

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 829 503**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/39** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2014 PCT/EP2014/077385**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15086748**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2014 E 14818926 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2020 EP 3079713**

54 Título: **Preparaciones inyectables a base de colágenos capaces de controlar los sangrados y/o de sustituir a unas plaquetas en el caso de síndromes hemorrágicos**

30 Prioridad:

**11.12.2013 FR 1362418**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.06.2021**

73 Titular/es:

**NVH MEDICINAL (33.3%)**

**57, rue de la Vannerie**

**21000 Dijon, FR;**

**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE**

**DIJON (33.3%) y**

**VANDROUX, DAVID (33.3%)**

72 Inventor/es:

**VANDROUX, DAVID;**

**DUMONT, LAURE y**

**DE MAISTRE, EMMANUEL**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 829 503 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

Preparaciones inyectables a base de colágenos capaces de controlar los sangrados y/o de sustituir a unas plaquetas en el caso de síndromes hemorrágicos

5

**Campo de la invención**

La invención se refiere a una preparación inyectable a base de colágenos para su utilización en el tratamiento de las hemorragias. La preparación inyectable comprende proteínas y péptidos derivados del colágeno capaces, por sí mismos, de inducir a la vez la adhesión y la activación de las plaquetas, o incluso su agregación. La presente descripción divulga asimismo la inyección por vía sistémica/general, de urgencia, de proteínas y péptidos derivados del colágeno en unos pacientes tratados con unos antiplaquetarios en situación de urgencia (hemorragia, intervención quirúrgica).

10

**Antecedentes de la invención**

La hemorragia se define como un flujo de sangre fuera de la circulación sanguínea normal. Puede consistir en un simple sangrado o volverse masiva en ciertas situaciones, en particular traumáticas, y desembocar en un estado de choque hemorrágico asociado a una caída de la tensión arterial.

20

Diferentes contextos clínicos conducen a un riesgo de hemorragia tales como la cirugía, un traumatismo, un tratamiento, una trombopenia o un déficit constitucional o funcional (como la hemofilia) (Spahn D *et al. Critical Care* 2013, 17:R76). En las hemorragias graves, se observa una coagulopatía. La coagulopatía corresponde a un consumo de los factores plaquetarios y de la coagulación. Su tratamiento es una emergencia vital que condiciona en gran medida el final de esta hemorragia. Actualmente se siguen diferentes estrategias de tratamiento.

25

Un enfoque consiste en utilizar un soporte transfusional a base de plasma fresco congelado (PFC), de concentrado globular o de concentrado plaquetario. Sin embargo, el éxito del enfoque a base de plaquetas está limitado por varios factores, entre los cuales la accesibilidad a las plaquetas, su vida útil reducida (5 días de media), los inconvenientes relacionados con las condiciones de conservación, con el riesgo de contaminación de este tipo de muestras, su coste y el riesgo de ineficacia o incluso intolerancia por aloinmunización.

30

Otro enfoque se basa en la utilización de concentrados de factores de coagulación tales como los concentrados de fibrinógeno y los concentrados de complejo protrombina (factores II, VII, IX y X). Unos estudios han sugerido asimismo la utilización del factor VIIa (NovoSeven®).

35

Sin embargo, esta última utilización no se recomienda debido a la tasa elevada de trombosis inducida.

Por último, otro enfoque consiste en utilizar, en unas situaciones de urgencia, ácido tranexámico, que es un antagonista potente de la activación del plasminógeno y por lo tanto se comporta como un antifibrinolítico (*Fries D. Transfusion* 2013; 53:91S-95S).

40

Ninguno de los enfoques propuestos hasta ahora permite inducir la activación y la agregación de las plaquetas durante un episodio hemorrágico, aunque estos corresponden a unas etapas clave en la interrupción de los sangrados. En efecto, cuando tiene lugar una lesión vascular que conduce a un sangrado, se realiza una serie de etapas, agrupadas con el término de hemostasia primaria. Implica a las plaquetas, células anucleadas de forma discoidal biconvexa y de diámetro aproximado comprendido entre 2 y 5  $\mu\text{m}$ . Diferentes actores participan en este proceso que conduce a la formación de un clavo hemostático. La primera fase denominada de adhesión permite el reclutamiento a nivel del sitio lesionado de plaquetas circulantes. Esta etapa hace intervenir el factor Willebrand, el colágeno y unos receptores plaquetarios denominados receptores de colágeno (GpVI y  $\alpha 2\beta 1$ ). La segunda fase denominada de activación plaquetaria se traduce en particular por la liberación de factores proagregantes y la expresión en superficie de las plaquetas de proteínas tales como la P-selectina. Esta fase está seguida por la fase denominada de agregación que hace intervenir en particular el fibrinógeno y un receptor plaquetario GpIIb/IIIa y la exposición membranaria de fosfolípidos procoagulantes que permiten la fijación en el sitio de los factores de la coagulación e *in fine* la formación del coágulo fibrino-plaquetario y la detención del sangrado.

45

50

55

Ahora se ha admitido que la activación de las plaquetas durante el proceso de hemostasia conduce a la aparición de dos poblaciones de plaquetas activadas denominadas proagregantes y procoagulantes. Esta última se caracteriza por la expresión en superficie de la fosfatidilserina, origen de la generación de trombina. Se las califica entonces de plaquetas superactivadas. Se habla así de potencial de superactivación plaquetaria para describir la capacidad de cada individuo para generar esta población de plaquetas en respuesta a unos agonistas tales como la trombina y el colágeno. Unos estudios recientes sugieren que cualquier estrategia terapéutica que tenga por objetivo inducir la aparición de esta población de plaquetas activadas presenta un gran potencial para el tratamiento de situaciones hemorrágicas (*Mazepa M et al. ATVB* 2013, 33 (8):1747-52). Por otro lado, su interés está reforzado por los datos que confirman que el efecto hemostático de las plaquetas transfundidas depende de esta población. Sin embargo, los enfoques propuestos hasta ahora no están basados en la inyección en la circulación sanguínea

60

65

de activadores fisiológicos o naturales de las plaquetas tales como el colágeno o las proteínas y péptidos derivados del colágeno reivindicados en la presente invención.

5 La función central de las plaquetas en la detención de los sangrados es el origen de estudios recientes que tienen por objetivo desarrollar unos productos derivados o que imitan las plaquetas (plaquetas sintéticas).

10 Entre los enfoques propuestos, se distinguen los basados en unos productos derivados de células, tales como los tromboeritrocitos y los trombomas, o los que utilizan unas partículas de tamaño micrométrico recubiertas con péptidos derivados de proteínas implicadas en la cascada de activación de las plaquetas, tales como los sintocitos o Fibrocaps™ a base de péptidos derivados del fibrinógeno (péptidos RGD o dodecapéptido H12), o las recubiertas con péptidos de unión al factor Willebrand, al colágeno y a GpIIb/IIIa (*Lashof-Sullivan M et al. Nanoscale 2013, 5, 10719-10728*). Se ha descrito un efecto hemostático para estas partículas recubiertas con péptidos de unión al factor Willebrand, al colágeno y a GpIIb/IIIa, dejando entrever una aplicación en el contexto hemorrágico. Sin embargo, este enfoque plantea un problema principal de industrialización para este tipo de producto que combina 15 varios péptidos a nivel de una sola partícula con, a la postre, la necesidad de dominar y calificar unos parámetros tales como la tasa de injerto y la relación para cada uno de los péptidos, así como la estabilidad del producto una vez inyectado, sin contar el hecho de tener que inyectar en la actualidad unas dosis muy elevadas (del orden de varias decenas de mg por kg) (*Modery-Pawlowski C et al. Biomaterials 2013: 516-541*).

20 Existe por lo tanto una necesidad de disponer de nuevos medios de tratamiento de las hemorragias inyectables en la circulación sanguínea, que sean ventajosamente industrializables fácilmente y puedan ser empleados a bajas concentraciones.

25 Con el envejecimiento de la población, los médicos se enfrentan cada vez más a menudo a unos pacientes tratados con unos anticoagulantes y unos antiplaquetarios. Mientras que la estrategia de interrupción y de continuación de estos tratamientos está bien definida para unos actos programados (interrupción entre 5 y 7 días para nuevos los antiplaquetarios y 5 días para los nuevos anticoagulantes), estos últimos complican en gran medida el tratamiento de los pacientes, de urgencia, cuando tienen lugar situaciones hemorrágicas (cirugía o traumatismo, en particular craneal) (*Bonhomme F et al. Eur J Intern Med. marzo de 2014; 25 (3):213-20*). Se han propuesto diferentes 30 estrategias de reversión de urgencia, pero para los nuevos antiplaquetarios, se limitan principalmente a la transfusión de plaquetas (*Beynon C et al. Crit Care. 26 de julio de 2012;16(4):228*). Existe una necesidad de nuevos productos hemostáticos inyectables capaces de permitir la recuperación de una función plaquetaria cuando tienen lugar los episodios hemorrágicos, y ello, independientemente del modo de acción de estos nuevos antiplaquetarios. El hecho de que la vía de activación de las plaquetas dependiente del colágeno sea la más fisiológica y no esté, hasta ahora, modulada por un tratamiento antiplaquetario disponible comercialmente, refuerza el interés de una 35 administración por vía sistémica de proteínas o péptidos derivados del colágeno en estas situaciones. Está demostrado que la unión de GPVI con el colágeno o las proteínas o péptidos derivados del colágeno de la presente invención provoca una intensa señalización intraplaquetaria.

40 En un contexto logísticamente limitado, tal como los teatros de operaciones exteriores para los militares, el tratamiento de un cuadro hemorrágico se inscribe en el concepto de "*damage control resuscitation*" y pasa en particular por una reanimación transfusional (concentrados en glóbulos rojos, plasma y plaquetas). Sin embargo, esta situación se distingue por una dificultad de acceso a estos productos sanguíneos, en particular a los concentrados plaquetarios, que necesitan un tratamiento adaptado, agrupado bajo el término "*remote damage control resuscitation*" con, como novedad principal, la utilización de sangre total (*Jenkins DH et al. Shock. Mayo de 2014;41 Supl 1:3-12*). Esta estrategia, aunque asociada a un riesgo de contaminación, es prometedora, pero permanece limitada hasta ahora al campo militar. (*Murdock AD et al. Shock. Mayo de 2014;41 Supl 1:62-9*).

50 La presente invención se refiere por lo tanto al interés de la administración, por vía intravenosa, de proteínas o péptidos derivados del colágeno activadores de las plaquetas sanguíneas, como nuevo hemostático inyectable en tres situaciones que implican una hemorragia:

- 55 - cuando tiene lugar un episodio de sangrado masivo, en particular no compresivo, que necesita poder activar las plaquetas sanguíneas en la circulación general,
- como adyuvante cuando tiene lugar una reanimación transfusional a distancia de un centro sanitario, como complemento de un enfoque basado en la transfusión en particular de sangre total o de concentrados plaquetarios,
- 60 - como agente de reversión de los nuevos antiplaquetarios (por ejemplo, prasugrel, ticagrelor), productos comercializados actualmente sin antídoto, cuando tiene lugar una cirugía o una hemorragia en particular intracraneal.

### 65 Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a una preparación inyectable para su utilización en el tratamiento de las

hemorragias que comprende:

- unas partículas, comprendiendo dichas partículas unas proteínas o péptidos que inducen la adhesión y la activación de las plaquetas, o incluso su agregación; y
- por lo menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 presenta la medición del tamaño de las partículas por DLS después de la concentración en un factor de 50 de un extracto proteico del polipéptido de la SEC nº 1.

La figura 2 presenta un resultado obtenido por ELISA de la unión del factor Willebrand purificado (Willfactin, LFB) utilizado a 2 UI/dl final con los polipéptidos de la SEC nº 1 en forma de partículas de diferentes tamaños, utilizados a 2 µg/ml final y con el colágeno de tipo I (Colágeno SIRCOL, control positivo) utilizado a 10 µg/ml.

La figura 3A representa un perfil tipo de la expresión de la P-selectina en la superficie de plaquetas obtenido en citometría de flujo para el polipéptido de SEC nº 1 y del colágeno de tipo I (Horm).

La figura 3B representa las intensidades medias de fluorescencia obtenidas para diferentes agonistas.

