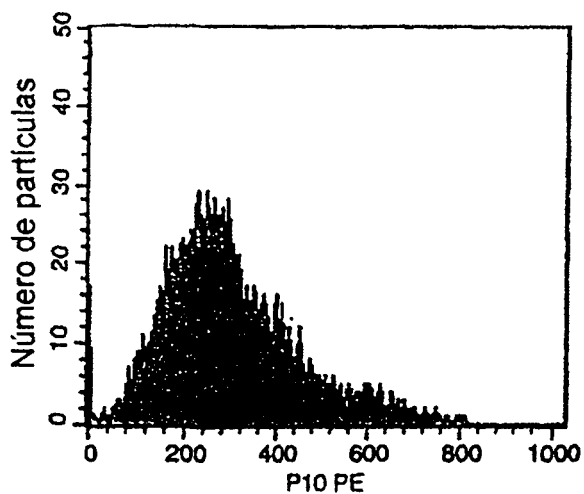
La IDAAT interviene en la unión de trombospondina 1 a células endoteliales

a)



25 µg/ml TSP-1

b)



25 µg/ml TSP-1 +
5 µg/ml IDAAT

Fig. 26:

La IDAAT aumenta la unión de trombocitos a perlas de látex recubiertas de vitronectina

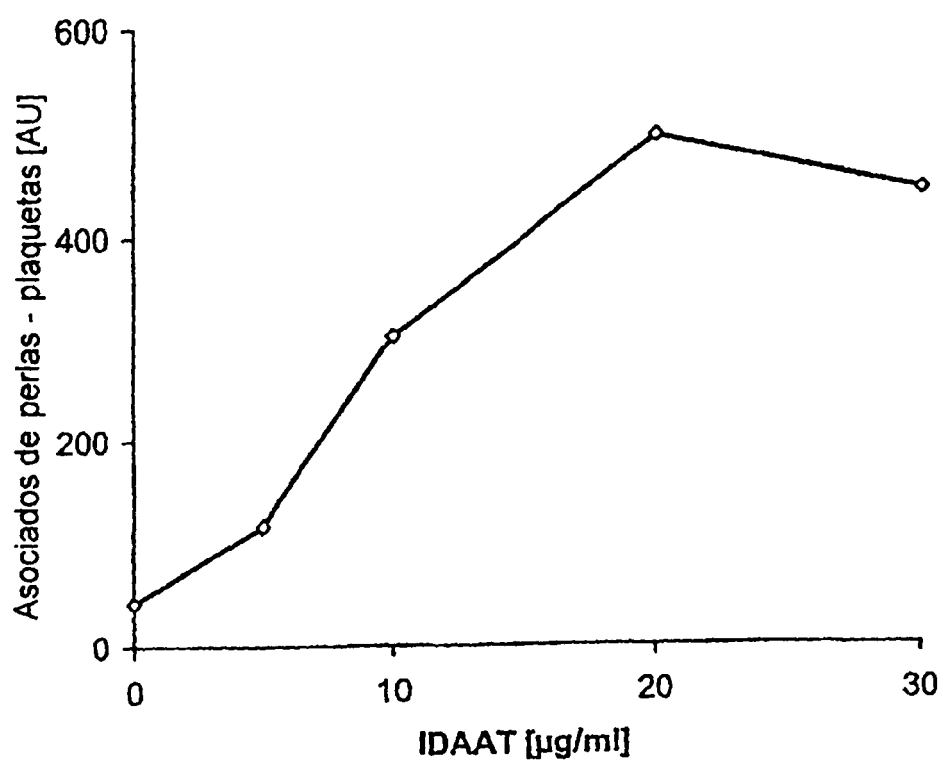
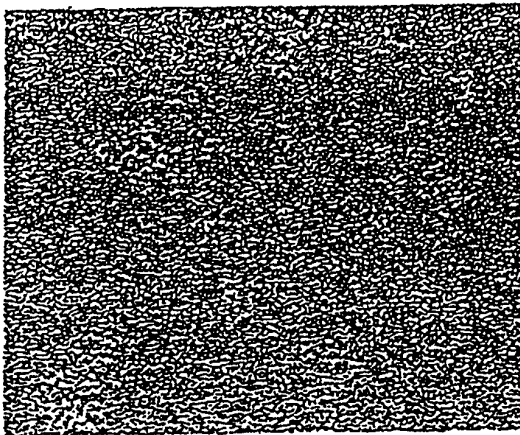


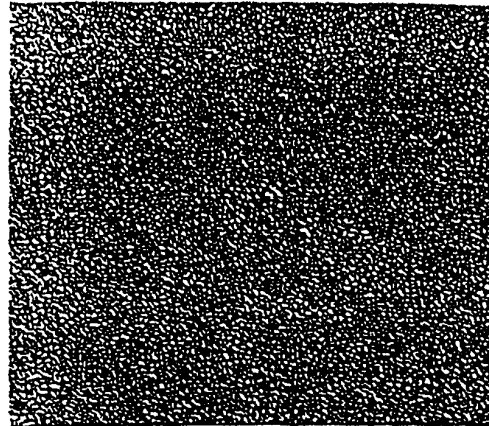
Fig. 27:

La IDAAT se compone de antitrombina polimerizada,
la IDAAT se une a trombospondina

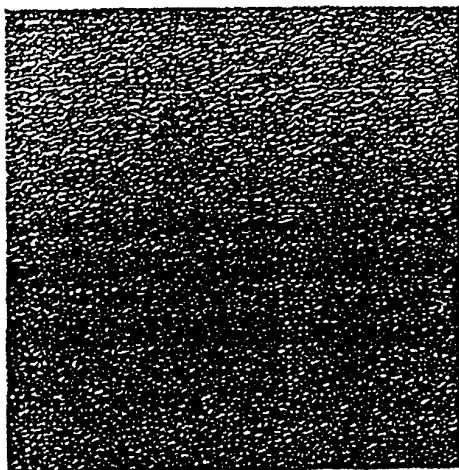
a) IDAAT



b) ATIII (K) comercial



c) La IDAAT se une a TSP-1



d) La ATIII (K) comercial no se une a TSP-1

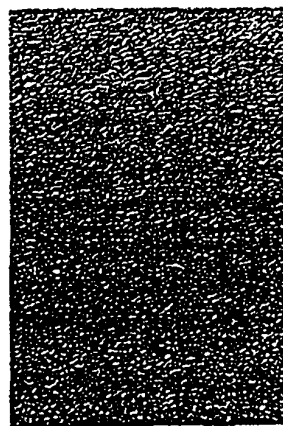


Fig. 28
