

Nuovi farmaci antitrombotici in patologia cardiovascolare

Paolo Golino, Giovanni Cimmino, Irma Porchetta, Maria Spadera, Marianna Volpe, Raffaele Calabrò

Cattedra di Cardiologia, Dipartimento di Scienze Cardio-Toraciche e Respiratorie, Seconda Università degli Studi, Napoli

Key words:

Acute coronary syndromes;
Anticoagulants;
Antithrombotic drugs;
Thrombosis.

During the past decades, a great bulk of studies have been undertaken to investigate the pathophysiologic mechanisms responsible for thrombus formation. As a consequence, different therapeutic strategies interfering at different levels of the coagulation process have been developed. Many of these compounds did not achieve full development, but others are presently available for the clinician. The present review paper will focus on these new therapeutic strategies developed in the last 10 years.

(GIC - G Ital Cardiol 2006; 7 (2): 109-118)

© 2006 CEPI Srl

Ricevuto il 3 gennaio 2005; nuova stesura il 14 novembre 2005; accettato il 22 novembre 2005.

Per la corrispondenza:

Prof. Paolo Golino

Divisione di Cardiologia
A.O. San Sebastiano
Via Tescione
81100 Caserta
E-mail:
paolo.golino@unina2.it

Introduzione

Le malattie cardiovascolari rappresentano la causa più comune di mortalità e di morbidità nel mondo occidentale e l'aterotrombosi occupa un ruolo centrale in tale ambito. I trombi di origine venosa, che si formano preferenzialmente nel distretto periferico degli arti inferiori, sono costituiti principalmente da fibrina e globuli rossi, mentre i trombi di origine arteriosa sono costituiti soprattutto da aggregati piastrinici inglobati in una fine rete di fibrina. La conoscenza approfondita dei meccanismi fisiopatologici che portano alla formazione del trombo ha permesso in epoca recente lo sviluppo di differenti strategie terapeutiche che interferiscono con tappe diverse del processo coagulativo, dell'adesione, attivazione ed aggregazione piastrinica. Lo scopo di questa rassegna è di fare il punto sulle nuove strategie terapeutiche sviluppate negli ultimi anni in termini di antiaggregazione ed anti-coagulazione. La Tabella 1 riassume i farmaci discussi nel presente articolo, mentre la Figura 1 mostra la cascata della coagulazione con i possibili punti di attacco da parte dei vari farmaci antitrombotici.

Inibitori della tappa iniziale della coagulazione

La tromboplastina tissutale o fattore tissutale (TF) è l'inziatore chiave della cascata coagulativa. Il TF è una proteina transmembrana espressa e localizzata sulla su-

perficie di cellule normalmente non in contatto con il sangue circolante. Dopo un danno della parte vascolare, il TF viene esposto al flusso sanguigno e rapidamente forma un complesso 1:1 con il fattore VII (FVII) o con il FVII attivato (FVIIa) della coagulazione. Una volta legato al TF, il FVII viene rapidamente convertito a FVIIa attraverso un'auto-proteolisi limitata, dando così inizio alla cascata coagulativa.

Poiché il TF è una proteina integrale di membrana, il complesso TF-FVIIa è generalmente legato alla superficie di membrana. Da questo derivano due importanti conseguenze: primo, la cascata coagulativa viene attivata solo dove è necessario, e cioè nel sito del danno vascolare; secondo, il legame del TF al FVIIa attiva numerosi segnali intracellulari che culminano nella proliferazione cellulare e in nuovi pattern di espressione genica, inclusi i geni dell'infiammazione¹. Numerosi studi negli ultimi anni sono stati indirizzati alla ricerca di nuove molecole in grado di interferire con il complesso TF-FVIIa. Questo tipo di interazione potrebbe offrire notevoli vantaggi rispetto ad altri interventi, come l'eparina ed i suoi derivati, che invece agiscono su tappe poste più a valle nel processo coagulativo. In primo luogo, infatti, un vantaggio potenziale degli inibitori del complesso TF-FVIIa è quello di bloccare l'innescò della cascata coagulativa, con conseguente inibizione della formazione di trombina ed interruzione dei meccanismi di auto-amplificazione della cascata stessa. Inoltre, gli inibitori del complesso TF-FVIIa blocche-

Tabella 1. Caratteristiche dei nuovi farmaci antitrombotici.