La figura 4 presenta un resultado de agregación obtenido con el polipéptido de SEC nº 1 en forma de partículas.

La figura 5 presenta la estructura macromolecular observada mediante diferentes técnicas de microscopía del polipéptido de SEC nº 1 en forma de partículas en comparación con el colágeno de tipo I (Horm) en forma fibrilar.

La figura 6 representa las intensidades medias de fluorescencia obtenidas en citometría de flujo de la expresión de la P-selectina en la superficie de plaquetas extraídas tras la inyección en el ratón del polipéptido de SEC nº 1 y del colágeno de tipo I (Horm).

La figura 7 presenta los resultados de la inyección por vía intravenosa en el ratón, en presencia de epinefrina, del colágeno de tipo I (Horm) en forma fibrilar y el polipéptido de SEC nº 1 en forma de partículas en un modelo de embolia pulmonar inducido en el ratón. La figura 7A presenta los resultados obtenidos sobre la mortalidad de los ratones tras la inyección y la figura 7B presenta la biodistribución de macroagregados de albúminas radiomarcadas con tecnecio inyectado como mínimo 5 minutos después de la administración de los diferentes colágenos probados.

La figura 8 presenta los resultados de la inyección en el ratón del polipéptido de SEC nº 1 en un modelo de sangrado inducido en la cola en el ratón.

#### Descripción de las secuencias

SEC ID nº 1: polipéptido que codifica para una proteína recombinante capaz de inducir la adhesión y activación de las plaquetas.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una preparación inyectable para su utilización en el tratamiento de las hemorragias que comprende:

- unas partículas, comprendiendo dichas partículas unas proteínas o péptidos que inducen la adhesión y activación de las plaquetas; y
- por lo menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las preparaciones inyectables según la presente invención permiten estimular la actividad de las plaquetas. En algunos modos de realización, las partículas comprenden unas proteínas o péptidos que inducen la adhesión y la activación de las plaquetas y también la agregación de plaquetas una vez inyectadas en la circulación sanguínea. Estas últimas pueden ser utilizadas asimismo como adyuvante para preactivar unas plaquetas cuando tiene lugar la transfusión de concentrados plaquetarios o de sangre total.

#### Proteínas o péptidos que inducen la adhesión, la activación o incluso la agregación de las plaquetas

Las proteínas o péptidos que entran en la formulación de las preparaciones de la presente invención poseen la capacidad de inducir al mismo tiempo la adhesión y la activación de las plaquetas, o incluso también la agregación

de plaquetas. Se debe entender que estas dos o tres actividades son llevadas por una única y misma proteína o péptido. Estas proteínas o péptidos están en forma de partículas.

5 Ventajosamente, las fibrillas descritas en la presente memoria tienen una longitud inferior a 9 µm, 8 µm, 7 µm, 6 µm, 5 µm, 4 µm, 3 µm, 2 µm, 1 µm o 0,5 µm. Más ventajosamente, las fibrillas tienen una longitud comprendida entre 0,5 y 9 µm, entre 1 y 5 µm o también entre 2 y 4 µm.

10 Estas proteínas o péptidos son capaces de unir o incluso activar el factor Willebrand, responsable de la adhesión de las plaquetas y de inducir la expresión de superficie de la P-selectina o incluso de la fosfatidilserina, marcadores de activación de las plaquetas. En algunos modos de realización, las proteínas o péptidos son capaces de inducir *in vitro* la agregación de un plasma rico en plaquetas o en sangre total.

15 En algunos modos de realización, las proteínas o péptidos pueden estimular las plaquetas e inducir la interrupción de un sangrado sin ser capaces necesariamente de inducir la activación de la coagulación, dependiente de la expresión en superficie de las plaquetas de la fosfatidilserina y la formación de una superficie denominada procoagulante y la generación de trombina que se desprende de ello. Esto permite limitar el riesgo de trombosis inducida después de una inyección sistémica de la preparación. Sin embargo, se puede producir la activación de esta subpoblación de plaquetas activadas, denominadas plaquetas procoagulantes, pero por debajo del nivel necesario para la generación de trombina detectable mediante unas pruebas habituales.

20 Una familia de proteínas, los colágenos, posee la capacidad de inducir las tres actividades mencionadas anteriormente gracias a la presencia en la secuencia de algunos colágenos, principalmente los colágenos de tipo I y III, de motivos peptídicos capaces de unirse al factor Willebrand que circula como con dos receptores plaquetarios, GpVI y α2β1.

25 El conjunto concurre en la adhesión de las plaquetas, en su activación y después en su agregación. Las proteínas que entran en la formulación de las preparaciones de la presente invención pueden así ser seleccionadas de entre los colágenos, en particular los colágenos de tipo I y III.

30 Sin embargo, hasta ahora no se ha propuesto utilizar colágeno para tratar las hemorragias. Esto puede explicarse por el hecho de que, entre los colágenos nativos, solo aquellos en forma fibrilar se describen como capaces de inducir la adhesión, la activación y la agregación de las plaquetas. (*Clementson K. Thrombosis Research 2012 129 220-224*). Sin embargo, esta forma fibrilar, con unas fibras que pueden alcanzar varios micrómetros de longitud, no es compatible con una inyección en la circulación sanguínea. Las formas particuladas de la presente invención  
35 son compatibles con una inyección en la circulación sanguínea.

40 Unas formas particuladas del colágeno, tales como las microesferas, las pequeñas microfloras, los dendrímeros se pueden obtener mediante unos procedimientos tales como los que describen *Pires M y Chmielewski J. J. Am. Chem. Soc. 2009 131, 2706-2712; Przybyla D et al. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 3418-3422; Kojima C et al. J. Am. Chem. Soc. 2009 131, 30652-6053; Slatter D et al. Peptides 2012 36, 86-93; Kar et al. Journal of Biological Chemistry 2006 vol 281, nº 44 33283-33290*. Para obtener estas formas particuladas, se han utilizado diferentes enfoques, basados en particular en la utilización de metales, de sales, en la adición de cisteína (puentes disulfuros) o de aminoácidos aromáticos en la secuencia peptídica o también en la relación entre aminoácidos de naturaleza diferente (polares, apolares, ácidos, básicos).

45 Además de los colágenos, las proteínas que entran en la formulación de las preparaciones de la presente invención pueden ser unas proteínas recombinantes tales como las descritas en la solicitud de patente internacional WO 2010/034718. Estas proteínas recombinantes derivadas del colágeno son capaces de inducir la agregación de las plaquetas de manera equivalente al colágeno nativo. Otras proteínas útiles en la presente invención y  
50 derivadas del colágeno son tales como las descritas en la solicitud de patente europea EP 2013/071816. Estas proteínas son capaces de unirse al factor Willebrand, unión implicada en la adhesión inicial de las plaquetas a nivel de un sitio vascular lesionado.

55 Así, las proteínas que entran en la formulación de las preparaciones de la presente invención se pueden seleccionar de entre los colágenos nativos, tales como los colágenos de tipo I o III, o las proteínas recombinantes cuya secuencia incluye por lo menos un polipéptido seleccionado de entre:

- el polipéptido de la secuencia ID nº 1;
- 60 - un polipéptido que tiene unas secuencias formadas por la repetición de tripletes GXY en los que G designa la glicina y X e Y cualesquiera aminoácidos repetidos n veces, siendo n superior o igual a 2;
- el polipéptido que tiene la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1; o
- 65 - un polipéptido que presenta por lo menos el 70% de identidad en toda su longitud con el polipéptido de la secuencia ID nº 1 o con el polipéptido que tiene la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la

secuencia ID nº 1.

Además, se pueden considerar como unos derivados de colágeno, unos péptidos o polipéptidos, natural o sintético, que poseen en su secuencia una glicina cada 3 aminoácidos (*An B et al. Frontiers in chemistry. Junio de 2014; 2 artículo 40*). Esta estructura primaria de la cadena induce una conformación de la cadena peptídica de la misma manera que el colágeno en presencia de aminoácidos (ejemplo de las cisteínas) o de secuencias peptídicas que permiten la forma de estructuras multiméricas (ejemplos de los dominios de trimerización de las proteínas MBL. [Mannose Binding Lectin]).

El péptido desde la posición 1 a la posición 24 de la SEC ID nº 1 corresponde al péptido señal que permite la secreción de la proteína recombinante por una célula huésped. Este péptido señal podrá estar ausente o sustituirse por otro péptido señal según unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia. El experto en la materia sabrá elegir el péptido señal homólogo o heterólogo apropiado para la expresión y la secreción de los polipéptidos en diferentes sistemas de expresión procariotas o eucariotas. Preferentemente, los polipéptidos se producen en unas células o unos organismos eucariotas y en particular en unas células de mamíferos. En un modo de realización particular de la invención, los polipéptidos comprenden un péptido señal que permite su secreción en el medio extracelular. En otro modo de realización, el polipéptido maduro se obtiene tras la escisión del péptido señal.

En algunos modos de realización, la secuencia de las proteínas recombinantes incluye por lo menos un polipéptido que comprende los motivos peptídicos siguientes:

- $GX_1X_2GER$  en el que  $X_1$  y  $X_2$  representan independientemente un aminoácido seleccionado de entre A, R, N, D, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V y O;
- $(GPX_3)_n$  estando n comprendido entre 4 y 10 y  $X_3$  representa P u O; y
- $GPRGQX_4GVMGFX_5$  en el que  $X_4$  y  $X_5$  representan independientemente P u O.

P es la prolina y O es la hidroxiprolina.

En algunos modos de realización, la secuencia de las proteínas recombinantes incluye por lo menos un polipéptido que comprende los motivos peptídicos siguientes:

- GAPGER,
- KPGEPPGPK,
- $(GPP)_n$  estando n comprendido entre 4 y 10,
- RGD.

Las proteínas recombinantes comprenden así:

- (a) unas secuencias de péptidos que presentan como mínimo una repetición de 4 tripletes GPO;
- (b) unas secuencias peptídicas que tienen una actividad de unión a los diferentes receptores plaquetarios y presentes en la secuencia nativa de los colágenos; y
- (c) unas secuencias de unión formadas por la repetición de tripletes GXY entre las secuencias (a) y (b) en los que G designa la glicina y X e Y designan cualquier aminoácido.

Las proteínas recombinantes que entran en la formulación de las preparaciones de la presente invención pueden presentar una secuencia que incluye por lo menos un polipéptido que presenta por lo menos el 70% de identidad en toda su longitud con el polipéptido de la secuencia ID nº 1 o con el polipéptido que tiene la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1. En algunos modos de realización, los polipéptidos presentan por lo menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 98% y preferentemente por lo menos el 99% de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 1. El porcentaje de identidad designa el porcentaje de aminoácidos idénticos (aminoácidos invariables o sin cambios entre dos secuencias). Estos polipéptidos pueden presentar una delección, una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido con respecto al polipéptido de la SEC ID nº 1.

Los procedimientos de medición del porcentaje de identidad entre polipéptidos son conocidos por el experto en la materia. Se puede utilizar Vector NTi 9.1.0, programa de alineación AlignX (Clustal W algorithm) (Invitrogen INFORMAX, <http://www.invitrogen.com>). Preferentemente, se utilizan los parámetros por defecto.

Las proteínas recombinantes pueden ser producidas por unas bacterias y unas células de mamíferos mediante unos procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, en particular tales como los descritos en los documentos WO 2010/034718 y EP 2013/071816.

En algunos modos de realización, las proteínas son capaces asimismo de unirse al colágeno presente a nivel de los sitios vasculares lesionados, en particular a través de la presencia en su secuencia de un motivo GPO repetido  $n$  veces, siendo  $n = 3$  a  $10$ .

- 5 En algunos modos de realización, las proteínas pueden estar PEGiladas o PASiladas (adición  $n$  veces de los aminoácidos prolina, alanina y serina).