La IDAAT se une al rec. CD4

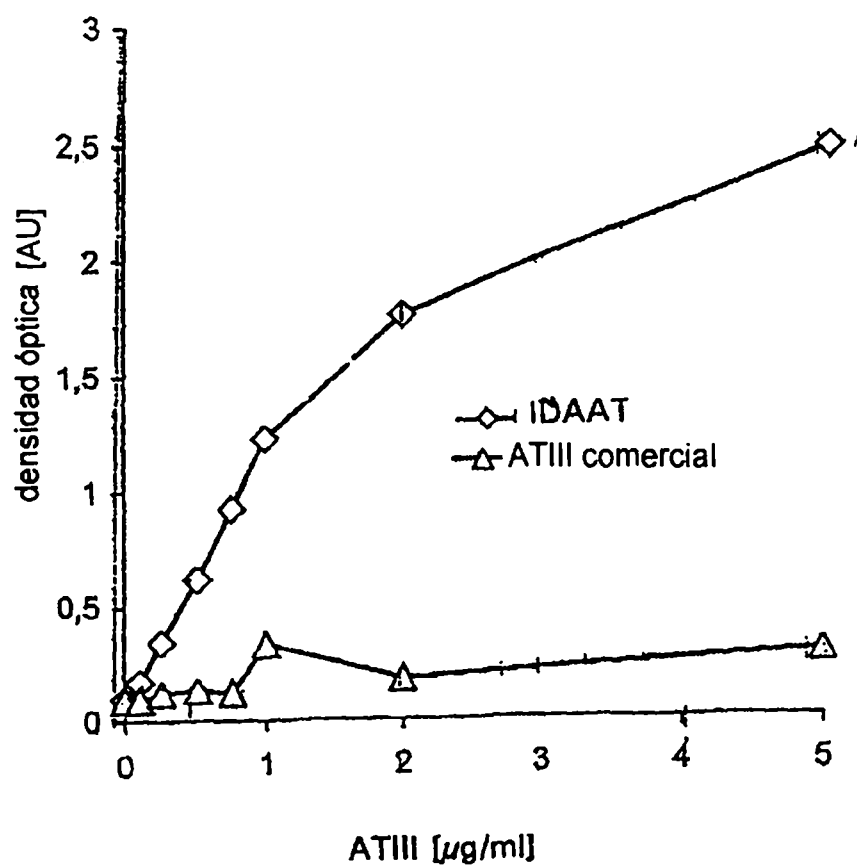


Fig. 29
La IDAAT se une al rec. GP 120 del VIH

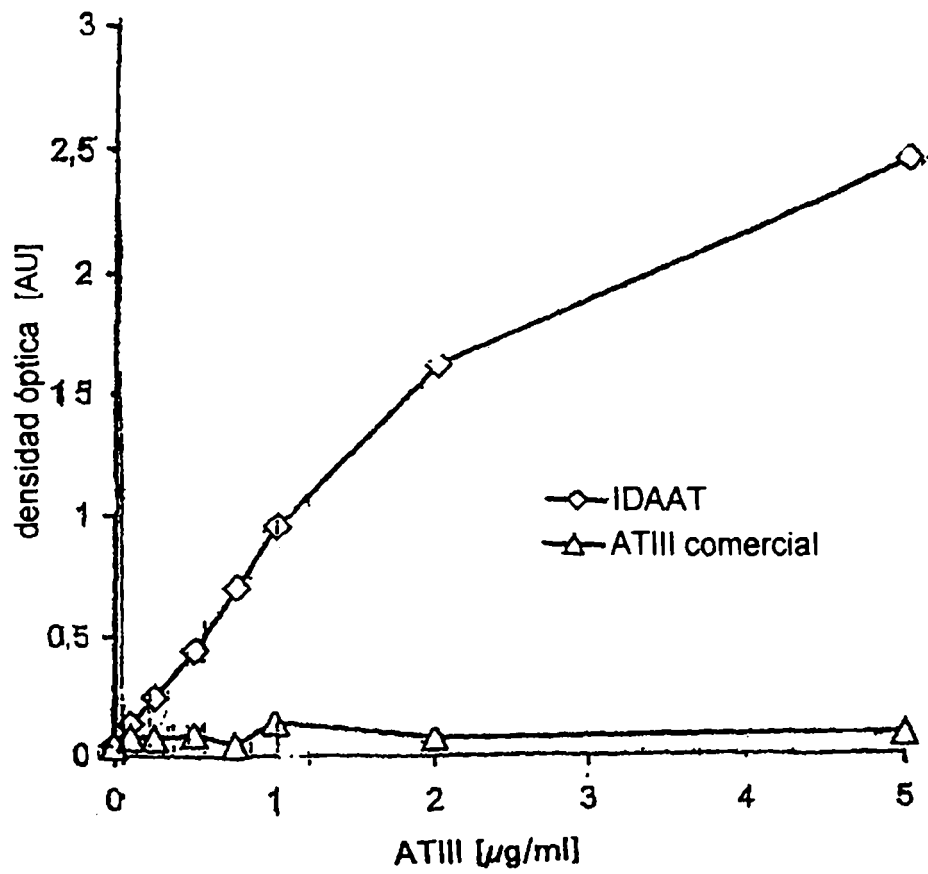


Fig. 30

La IDAAT se une directamente a trombospondina

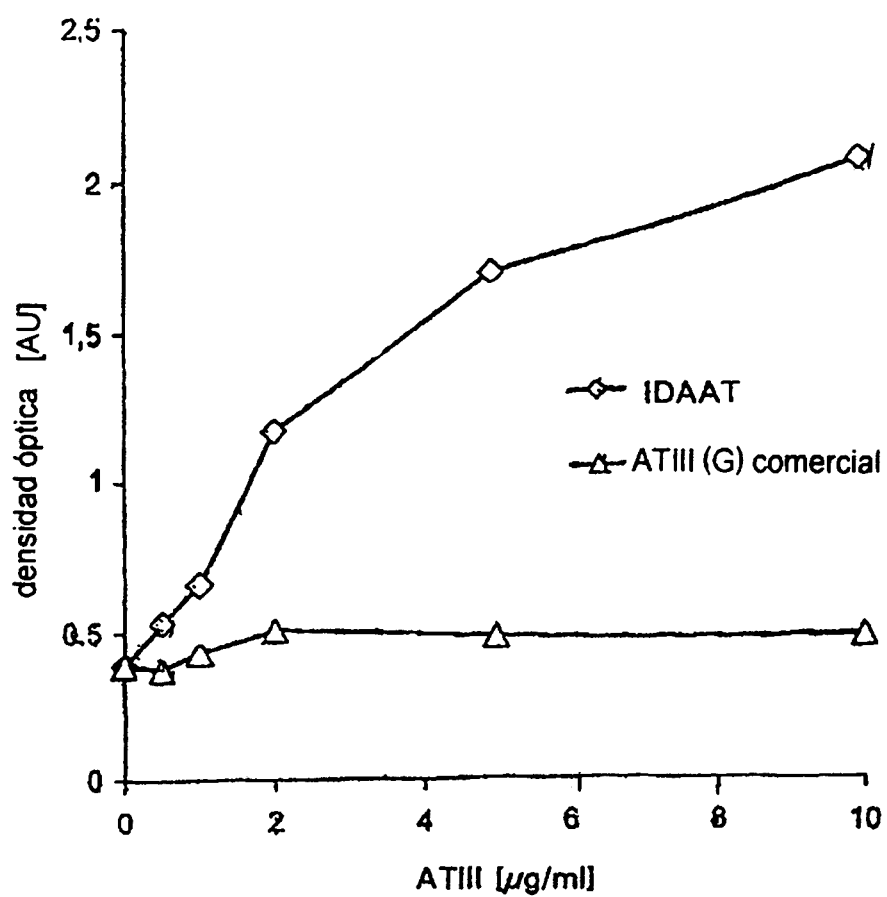


Fig. 31

La IDAAT se une directamente a vitronectina