Farmaco	Struttura	Bersaglio	Vantaggi/svantaggi	Stadio di sviluppo
r-TFPI	Proteina ricombinante	TF/FVIIa	Inibizione precoce della cascata/sanguinamenti	Preclinico (fase II)
r-NAPc2	Proteina ricombinante	TF/FVIIa	Inibizione precoce della cascata/lunga emivita	Preclinico (fase III)
FVIIai	Proteina ricombinante	TF	Inibizione precoce della cascata/sanguinamenti	Preclinico (fase II)
TF-ab (AP-1)	Glicoproteina	TF	Inibizione precoce della cascata/immunogeno	Preclinico (fase I)
Fondaparinux	Pentasaccaride	FXa	Potente inibizione del FXa/sanguinamenti	Preclinico (fase III)
Idraparinux	Pentasaccaride	FXa	Potente inibizione del FXa/lunga emivita	Preclinico (fase III)
Trombomodulina	Proteina ricombinante	Proteina C	Inibitore fisiologico/lunga emivita	Preclinico (fase I)
Proteina C attivata	Proteina ricombinante	FVa, FVIIIa	Inibitore fisiologico/sanguinamenti	Disponibile (sepsi)
Irudina	Polipeptide	Trombina	Inibitore diretto/sanguinamenti	Preclinico (fase III)
Bivalirudina	Polipeptide	Trombina	Inibitore diretto/sanguinamenti	Disponibile (sindromi coronariche acute)
Ximelagatran	Peptide sintetico	Trombina	Inibitore diretto attivo per os/epatotossicità	Preclinico (fase III)

FVa = fattore V attivato; FVIIa = fattore VII attivato; FVIIai = fattore VIIa inattivato; FVIIIa = fattore VIII attivato; FXa = fattore X attivato; r-TFPI = recombinant tissue factor pathway inhibitor; TF = fattore tessutale.

rebbero, oltre alla cascata della coagulazione, anche il “signaling” intracellulare TF-mediato, quale l’inflamazione e la proliferazione cellulare; infine, questi inibitori agirebbero soltanto dove necessario, cioè nel punto in cui, in seguito al danno vascolare, il TF viene esposto.

Tissue factor pathway inhibitor

Il “tissue factor pathway inhibitor” (TFPI) rappresenta l’unico inibitore fisiologico della via estrinseca della coagulazione finora conosciuto. È costituito da tre domini tipo Kunitz con azione inibente su alcune proteasi della coagulazione: il primo dominio interagisce con il sito attivo del FVIIa nel complesso di TF-FVIIa², mentre il secondo dominio interagisce con il sito attivo del fattore X attivato (FXa). Una volta formato, il complesso TFPI-FXa, si lega con alta affinità al complesso TF-FVIIa; ciò provoca la formazione di un complesso quaternario, TF-FVIIa-TFPI-FXa, privo di attività enzimatica^{2,3}. Studi condotti in modelli animali^{4,5} (Figura 2), come pure in pazienti con sindromi coronariche acute⁶ (Figura 3) hanno dimostrato l’importanza del TFPI nel modulare l’attività procoagulante del complesso TF-FVIIa durante il processo trombotico.

Sulla base di queste osservazioni, il TFPI umano ricombinante espresso in batteri si è dimostrato efficace nel prevenire la formazione di trombi in una serie di modelli sperimentali. Per esempio, Haskel et al.⁷ hanno dimostrato per la prima volta che l’utilizzo di dosi farmacologiche di TFPI ricombinante umano previene la riocclusione dopo sospensione di attivatore tessutale del plasminogeno in un modello canino di trombolisi coronarica. Altri studi hanno anche indicato che il TFPI ricombinante era efficace nell’inibire la trombosi intravascolare, anche se tale effetto si otteneva a dosi molto più alte rispetto a quelle fisiologicamente presenti nel plasma^{8,9}. Non sorprende, quindi, data anche l’azione inibente del TFPI sul FXa, che Oltrona et al.⁹ abbiano evidenziato che la somministrazione sistemica di TFPI ricombinante comporti un marcato allungamento del tempo di protrombina, suggerendo che la somministrazione di TFPI a dosi antitrombotiche è associata ad un aumentato rischio di sanguinamento. St. Pierre et al.¹⁰ hanno poi dimostrato che la somministrazione di TFPI ricombinante dopo angioplastica in arterie carotidi di maiale riduce l’espressione del TF, l’attività del FXa e la formazione del trombo nel sito di danno della parete vascolare, comportando una diminuzione dell’iperplasia neointimale provocata dal danno vascolare. Recentemente è stato completato uno studio clinico di fase II in pazienti con sepsi in cui il TFPI ricombinante si è dimostrato capace di ridurre la mortalità in questa classe di pazienti¹¹.