Los péptidos que entran en la formulación de las preparaciones de la presente invención pueden ser tales como los descritos anteriormente. Los péptidos se pueden seleccionar así de entre:

- 10
- el polipéptido de la secuencia ID nº 1;
  - un polipéptido que tiene unas secuencias formadas por la repetición de tripletes GXY en los que G designa la glicina y X e Y cualesquiera aminoácidos repetidos  $n$  veces, siendo  $n$  superior o igual a 2;
  - 15 - el polipéptido que tiene la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1; o
  - un polipéptido que presenta por lo menos el 70% de identidad en toda su longitud con el polipéptido de la secuencia ID nº 1 o con el polipéptido que tiene la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1.
- 20

Los polipéptidos están aislados o purificados de su entorno natural. Los polipéptidos se pueden preparar mediante diferentes procedimientos. Estos procedimientos son en particular la producción de polipéptidos recombinantes por unas células hospedantes apropiadas y su purificación posterior, la producción por síntesis química o, por último, una combinación de estos diferentes enfoques. Estos diferentes procedimientos de producción son bien conocidos por el experto en la materia. Preferentemente, los polipéptidos son producidos por unas células procariontas o eucariotas recombinantes. Los polipéptidos pueden ser producidos así en unas bacterias o en unas células de mamíferos.

25

- 30 En algunos modos de realización de la invención, los polipéptidos están glicosilados. El polipéptido de la SEC ID nº 1 posee en particular unos sitios de O-glicosilación que presentan en los aminoácidos lisinas presentes en la posición 102 y 141 (en la posición 3 de un triplete GXY). En un modo de realización preferido, el residuo asparagina en la posición 93 del polipéptido de la SEC ID nº 1 está glicosilado.

### 35 Proteínas en forma fibrilar

Las proteínas que entran en la formulación de las preparaciones inyectables que constituyen el objeto de la presente descripción pueden estar estructuradas en forma de fibrillas que presentan una longitud inferior a  $10\ \mu\text{m}$ . Las formas fibrilares que comprenden unas fibras que tienen una longitud superior a  $10\ \mu\text{m}$  y que pueden alcanzar varios micrómetros de longitud no son compatibles con una inyección en la circulación sanguínea.

40

La longitud de una fibrilla se puede medir mediante unos procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, en particular por microscopía como la microscopía de fuerza atómica (AFM).

### 45 Partículas

Las partículas que entran en la formulación de las preparaciones de la presente invención pueden comprender, o consistir en, unas proteínas o péptidos que inducen la adhesión y activación de las plaquetas, o incluso su agregación. Las proteínas y péptidos son tales como los descritos anteriormente.

50

En algunos modos de realización, que constituyen el objeto de la presente descripción, las partículas se pueden obtener por adhesión de las proteínas o péptidos sobre un soporte. Las partículas que entran en la formulación de las preparaciones de la presente invención comprenden así unos soportes sobre los que se adhieren unas proteínas o péptidos que inducen la adhesión, la activación o incluso la agregación de las plaquetas.

55

Los soportes pueden ser unas micropartículas orgánicas o inorgánicas. Unos ejemplos de micropartículas incluyen la albúmina, unos lípidos, unos metales tales como el oro, el titanio, el hierro, la plata o sus óxidos, grafeno, sílice o unos polímeros.

- 60 La adhesión de las proteínas o péptidos sobre los soportes se puede realizar mediante enlace covalente a través de las funciones presentes en la superficie de la partícula o a través de un agente de unión bifuncional o un polímero bifuncional. El agente de unión bifuncional o el polímero bifuncional permite funcionalizar las micropartículas. Presenta en uno de sus extremos un grupo funcional que le permite injertarse de manera covalente en la superficie de las micropartículas, y en el otro extremo, un grupo funcional que le permite injertarse de manera covalente a las proteínas o péptidos.
- 65

Preferentemente, el polímero bifuncional es un polímero heterobifuncional. La presencia de dos grupos funcionales diferentes permite limitar los acoplamientos no deseados, tales como el injerto de los dos extremos del polímero sobre las micropartículas. Preferentemente, la afinidad entre los grupos funcionales terminales del polímero es baja asimismo con el fin de limitar la autocondensación del polímero por interacción entre estos dos extremos.

5 Se pueden utilizar diferentes tipos de polímeros bifuncionales para funcionalizar las micropartículas. Los polímeros bifuncionales se pueden seleccionar así de entre los polietilenglicoles (PEG), los poli(ácido láctico-coglicólico) (PLGA), los poli(caprolactona) (PLCL), los poli(ácido láctico) (PLA), los polímeros de glicólido (PGA), el quitosano y el dextrano, etc. Preferentemente, el polímero es un polietilenglicol bifuncional, preferentemente heterobifuncional. La masa molecular del polímero varía generalmente de 500 Da a 10000 Da, preferentemente de 2000 a 8000 Da, preferentemente alrededor de 5000 Da. La masa molecular del polímero se selecciona típicamente de manera que cuando una proteína o péptido se acopla a las micropartículas por medio del polímero bifuncional, la cadena del polímero alcance una longitud suficiente para que las propiedades de la proteína o del péptido no se vean alteradas por la presencia de la micropartícula.

15 En algunos modos de realización, las partículas se pueden obtener por autoensamblaje de las proteínas o péptidos. En dichos modos de realización, las partículas no comprenden ningún soporte, consisten únicamente en unas proteínas o péptidos. El autoensamblaje se puede realizar por diferentes medios, tal como por coacervación o por agregación, por ejemplo por precipitación, concentración, adiciones de metales o de sales, variación de temperatura.

20 Las partículas de la presente invención pueden tener un diámetro medio que va de 0.05  $\mu\text{m}$  a 6  $\mu\text{m}$ , o de 1 a 5  $\mu\text{m}$  o de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , tal como se mide mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). De manera ventajosa, el diámetro medio de las partículas de la presente invención puede estar comprendido entre 0,02  $\mu\text{m}$  y 0,05  $\mu\text{m}$ , comprendido por ejemplo entre 0,025 y 0.045, o por ejemplo ser igual a 0,035  $\mu\text{m}$ .

25 Cuando las partículas comprenden o consisten en unas proteínas recombinantes cuya secuencia incluye por lo menos un polipéptido seleccionado de entre:

- 30
- el polipéptido de la secuencia ID nº 1;
  - el polipéptido que tiene la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1; o
  - un polipéptido que presenta por lo menos el 70% de identidad en toda su longitud con el polipéptido de la
- 35 secuencia ID nº 1 o con el polipéptido que tiene la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1;

40 y cuando presentan un diámetro medio superior a 2  $\mu\text{m}$  tal como se mide por DLS, son capaces de inducir la adhesión, la activación y la agregación de las plaquetas. Este efecto se encuentra asimismo para unas moléculas cuyo diámetro medio es inferior a 2  $\mu\text{m}$ , comprendido por ejemplo entre 0,02  $\mu\text{m}$  y 1  $\mu\text{m}$ , entre 0,05  $\mu\text{m}$  y 0,5  $\mu\text{m}$ , o incluso entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,3  $\mu\text{m}$ .

#### Vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable

45 Unos vehículos o unos excipientes farmacéuticamente aceptables según la invención, es decir unos vehículos o unos excipientes cuya administración a un individuo no va acompañada de efectos deletéreos significativos, son bien conocidos por el experto en la materia.

50 De manera no limitativa, unos ejemplos de excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen los disolventes, agentes de fluidez, agentes de puesta en suspensión, agentes de solubilización, estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes y agentes quelantes.

55 Las preparaciones inyectables según la presente invención pueden ser preparadas según unos procedimientos bien conocidos por el experto en la materia.

Las preparaciones inyectables según la presente invención son capaces de controlar los sangrados eventualmente por activación de las plaquetas y/o de sustituir a unas plaquetas en el caso de los síndromes hemorrágicos.

60 La presente descripción divulga unos procedimientos de tratamiento de las hemorragias que comprenden la administración por inyección en la circulación sanguínea de un individuo de una cantidad eficaz de una preparación tal como la definida anteriormente.

65 Resulta evidente así que, en el contexto de la presente invención, una "inyección" es sinónimo de una administración sistémica, o también denominada administración general, del producto de la invención a un paciente.

La presente descripción divulga, por último, la utilización de una preparación tal como la definida anteriormente para la preparación de un medicamento para tratar las hemorragias.

## Ejemplos

5

### Producción de un colágeno y autoensamblaje en partículas (procedimiento de determinación del tamaño de las partículas por DLS)

10 Se realiza un precultivo de las células CHO-S (Invitrogen) de 3 semanas antes de la transfección. Las células se mantienen en un medio dedicado a las células CHO (Power-CHO, EXCEL 302, proCHO4, proCHO5, etc.) complementado con 4 mM de L-glutamina (Lonza) y 1X de proHT (Lonza) en un matraz de agitación de 125 ml y en condiciones de agitación (80 rpm) en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Dos días antes de la transfección, las células son inoculadas a 5.10<sup>5</sup> células viables/ml mediante un cambio completo del medio utilizado y cultivadas en 12,5 ml de medio dedicado a las células CHO complementado en un matraz de agitación de 125 ml.

15

El día de la transfección, se sedimentan 5.10<sup>6</sup> células viables por centrifugación (5 min a 1000 g), y después se recogen en 5 ml de medio RPMI (Lonza) complementado con 4 mM de L-glutamina (Lonza) y 1 x de ProHT (Lonza). Se distribuyen entonces cuatro ml de suspensión en 4 matraces de agitación de 25 ml (1 ml por frasco) que contienen 9 ml de medio RPMI complementado (1.10<sup>6</sup> células viables por matraz de agitación). Las células CHO-S son transfectadas entonces con el vector que contiene la secuencia codificante para el polipéptido de SEC n° 1 descrito anteriormente. Se realiza un control positivo de transfección transfectando las células con el vector pMAX-GFP y se realizan 2 controles negativos de la transfección o bien transfectando las células con un vector que no posee el casete de resistencia a la geneticina, o bien no someténdolas a ningún tratamiento. La transfección se realiza con la ayuda del agente de transfección Fecturina (PolyPlus Transfection) o cualquier otro agente de transfección adaptado y según el protocolo comercial del producto optimizado. Para la Fecturina, las condiciones de transfección consideradas son 6 µg de ADN para 12 µl de Fecturina (relación ADN/agente de transfección = 1/2) para 10<sup>6</sup> células viables. El experto en la materia sabrá cómo definir el agente de transfección más adaptado para una transfección denominada transitoria o para una transfección denominada estable. Ya se trate de un modo de transfección transitorio o estable, las células son incubadas en presencia de los complejos de transfección en condiciones estáticas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. 4 h tras la transfección, las células se resuspenden en un medio dedicado a las células CHO complementado y se vuelven a poner en condiciones de agitación. 24 h tras la transfección, se realiza una cuantificación de la eficacia de transfección en una alícuota de los controles positivos y negativos de transfección por citometría de flujo.

20

25

30

35 Para la producción del polipéptido de SEC n° 1 en modo denominado transitorio, se realiza una primera extracción de sobrenadante el D+3 (correspondiendo el D0 al día de transfección) y se detiene después el cultivo el D+5. El sobrenadante de cultivo que contiene el polipéptido de SEC n° 1 secretado por las células es recuperado tras la centrifugación a 3000 g durante 10 minutos, permitiendo así la eliminación de las células y restos celulares, y después se congela a -20°C.

40

45 Para la producción del polipéptido de SEC n° 1 en modo denominado estable, se realiza un recuento celular 48 horas tras la transfección. La totalidad de las células se centrifuga a continuación a 1000 g durante 5 min y se inoculan después a 3.10<sup>5</sup> células viables/ml en medio dedicado a las células CHO complementado + geneticina (G418 Merck) a 700 µg/ml (presión de selección). Las células son mantenidas a continuación tres veces por semana por inoculación de la totalidad de las células en 12,5 ml final de medio completo + G418 a 700 µg/ml en matraces de agitación de 125 ml. Se observa una disminución de la concentración celular y/o de la viabilidad celular en la primera semana de cultivo bajo presión de selección. La viabilidad celular aumenta de nuevo tras 2-3 semanas bajo presión de selección únicamente para las células transfectadas con el vector que contiene la secuencia codificante para el polipéptido de SEC n° 1 o el vector vacío. La viabilidad de las células no transfectadas continúa descendiendo hasta volverse nula. Cuando el cultivo alcanza más del 95% de viabilidad, se realiza una criopreservación a 5.10<sup>6</sup> células viables/ampolla (10 ampollas). Las células se congelan en medio dedicado a las células CHO complementado + 10% de DMSO.

50

55 Para realizar una producción del polipéptido de SEC n° 1, las células modificadas genéticamente para producir el polipéptido de SEC n° 1 se descongelan y se mantienen en un medio adaptado. Las células se colocan en 12,5 ml de medio final y se colocan en un matraz de agitación de 125 ml en un agitador LabTherm® Kühner agitado a 80 rpm, regulado al 5% de CO<sub>2</sub> y con una humedad comprendida entre 40 y 80%. Las células se mantienen a 3.10<sup>5</sup> células viables/ml durante una a dos semanas. A continuación, las células se amplifican con el fin de obtener la cantidad necesaria para realizar una producción. La amplificación consiste en mantener las células en unos volúmenes más elevados en cada mantenimiento para conservar todas las células a una concentración viable.

60

65 Cuando se obtiene la cantidad de células necesaria para la producción, se puede iniciar la producción. Las células son inoculadas a 3.10<sup>5</sup> células viables/ml. La producción se puede realizar en diferentes equipos: matraces de agitación colocados en un agitador LabTherm® Kühner, Cultibag RM 20/50® (Sartorius), CellReady® (Merck Millipore), BioBundle® (Applikon) y otros equipos equivalentes, de la misma escala o de escala superior. El cultivo de las células se realiza durante 5 días o más, como máximo 10 días, según las condiciones de realización del

cultivo. Cada día se controlan los parámetros de producción, así como la concentración celular y la viabilidad celular. Durante la producción se pueden añadir unos componentes tales como unos aminoácidos, unas vitaminas, glucosa o cualquier otro elemento que presente un interés para la producción o para las células. En este caso, se trata de un cultivo en modo "fed-batch" o "semicontinuo" que permite cultivar las células durante un máximo de 21 días. Si no se añade ningún compuesto durante el cultivo, se habla de cultivo en modo "batch" o "discontinuo".

La purificación del polipéptido de SEC nº 1 se puede realizar por ejemplo a través de una etiqueta de purificación como la tag-6(His) presente en su secuencia. Así, las células y restos celulares presentes en el medio que contiene el polipéptido de SEC nº 1 son eliminados por centrifugación o filtración en profundidad (POD Millistak+® Merck Millipore o cualquier otro tipo de soporte equivalente) o filtración tangencial sobre una membrana que presenta un umbral de corte de 0,2 µm. El sobrenadante así obtenido es purificado por cromatografía de afinidad sobre una columna quelada con un metal tal como el níquel, el cobalto, el zinc o el cobre. Con el fin de favorecer el enganche del polipéptido de SEC nº 1, se añade al sobrenadante un tampón que contiene de 0 a 50 mM imidazol, de 0 a 500 mM NaCl, de 5 a 20 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O) y de 5 a 20 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O) y se ajusta a un pH entre 7 y 8. La elución del polipéptido según la invención se realiza o bien por gradiente utilizando una mezcla de dos tampones (tampón 1: 500 mM imidazol, 500 mM NaCl, 10 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O) y 10 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O)); tampón 2: 20 mM imidazol, 500 mM NaCl, 10 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O) y 10 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O)), o bien de manera isocrática, con un tampón que contiene de 50 a 500 mM imidazol, de 0 a 500 mM NaCl, de 5 a 10 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O) y de 5 a 10 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O). Eventualmente, con el fin de mejorar la pureza del polipéptido de SEC nº 1, se pueden añadir otras etapas de purificación. Se puede tratar de filtraciones, de cromatografía de intercambio de iones, de cromatografía de afinidad, de cromatografía de interacción hidrófoba, de exclusión estérica o de cualquier otro tipo de cromatografía.

Las fracciones de elución de interés son puestas a migrar en un gel de electroforesis en condiciones nativas y se colorean con azul de Coomassie, antes de ser agrupadas según su perfil y dializadas en agua o un tampón fosfato o cualquier otro tampón adaptado para la conservación del polipéptido según la invención. La concentración del polipéptido se determina mediante el kit Sircol® (TebuBio) según las instrucciones del fabricante o mediante la prueba de Bradford o cualquier otra prueba adaptada para la cuantificación del polipéptido de SEC nº 1.

El polipéptido de SEC nº 1 se concentra varias veces (50 veces) con respecto a su volumen inicial mediante ultrafiltración, que permite alcanzar una concentración proteica suficiente para inducir el autoensamblaje del polipéptido de SEC nº 1 y la formación de partículas. El extracto proteico que contiene el polipéptido de SEC nº 1 se concentra así sobre unas columnas de ultrafiltración que tienen un corte de 10000 Da (Vivaspin 4; Sartorius) mediante unas centrifugaciones repetidas realizadas a 4°C y a 4000 rpm. Una vez concentrada la solución, se realiza una medición del tamaño de las partículas así formadas mediante la técnica de difusión dinámica de luz (DLS) con la ayuda de un aparato de la serie Zetasizer nano de Malvern. La medición en DLS es una técnica de análisis espectroscópico no destructivo que permite acceder al tamaño de partículas en suspensión en un líquido particularmente adaptado para la medición del autoensamblaje o de la agregación de proteínas como el polipéptido de SEC nº 1.

La figura 1 presenta un resultado característico de medición del tamaño de las partículas obtenido por DLS después de la concentración en un factor de 50 de un extracto proteico del polipéptido de SEC nº 1. Se observa una serie de picos correspondientes a diferentes tamaños de partículas presentes en la solución. Tres picos son así mayoritarios. Corresponden a unos tamaños de partículas de 1,25; 3 y 5,5 µm. Con el fin de relacionar la actividad biológica del polipéptido de SEC nº 1 con el tamaño de las partículas así generadas, se añade a la solución 20 mM finales de ácido clorhídrico. Se observa entonces la desaparición de los tres picos medidos previamente y la aparición de 2 picos a aproximadamente 500 nm y 1.8 µm. Visualmente se observa un "aclaramiento" de la fracción que pasa de un aspecto granuloso a un aspecto translúcido.

#### Medición de la actividad de unión al factor Willebrand en función del tamaño de las partículas

La preparación a base del polipéptido de SEC nº 1 en forma de partículas posee la capacidad de unir el factor Willebrand. La medición de la actividad de unión del factor Willebrand al polipéptido de SEC nº 1 mediante la técnica denominada ELISA se realiza en unas placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp). Para ello, se añaden a cada pocillo un volumen de 100 µl de una solución que contiene el polipéptido a 2 µg/ml en tampón fosfato o cualquier otro tampón adaptado y se incuban 18-20 horas a 22°C. Tras tres lavados con 200 µl de PBS-Tween al 0,05%, se añaden a cada pocillo 200 µl de una solución de BSA al 1% en tampón fosfato (Euromedex, filtrado a través de 0,45 µm) y se incuban 2 h a temperatura ambiente (22°C). Después de tres lavados con 200 µl de PBS-Tween al 0,05%, se incuban 100 µl de diferentes concentraciones (expresadas en UI/dl) de factor Willebrand purificado (Wilfactin 100 UI/ml, LFB) y/o de plasma de paciente diluido en tampón fosfato o cualquier otro tampón adaptado durante 1 h 30 a temperatura ambiente (22°C). Después de tres lavados más, se incuban 100 µl de una solución que contiene un anticuerpo primario anti-vWF acoplado a peroxidasa de rábano picante (Rabbit anti-human VWF/HRP, DAKO) diluido a 1/8000<sup>a</sup> en tampón fosfato o cualquier otro tampón adaptado 1 h a 22°C y después se realizan 4 lavados como se ha descrito anteriormente. Se añaden a continuación 125 µl de solución de tetrametilbencidina como sustrato para la peroxidasa (TMB, Sigma) y después se incuban 10 a 45 minutos como máximo en la oscuridad. La reacción se interrumpe mediante la adición de 125 µl de HCl 2N (Sigma). La

absorbancia se mide rápidamente a 450 nm en un espectrofotómetro (Wallacvictor 3). Se realiza un blanco reemplazando el wWF purificado o el plasma por tampón fosfato o cualquier otro tampón adaptado.

5 La figura 2 presenta un resultado obtenido por ELISA de la unión del factor Willebrand purificado (Willfactin, LFB) utilizado a 2 UI/dl final a los polipéptidos de SEC nº 1 en forma de partículas de diferentes tamaños, utilizados a 2 µg/ml final y al colágeno de tipo I (colágeno SIRCOL, control positivo) utilizado a 10 µg/ml.

10 Los resultados muestran que el polipéptido de SEC nº 1, formado mayoritariamente por partículas de tamaño superior a 2 µm, es capaz de unir el factor Willebrand de manera equivalente al colágeno de tipo I. La actividad de unión al factor Willebrand aumenta en gran medida cuando el polipéptido de SEC nº 1 está en forma de partículas de tamaño inferior a 2 µm. Este último resultado sugiere que el autoensamblaje del polipéptido de SEC nº 1 en partículas de tamaño más grande disminuye el número de sitios de reconocimiento al factor de Willebrand, estando estos últimos "enmascarados" en el interior de las partículas de tamaño grande. Este resultado muestra que un polipéptido de SEC nº 1 estructurado en partículas con un tamaño comprendido entre 1 y 5 µm es muy capaz de unir el factor Willebrand.

#### Medición de la expresión superficial de la P-selectina inducida por colágeno en función del tamaño de las partículas

20 La preparación a base del polipéptido de SEC nº 1 en forma de partículas posee la capacidad de inducir la activación de las plaquetas. Esta activación se puede determinar en sangre total midiendo por citometría de flujo la expresión en superficie de las plaquetas de la P-selectina. En unas plaquetas en reposo, esta última se almacena en unos gránulos, denominados granos alfa. Cuando tiene lugar la activación de las plaquetas por diferentes agonistas, la P-selectina se descarga de estos gránulos y es detectable en superficie de las plaquetas.

25 Se realiza una extracción de sangre en un tubo citratado (BD Vacutainer, BD Biosciences) y se estabiliza después 1 h antes de ser utilizado. En unos tubos de vidrio, se añade un volumen de 50 µl de sangre a un volumen de 50 µl de una solución de tampón fosfato que contiene el polipéptido de SEC nº 1 a 50 µg/ml (es decir, 25 µg/ml al final) y después se incuba el conjunto 10 minutos a temperatura ambiente.

30 La reacción se estabiliza a continuación mediante la adición de 500 µl de tampón fosfato a cada tubo. A unos tubos de citometría, se les añade un volumen de 20 µl de la mezcla de reacción descrita anteriormente a 20 µl de una solución que contiene o bien un anticuerpo primario anti-CD62P acoplado a la FITC (FITC Mouse Anti-Human CD62P, *BD Biosciences*), o bien un anticuerpo isotipo de control acoplado a la FITC (FITC Mouse IgG1 κ isotype control, *BD Biosciences*) y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añade a continuación un volumen de 2 ml de tampón fosfato en cada tubo. La media de fluorescencia (MFI; Mean Fluorescence Intensity) se mide rápidamente a 520 nm con la ayuda de un citómetro de flujo (LSRII, *BD Biosciences*). Se realiza un control negativo sustituyendo el polipéptido de SEC nº 1 por tampón fosfato. Se realizan dos controles positivos sustituyendo el polipéptido de SEC nº 1 por el activador plaquetario derivado de la trombina TRAP (kit de diagnóstico clínico humano: PLT Gp/Receptors Kit (*Bioctyex*) o el activador ionóforo A23187 (*Calbiochem (Merck)*; *Streptomyces chartreusensis*). Se realiza un referente sustituyendo el polipéptido por colágeno de tipo I utilizado a 50 µg/ml (Horm).

45 La figura 3A corresponde a una representación de un perfil tipo de la expresión de la P-selectina en superficie de plaquetas obtenido por citometría de flujo para el polipéptido de SEC nº 1 y colágeno de tipo I (Horm), colágeno de referencia. La tabla de la figura 3B agrupa las intensidades medias de fluorescencia obtenidas para diferentes agonistas. El TRAP y el ionóforo de calcio se utilizan como controles positivos de activación.

50 El polipéptido de la SEC nº 1 que presenta unos tamaños de partículas superiores a 2 µm es capaz de inducir la activación de las plaquetas caracterizada por la expresión en superficie de la P-selectina. Esta activación es equivalente a la inducida por el colágeno de tipo I fibrilar (fibras superiores a 1 µm), utilizado a la misma concentración. El polipéptido de SEC nº 1 que presenta unos tamaños de partículas inferiores a 2 µm (SEC nº 1 + 20 mM HCl) es capaz asimismo de inducir la expresión de la P-selectina y por lo tanto la activación de las plaquetas, pero de manera menos importante (47.3 frente a 70.4 MFI).

#### Medición de la agregación plaquetaria inducida por colágeno en función del tamaño de las partículas

60 La preparación a base del polipéptido de SEC nº 1 en forma de partículas posee una actividad proagregante sobre las plaquetas sanguíneas humanas detectada con la ayuda de un tromboagregómetro (compañía Soderel, Florange, Francia), según la técnica de referencia (Born 1962). El plasma rico en plaquetas (PRP) es puesto en contacto con un agonista (10 µl en 290 µl de PRP) y se controla el aclaramiento del medio (relacionado con la formación de agregados) en tiempo real (curva de agregación). En ausencia de agregación plaquetaria, la señal permanece plana (medio turbio persistente). Es posible verificar la ausencia o la presencia de agregados con el examen del tubo al final de la medición. La evaluación de la respuesta en la prueba de agregación plaquetaria se efectúa a 37°C, en agitación continua (1000 rpm). El aparato se calibra de la manera siguiente: 0% de agregación con el plasma rico en plaquetas (preparación obtenida por centrifugación lenta y concentración ajustada a 300 x 10<sup>9</sup>/l) y 100% de agregación con el plasma pobre en plaquetas (preparación obtenida por centrifugación rápida).

La calidad de las preparaciones plaquetarias se valida verificando la respuesta a unos agonistas de referencia (ADP 5  $\mu\text{M}$  y colágeno 1  $\mu\text{g/ml}$ ), utilizados para la puesta a punto de las terapias antiplaquetarias. Se considera que una proteína es proagregante cuando es capaz de inducir una agregación superior al 40% y esto, de manera irreversible.

5 La figura 4 presenta un resultado de agregación obtenido con el polipéptido de SEC nº 1 en forma de partículas. La vía 1 muestra que la preparación del polipéptido de SEC nº 1 que presenta unos tamaños de partículas superiores a 2  $\mu\text{m}$  es capaz de inducir la agregación plaquetaria en menos de 1 minuto y de manera equivalente al colágeno de tipo I Horm (vía 4), colágeno de referencia en forma fibrilar. Por el contrario, el polipéptido de SEC nº 1 que presenta unos tamaños de partículas inferiores a 2  $\mu\text{m}$  no es capaz de inducir la agregación de las plaquetas (vía 2) incluso después de 10 minutos. Esta ausencia de actividad no está relacionada con la presencia en la solución de 20 mM de HCl ya que la vía 3 muestra una agregación normal de las plaquetas cuando son estimuladas por colágeno de tipo I, añadido después de 6 minutos, en presencia de 20 mM de HCl.

15 Este resultado demuestra que para obtener una actividad proagregante, el polipéptido de SEC nº 1 debe estar estructurado en forma de partículas de tamaños superiores a 2  $\mu\text{m}$ .

En conclusión, estos diferentes ejemplos han demostrado que el polipéptido de SEC nº 1 es capaz de estructurarse en forma de partículas de tamaño comprendido entre 1 y 6  $\mu\text{m}$ , que estas partículas poseen la capacidad de unirse al factor Willebrand, de inducir la activación de las plaquetas (expresión de superficie de la P-selectina) y, únicamente cuando el tamaño de las partículas es superior a 2  $\mu\text{m}$ , de provocar la agregación de las plaquetas.

Observación mediante diferentes técnicas de microscopía de la estructuración del polipéptido de SEC nº 1 en forma de partículas en comparación con el colágeno de tipo I (Horm) fibrilar.

25 Existen diferentes técnicas de microscopía que permiten visualizar bien la estructura macromolecular de una molécula, y esto, con diferentes resoluciones y escalas. La figura 5 presenta unas imágenes obtenidas con tres técnicas de microscopía (microscopía de transmisión, de barrido y de fuerza atómica) que permiten la observación de la estructuración de proteínas de tipo colágeno.

30 Para la observación por microscopía de transmisión, se deposita el colágeno de tipo I o el polipéptido de SEC nº 1 sobre un portaobjetos de vidrio durante 2 horas a 37°C antes de ser observado con la ayuda de un microscopio invertido con contraste de fase de tipo ZEISS con el objetivo X60. Las imágenes se obtienen con la ayuda de una cámara ZEISS AxioCam ICc 1.

35 Para la observación por microscopía de barrido (MEB), la superficie elegida para el depósito es el silicio monocristalino (100). Como es al mismo tiempo semiconductor y atómicamente plano, es una elección evidente para la observación de colágenos mediante esta modalidad. La preparación de la muestra se ha realizado depositando durante 6 horas sobre la superficie de silicio una gota de 10  $\mu\text{l}$  de colágeno de tipo I fibrilar o del polipéptido de SEC nº 1 concentrado a 200  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . La superficie es aclarada a continuación con agua destilada y después secada con nitrógeno. La superficie seca se metaliza mediante la pulverización de oro en un pulverizador Edwards S150 (intensidad de 25 mA en atmósfera de argón a 0,3 mPa durante 2 minutos). La observación tiene lugar con un microscopio electrónico de barrido JEOL 6500F, con una tensión de emisión de 20 keV y una corriente de emisión de 60  $\mu\text{A}$ .

45 Para la observación por microscopía de fuerza atómica (AFM), la superficie sobre la cual se observan el colágeno de tipo I y el polipéptido de SEC nº 1 es una superficie de oro policristalino (terrazas de Au(111) obtenidas por epitaxia sobre mica, PHASIS, ref. 20020022). El depósito ha tenido lugar *ex situ* a una concentración de 25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  bajo flujo con una tasa de cizallamiento de 300  $\text{s}^{-1}$  durante 30 minutos. Para permitir esta funcionalización de flujo, se presiona una célula microfluídica en PDMS sobre la superficie de oro y la solución de proteínas se lleva hasta esta superficie a través de una bomba peristáltica ISMATEC IPC-4. Las muestras se observaron con un microscopio AFM Nanoscope IV Multimode (Digital Instrument, Veeco Inc., Santa Barbara, CA), equipado con puntas FESPA Silicium (Bruker) con una constante de rigidez k de un  $\text{N.m}^{-1}$ , una frecuencia de resonancia  $f = 50 - 100 \text{ kHz}$  y una longitud de palanca  $L = 200 - 250 \mu\text{m}$ . La adquisición se realiza con el modo PeakForce QNM de Bruker, un modo de *tapping* dinámico que permite una adquisición poco ruidosa en estas muestras biológicas. La frecuencia de barrido se fija en 1 Hz. Las imágenes obtenidas han sido tratadas digitalmente con el fin de obtener una mejor resolución a través del programa WSxM, aplicando las funciones de aplanamiento (*flatten*) y de igualación (*equalize*).

60 Las observaciones presentadas en la figura 5 confirman los resultados obtenidos en DLS que indican una estructuración en forma de partículas para el polipéptido de SEC nº 1, en comparación con el colágeno de tipo I de estructura fibrilar. El tamaño de las partículas observadas es del orden de algunas decenas de nanómetros en las condiciones experimentales utilizadas para su observación.

**Ejemplo comparativo de medición de la expresión de superficie de la P-selectina plaquetaria tras la inyección en el ratón del polipéptido de SEC nº 1 en forma de partículas y del colágeno de tipo I (Horm) en forma fibrilar**

5 La preparación a base del polipéptido de SEC nº 1 en forma de partículas o de colágeno de tipo I fibrilar posee *ex vivo*, en sangre total, la capacidad de inducir la activación de las plaquetas, revelada por la expresión en superficie de las plaquetas de la P-selectina medida por citometría de flujo. Con el fin de validar que estas preparaciones son capaces de inducir esta misma activación una vez inyectadas en la circulación sanguínea, se realiza una extracción de sangre en un tubo citratado (BD Vacutainer, BD Biosciences) 15 minutos después de la administración en el  
10 ratón de 400 µg/kg de colágeno de tipo I y 2 mg/kg del polipéptido de SEC nº 1, o en el momento de las primeras manifestaciones de una embolia (asfixia). Se añade un volumen de 50 µl de sangre en unos tubos de vidrio y después se estabiliza con 250 µl de tampón fosfato. En unos tubos de citometría, se añade a continuación un volumen de 20 µl de la mezcla de reacción descrita anteriormente a 20 µl de una solución que contiene o bien un anticuerpo primario anti-CD62P acoplado a la FITC (FITC Mouse Anti-Human CD62P, *BD Biosciences*), o bien un anticuerpo isotipo de control acoplado a la FITC (FITC Mouse IgG1 κ isotype control, *BD Biosciences*) y se incuba  
15 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añade a continuación un volumen de 2 ml de tampón fosfato a cada tubo. La media de fluorescencia (MFI; Mean Fluorescence Intensity) se mide rápidamente a 520 nm con la ayuda de un citómetro de flujo (LSRII, BD Biosciences).

20 La figura 6 presenta la expresión plaquetaria de la P-selectina medida a partir de sangre extraída de unos ratones tras la inyección de colágeno de tipo I fibrilar y del polipéptido de SEC nº 1, para dos tamaños de partículas, en presencia o no de epinefrina. Se constata que el polipéptido de SEC nº 1 induce la activación de las plaquetas 15 minutos después de su administración en el ratón o en el momento de las primeras manifestaciones de una embolia (asfixia), cualquiera que sea el tamaño de las partículas. Esta activación no está modulada por la administración concomitante de epinefrina, contrariamente al colágeno de tipo I fibrilar, cuya activación aumenta en gran medida  
25 por esta última. Este resultado confirma que el polipéptido de SEC nº 1 es muy capaz de inducir la activación de las plaquetas una vez administrado en la circulación sanguínea como se ha demostrado *ex vivo*.

30 Medición del riesgo trombótico asociado a la inyección en la circulación sanguínea del polipéptido de SEC nº 1 en un modelo de embolia pulmonar inducida en el ratón

La presente descripción divulga la utilización de proteínas o péptidos derivados del colágeno para el tratamiento de las hemorragias mediante un mecanismo dependiente de la activación de las plaquetas. Con el fin de determinar si la activación *in vivo* de las plaquetas inducidas por la inyección de estas proteínas o péptidos derivados del colágeno en forma de partículas está asociada, independientemente de un contexto hemorrágico, a un riesgo de trombosis, se ha utilizado un modelo de embolia pulmonar inducida en el ratón por administración de colágeno y de epinefrina. El objetivo es demostrar que la activación de las plaquetas inducida por las proteínas o péptidos derivados del colágeno de la presente invención no son deletéreos por sí mismos induciendo la formación de trombos una vez inyectados. Con el fin de caracterizar correctamente el efecto potencialmente trombótico de esta  
35 administración, se ha utilizado como criterio observacional un trazador radioactivo visualizable por formación de imágenes isotópica (SPECT), además del utilizado habitualmente en este modelo y que consiste en medir el tiempo tras el cual el animal muere de embolia pulmonar. Tras la inyección intravenosa, los macroagregados de albúmina humana marcados con tecnecio-99m circulan en la sangre y permiten realizar unas cintigrafías de los pulmones o de algunas venas. Si existen focos trombóticos, la distribución pulmonar normal de este trazador estará alterada y la formación de imágenes isotópica revelará la disminución o la ausencia del trazador a nivel pulmonar.  
45

Se utilizan unos ratones SWISS macho de 25 a 30 g para realizar el modelo de embolia pulmonar. Los ratones son mantenidos bajo anestesia con isoflurano durante toda la duración del experimento. En un primer momento, se exponen las dos yugulares antes de inyectar, en una de ellas, la mezcla polipéptido de SEC nº 1 (1 mg/kg)/epinefrina (60 µg/kg) o colágeno de tipo I fibrilar (400 µg/kg)/epinefrina (60 µg/kg) en un volumen final de 150 µl. Si se produce una embolia pulmonar, los ratones se asfixian y mueren en los 10 minutos siguientes a la inyección. Se considera que los ratones que sobreviven más de 15 minutos no tienen embolia pulmonar. Para realizar una adquisición de imagen en SPECT, se inyectan los macroagregados de albúmina humana marcados con tecnecio-99m (30 µCi por ratón en 100 µl finales) en la segunda yugular justo antes de la parada cardíaca para  
50 los ratones que tienen una embolia pulmonar o al cabo de 15 minutos para los ratones que sobreviven. Se realizan un escáner y después una adquisición de 15 minutos en formación de imágenes isotópica.  
55

La tabla de la figura 7A presenta los resultados obtenidos, tras la administración en el ratón de colágeno de tipo I fibrilar y del polipéptido de SEC nº 1 en forma de partículas en presencia de epinefrina, del % de animales en los que se ha observado una embolia pulmonar y el tiempo medio para la instalación de esta embolia. Los resultados muestran que el 100% de los animales han muerto al cabo de 5 minutos 50 de media tras la inyección del colágeno de tipo I fibrilar. Por el contrario, ningún animal ha desarrollado embolia pulmonar después de la inyección del polipéptido de SEC nº 1 particulado, utilizado sin embargo 2,5 veces más concentrado (1 mg/kg frente a 400 µg/kg). La figura 7B presenta las imágenes obtenidas tras la inyección de macroagregados de albúmina radiomarcados que confirman la presencia de una embolia pulmonar masiva en los ratones inyectados con colágeno de tipo I fibrilar y la distribución pulmonar normal del trazador en los ratones inyectados con el polipéptido de SEC nº 1,  
65

signo de la ausencia de trombosis inducida.

Este resultado confirma que para dos proteínas de tipo colágeno que poseen la misma actividad activadora plaquetaria una vez inyectadas en la circulación sanguínea, se puede utilizar solo aquella en forma de partículas sin riesgo de inducir una trombosis.

#### Medición del efecto de la inyección del polipéptido de SEC nº 1 en un modelo de sangrado inducido en la cola en el ratón

Los resultados presentados anteriormente confirman que el polipéptido de SEC nº 1 en forma de partículas es bastante capaz de inducir la activación de las plaquetas una vez administrado en la circulación sanguínea de ratones y que esta activación no tiene ningún efecto trombogénico, contrariamente al colágeno de tipo I fibrilar. Con el fin de validar que la inyección en la circulación sanguínea de una proteína o un péptido derivado del colágeno de la presente invención permite inducir la detención de sangrados mediante un mecanismo dependiente de la activación de las plaquetas, se ha evaluado el efecto sobre la pérdida sanguínea de la administración del polipéptido de SEC nº 1 en un modelo de sangrado inducido en la cola en el ratón.

Se utilizan unos ratones SWISS macho de 25 a 30 g para realizar el modelo de sangrado en la cola. Los ratones son mantenidos bajo anestesia con isoflurano durante toda la duración del experimento. En un primer momento, se expone una de las dos yugulares antes de inyectar las diferentes moléculas diluidas en un tampón fosfato. Se realiza una sección de la cola a 1,5 cm de la punta de la cola con el fin de seccionar las 3 arterias y la vena. La sección se realiza 10 minutos después de la inyección del tampón fosfato (control vehículo) o del polipéptido de SEC nº 1 (1,6 mg/kg) y 20 minutos después de la inyección de heparina (anticoagulante - control positivo de sangrado - 60 U/kg). Después del corte, la cola se sumerge en 50 ml de agua fisiológica a 37°C con el fin de recoger la sangre durante 16 minutos sin dañar los glóbulos rojos. Se dejan decantar los tubos durante 1 hora a temperatura ambiente antes de ser centrifugados 15 minutos a 250 g. Se elimina el sobrenadante y el residuo de glóbulos rojos se recoge en 3 ml de tampón de lisis específico (8.3 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 1 g/l KHCO<sub>3</sub> y 37 mg/l EDTA). La densidad óptica de 200 µl de lisado se lee a 550 nm en un lector de placas.

Se ha realizado una curva patrón con el fin de determinar el volumen de sangre perdido. Para ello, unos ratones SWISS macho de 25 a 30 g han sido desangrados a nivel de la aorta abdominal. La sangre ha sido recogida en unos tubos citratados con el fin de que esta coagule. Se realizó un intervalo de volumen sanguíneo en unos tubos que contienen 50 ml de agua fisiológica. A continuación, se ha realizado el tratamiento de la sangre como se ha descrito anteriormente (véase la figura 8A).

Los resultados presentados en la figura 8B confirman que el polipéptido de SEC nº 1, en forma de partículas, es bastante capaz de inducir la detención de los sangrados en este modelo, ya sea en forma nativa o concentrada. El volumen medio perdido antes de la detención de una hemorragia en presencia del polipéptido de SEC nº 1 es así de 11.6 µl +/- 2.4 µl (no concentrado) y 12.6 µl +/- 6.1 µl (concentrado 10 veces) frente a 42 µl +/- 18.4 µl para los ratones no tratados. La disminución de la pérdida sanguínea es por lo tanto de aproximadamente el 70% con respecto a los ratones controles. Por el contrario, la pérdida de sangre en presencia de heparina aumenta en gran medida tal como se esperaba con un volumen medio de sangre perdida de 257.9 µl +/- 87.5. El aumento de la pérdida sanguínea es por lo tanto del 514% con respecto a los ratones control, validando así el modelo.

#### Referencias

- Spahn D *et al.* Critical Care 2013, 17:R76  
 Fries D. Transfusion 2013; 53:91S-95S  
 Lashof-Sullivan M *et al.* Nanoscale 2013, 5, 10719-10728  
 Modery-Pawlowski C *et al.* Biomaterials 2013; 516-541  
 Clementson K. Thrombosis Research 2012 129 220-224  
 Pires M et Chmielewski J. J. Am. Chem. Soc. 2009 131, 2706-2712  
 Przybyla D *et al.* J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 3418-3422  
 Kojima C *et al.* J. Am. Chem. Soc. 2009 131, 30652-6053  
 Slatter D *et al.* Peptides 2012 36, 86-93  
 Kar *et al.* Journal of Biological Chemistry 2006 vol 281, nº 44 33283-33290  
 Mazepa M *et al.* ATVB 2013, 33(8) :1747-52  
 Bonhomme F *et al.* Eur J Intern Med. 2014, 25(3):213-20  
 Beynon C *et al.* Crit Care. 2012 Jul 26;16(4):228  
 Jenkins DH *et al.* Shock. 2014 Mayo; 41 Supl 1:3-12  
 Murdock AD *et al.* Shock. 2014 Mayo; 41 Supl 1:62-9  
 An B *et al.* Frontiers in chemistry. 2014 Junio; 2 artículo 40

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> NVH Médicinal  
 David VANDROUX  
 5 CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE DIJON

<120> PREPARACIONES INYECTABLES A BASE DE COLÁGENOS CAPACES DE CONTROLAR LOS  
 10 SANGRADOS Y/O DE SUSTITUIR A UNAS PLAQUETAS EN EL CASO DE SÍNDROMES  
 HEMORRÁGICOS

<130> D33216

<150> FR 1362418  
 <151> 2013-12-11

15 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1  
 <211> 184  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 1

Met Met Ser Phe Val Gln Lys Gly Ser Trp Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
 1 5 10 15

His Pro Thr Ile Ile Leu Ala Gln Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Glu  
 20 25 30

Arg Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Ala Ala Gly Glu Pro  
 35 40 45

Gly Arg Asp Gly Val Pro Gly Gly Pro Gly Met Arg Gly Met Pro Gly  
 50 55 60

Ser Pro Gly Gly Pro Gly Ser Asp Gly Lys Pro Gly Pro Pro Gly Ser  
 65 70 75 80

Gln Gly Glu Ser Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Glu Asn Gly Phe Pro  
 85 90 95

Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Arg Gly  
 100 105 110

Gln Pro Gly Val Met Gly Phe Pro Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala  
 115 120 125

30

ES 2 829 503 T3

Pro Gly Pro Arg Gly Gln Pro Gly Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Pro  
130 135 140

Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
145 150 155 160

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Asp  
165 170 175

Lys Gly Pro Pro Gly Pro Gly Ser  
180

**REIVINDICACIONES**

1. Preparación inyectable para su utilización en el tratamiento de las hemorragias que comprende:

- 5 - unas partículas obtenidas por autoensamblaje de proteínas o péptidos, presentando dichas partículas un diámetro medio que va de 0.05  $\mu\text{m}$  a 6  $\mu\text{m}$  y comprendiendo dichas partículas unas proteínas o péptidos que inducen la adhesión y la activación de las plaquetas; y
- por lo menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable,

10 en la que las proteínas se seleccionan de entre los colágenos o las proteínas recombinantes cuya secuencia incluye por lo menos un polipéptido seleccionado de entre:

- 15 - el polipéptido de la secuencia ID nº 1;
- el polipéptido que presenta la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1;
- un polipéptido que presenta por lo menos el 70% de identidad en toda su longitud con el polipéptido de la secuencia ID nº 1 o con el polipéptido que presenta la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1;
- 20 - un polipéptido que presenta unas secuencias formadas por la repetición de tripletes GXY, en los que G designa la glicina y X e Y cualesquiera aminoácidos repetidos n veces, siendo n superior o igual a 2,

25 o en la que los péptidos se seleccionan de entre:

- el polipéptido de la secuencia ID nº 1;
- el polipéptido que presenta la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1;
- 30 - un polipéptido que presenta por lo menos el 70% de identidad en toda su longitud con el polipéptido de la secuencia ID nº 1 o con el polipéptido que presenta la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1;
- 35 - un polipéptido que presenta unas secuencias formadas por la repetición de tripletes GXY, en los que G designa la glicina y X e Y cualesquiera aminoácidos repetidos n veces, siendo n superior o igual a 2

40 2. Preparación inyectable para su utilización según la reivindicación 1, en la que las partículas consisten en unos péptidos o proteínas seleccionados de entre los colágenos o las proteínas recombinantes.

3. Preparación inyectable para su utilización según la reivindicación 2, en la que las partículas se obtienen por coacervación, agregación o autoensamblaje.

45 4. Preparación inyectable para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, en la que el colágeno o las proteínas están pegilados o pasilados.

5. Partículas obtenidas por autoensamblaje de proteínas o péptidos, presentando dichas partículas un diámetro medio que va de 0.05  $\mu\text{m}$  a 6  $\mu\text{m}$ ;

50 comprendiendo dichas partículas unas proteínas o péptidos que inducen la adhesión y la activación de las plaquetas; y

caracterizadas por que las proteínas se seleccionan de entre los colágenos o las proteínas recombinantes cuya secuencia incluye por lo menos un polipéptido seleccionado de entre:

- 55 - el polipéptido de la secuencia ID nº 1;
- el polipéptido que presenta la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1;
- 60 - un polipéptido que presenta por lo menos el 70% de identidad en toda su longitud con el polipéptido de la secuencia ID nº 1 o con el polipéptido que tiene la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1;
- 65 - un polipéptido que presenta unas secuencias formadas por la repetición de tripletes GXY, en los que G designa la glicina y X e Y cualesquiera aminoácidos, repetidos n veces, siendo n superior o igual a 2,

o caracterizadas por que los péptidos se seleccionan de entre:

- el polipéptido de la secuencia ID nº 1;
- 5 - el polipéptido que presenta la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1;
- un polipéptido que presenta por lo menos el 70% de identidad en toda su longitud con el polipéptido de la secuencia ID nº 1 o con el polipéptido que presenta la secuencia desde la posición 25 hasta la 184 de la secuencia ID nº 1;
- 10 - un polipéptido que presenta unas secuencias formadas por la repetición de tripletes GXY, en los que G designa la glicina y X e Y cualesquiera aminoácidos, repetidos n veces, siendo n superior o igual a 2.

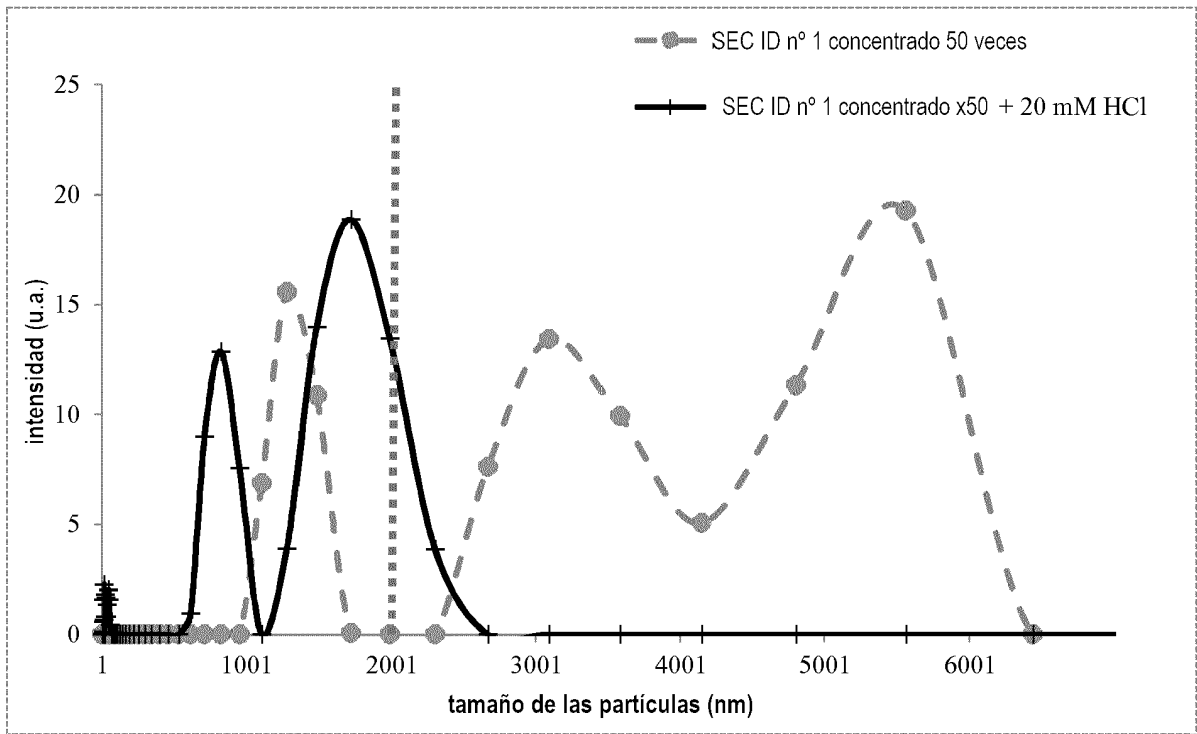


Fig.1

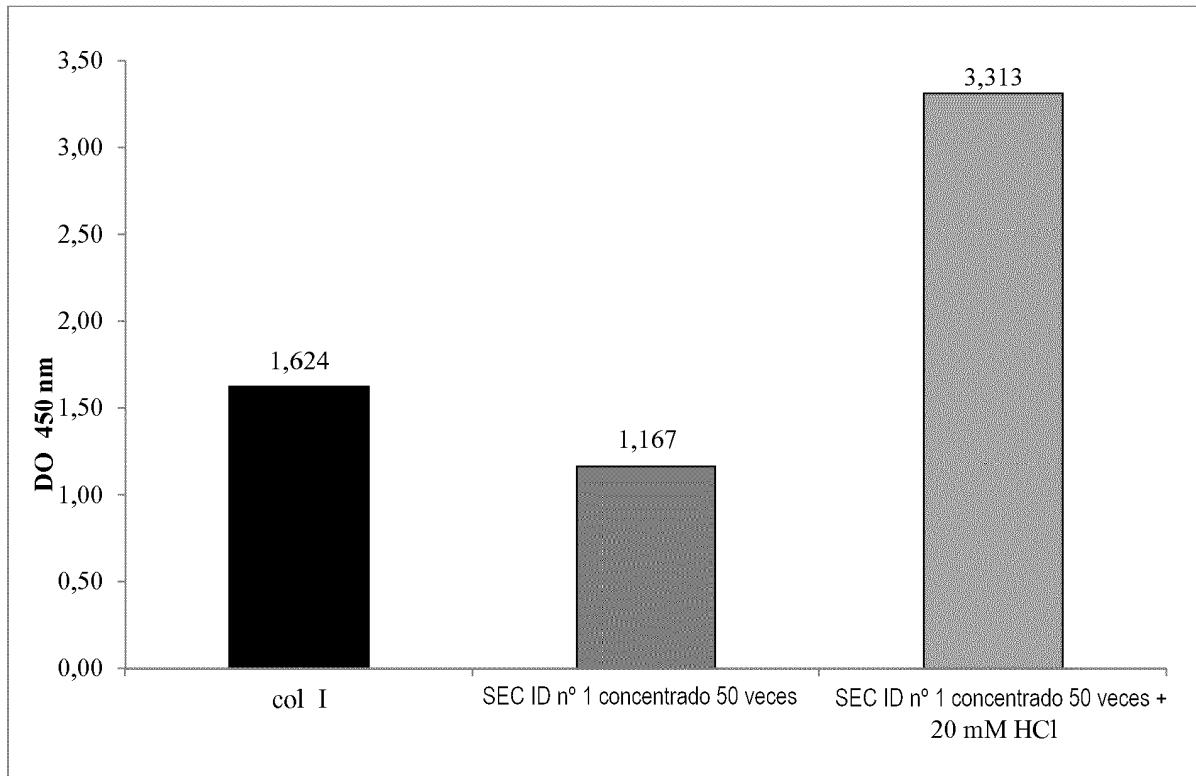
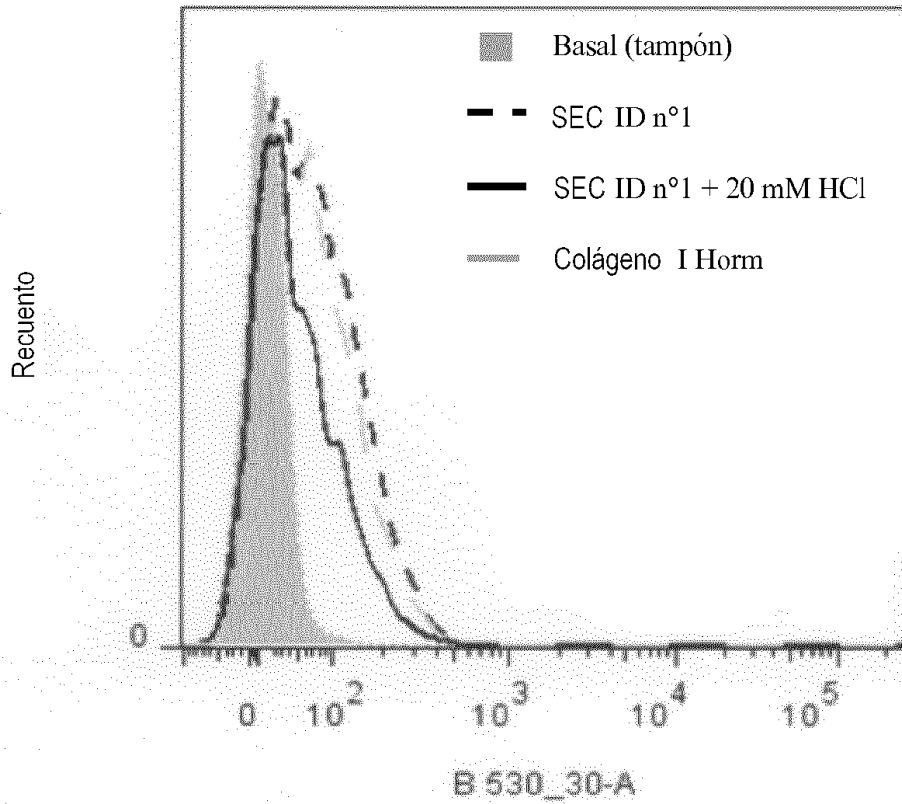


Fig.2

A



B

	basal (Tampón)	4,4
MFI (Intensidad media de fluorescencia)	TRAP a 50 $\mu$ M	128
	Ionóforo de calcio a 10 $\mu$ M	136
	SEC ID n°1 a 25 $\mu$ g/mL	70,4
	SEC ID n°1 + 20 mM HCl a 25 $\mu$ g/mL	47,3
	Colágeno I Horm a 25 $\mu$ g/mL	78,1

Fig.3

- Vía Nº 1: SEC ID nº 1 concentrado x50 a 30 µg/ml: TAMAHÑO>2 µm
- Vía Nº 2: SEC ID nº 1 concentrado x50 + 20 mM HCl a 30 µg/ml: TAMAHÑO<2 µm
- Vía Nº 3: HCl 20 mM y después colágeno de tipo I Horm a 1 µg/ml a 6 min
- Vía Nº 4: colágeno de tipo I Horm a 1 µg/ml

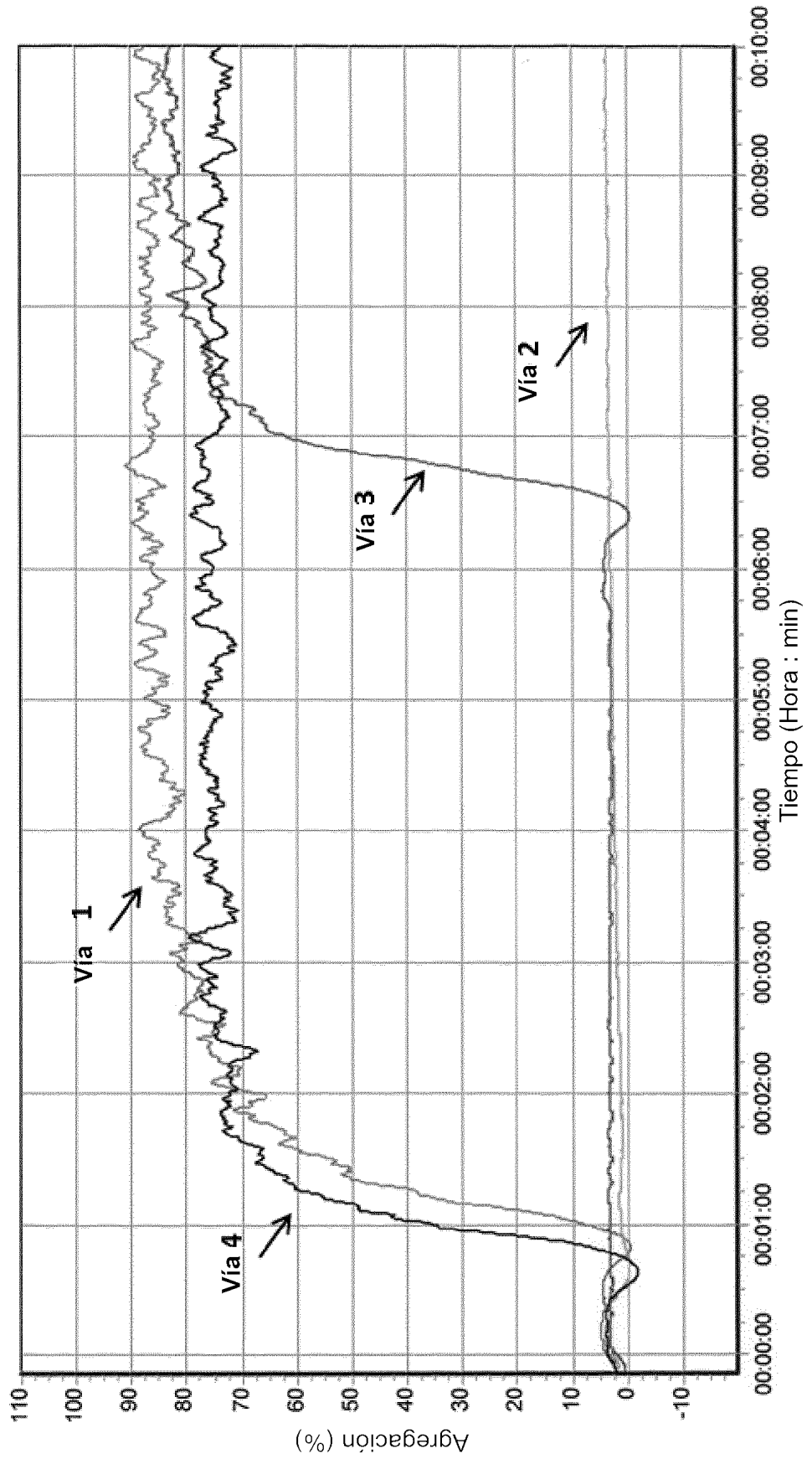


Fig. 4

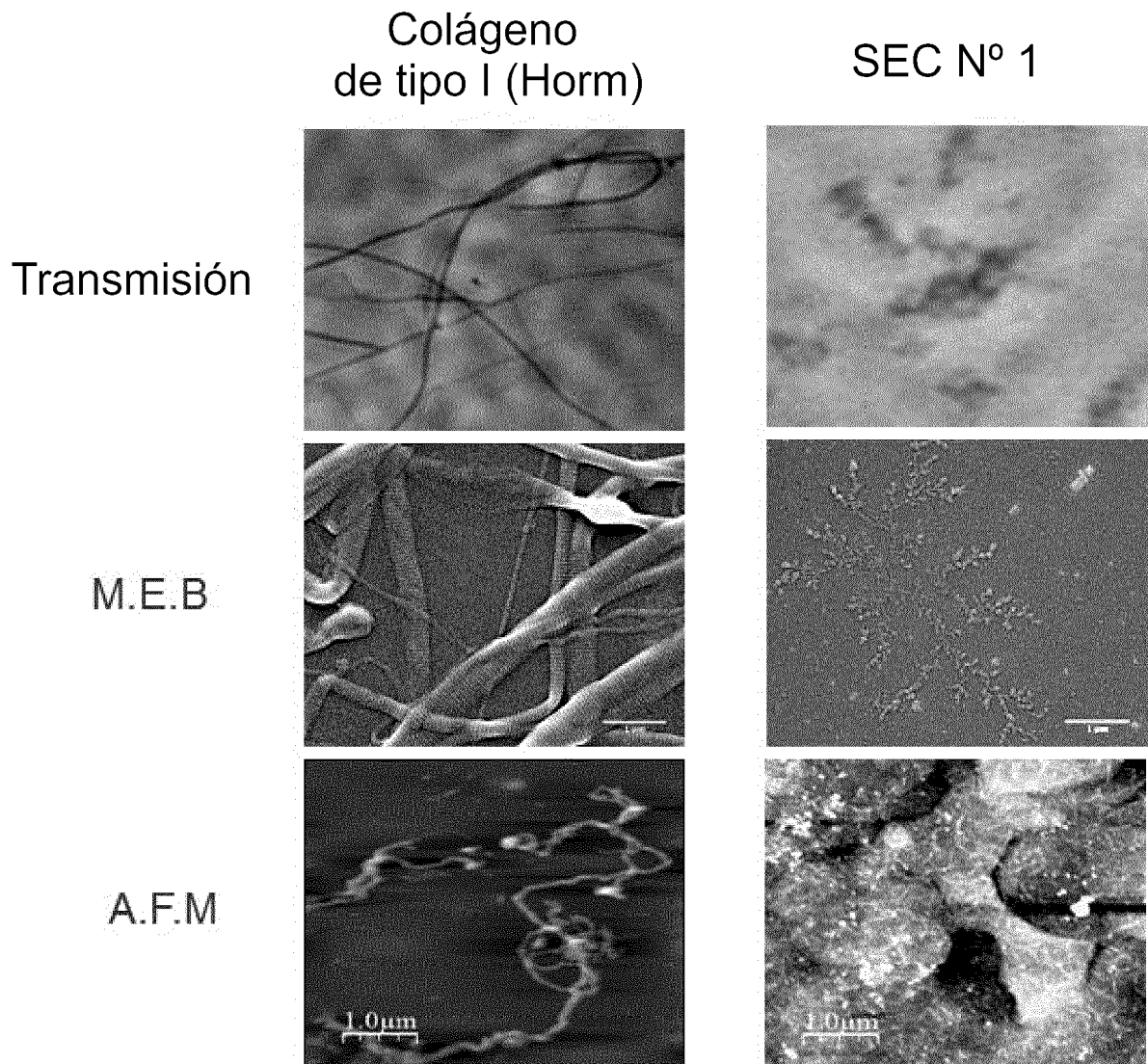


Fig.5

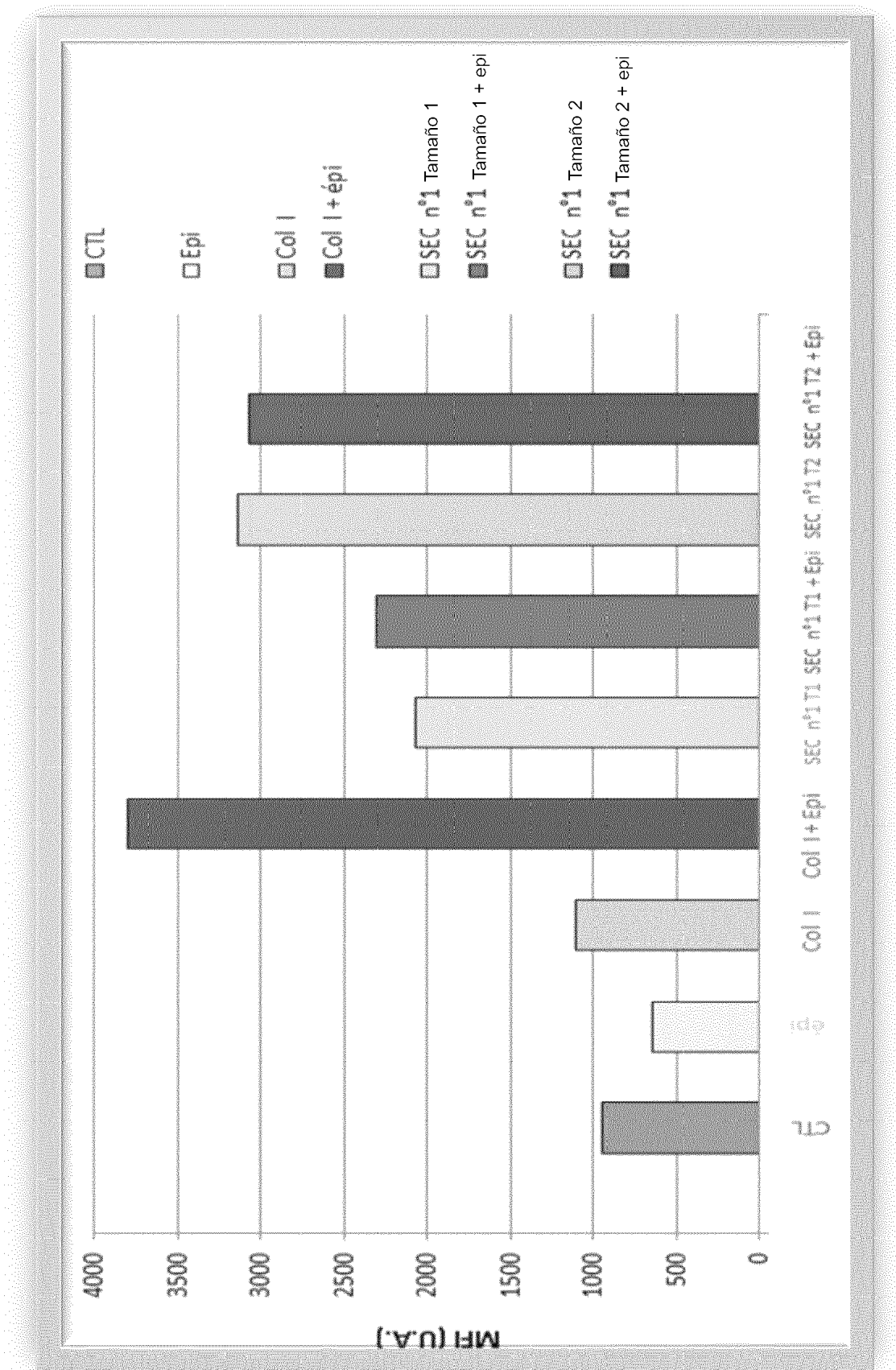


Fig.6

A.

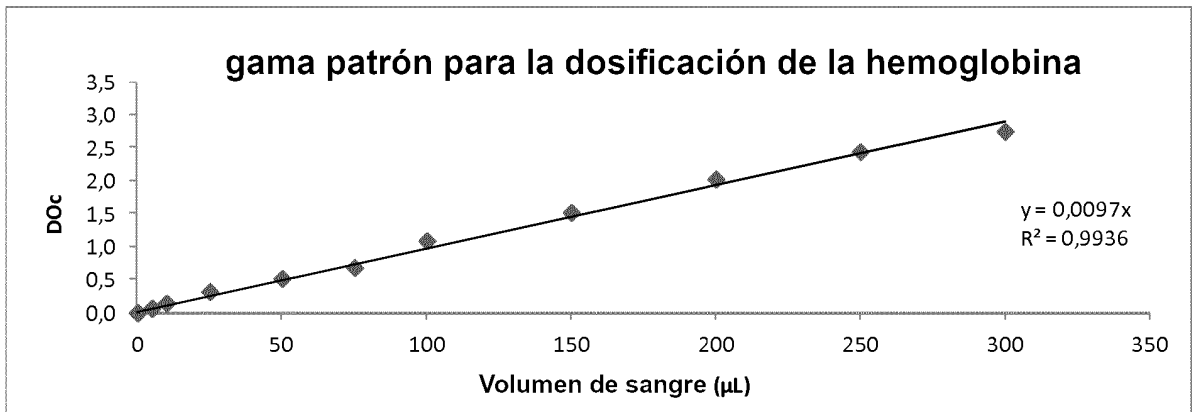
Condiciones	Cantidad de colágeno inyectada	% EP	Tiempo med
CONTROL n=5		0%	> 15min
COL de tipo I n=5	400 µg/kg	100%	5 min 50
SEC N°1 n=4	1 mg/kg	0%	> 15min

B.

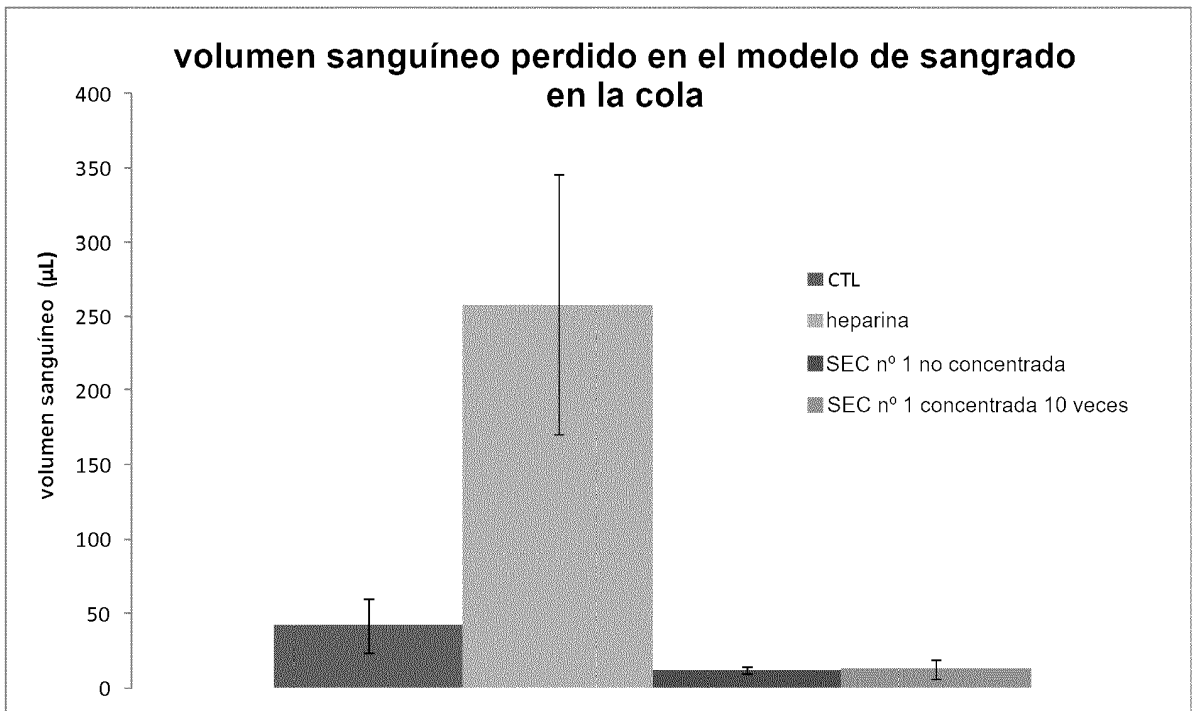


A: Control  
 B: SEC N°1 a 1 mg/kg  
 C: Col de tipo I a 400 µg/kg

Fig.7



8A



8B

Fig.8