Il rapido progresso della terapia genica ha permesso di trasferire geni diversi a cellule di una grande varietà di organi e tessuti, comprese quelle della parete vascolare. Non sorprende, pertanto, che negli ultimi anni diversi studi si siano focalizzati sulla trasfezione del ge-

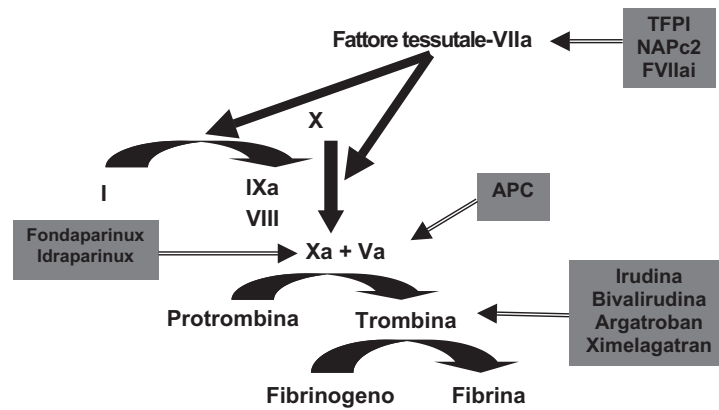


Figura 1. Attivazione della via estrinseca della coagulazione per interazione della tromboplastina tissutale e del suo ligando specifico, il fattore VIIa. Sono riportati tutti i punti in cui il processo emocoagulativo viene contrastato dall'azione di farmaci antitrombotici. APC = proteina C attivata; FVIIai = fattore VIIa inattivato; TFPI = tissue factor pathway inhibitor.

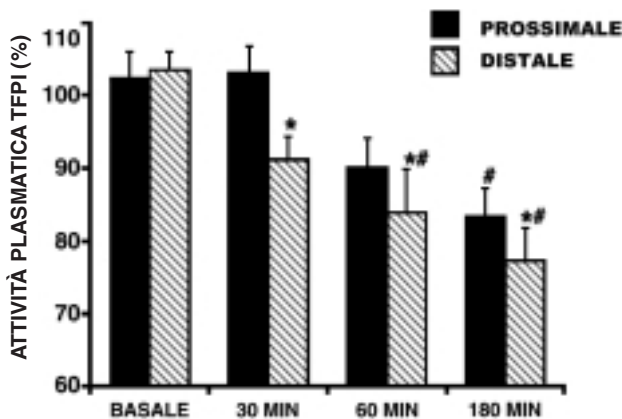


Figura 2. Attività plasmatica del tissue factor pathway inhibitor (TFPI) misurata a monte e a valle del sito di trombosi durante la formazione del trombo stesso in un modello sperimentale di trombosi ricorrente. L'attività del TFPI risulta significativamente più bassa in campioni ottenuti dal tratto distale dell'arteria sede della formazione del trombo, rispetto ai campioni ottenuti dal tratto prossimale a 30, 60 e 180 min dall'inizio della trombosi ricorrente. Tale attività diminuisce progressivamente con il tempo sia in campioni prossimali che distali, indicando un consumo di TFPI nel punto di formazione del trombo. Da Ragni et al.⁴, modificata.

ne del TFPI nella parete vascolare. Il vantaggio principale dell'aumento delle concentrazioni locali di TFPI per effetto del suo trasferimento genico nella parete arteriosa è quello di raggiungere livelli terapeutici di tale proteina soltanto dove sono necessari, cioè nella sede del vaso arterioso danneggiato dove il TF è esposto, senza concomitanti effetti sistemici potenzialmente pericolosi. Tre studi, di cui uno del nostro gruppo, hanno dimostrato l'efficacia antitrombotica della trasfezione della parete arteriosa con il gene codificante per il TFPI in differenti modelli di trombosi intravascolare^{5,12,13}, in assenza di effetti sistemici sui parametri coagulativi. Questi dati suggeriscono che la trasfezione della parete arteriosa con il gene per il TFPI potrebbe rappresentare un approccio alternativo per il trattamento dei fenomeni trombotici; la validità di questo metodo, però, necessita di ulteriori conferme per poter essere applicabile alla pratica clinica.

Altri inibitori del complesso fattore tissutale-fattore VII attivato

Data l'importanza del complesso TF-FVIIa nell'attivazione della cascata coagulativa sia in condizioni patologiche che non, come pure gli effetti antitrombotici del TFPI, sono stati progettati e sviluppati un certo numero di inibitori "artificiali" di questo complesso. Il primo ad essere descritto è stato AP-1, un anticorpo monoclonale diretto contro il TF di coniglio che si è rilevato capace di bloccare l'attività procoagulante del TF sia *in vitro* che *in vivo*, anche a basse concentrazioni¹⁴. Infatti, la somministrazione di AP-1 a conigli con trombosi ricorrente dell'arteria carotide portava ad un'inibizione completa dei fenomeni di trombosi senza un prolungamento concomitante dei parametri emostatici sistemici o un'alterazione significativa dell'aggregazione piastrinica¹³. Questo stesso anticorpo si è dimostrato capace di accelerare le proprietà trombolitiche dell'attivatore tissutale del plasminogeno ed impedire la riuclusione dopo sua sospensione in un modello animale di trombosi arteriosa e trombolisi carotide¹⁵.

Fra gli inibitori del complesso TF-FVIIa vi è XK1, una proteina chimerica costituita dalla catena leggera del FXa legata al primo dominio di Kunitz del TFPI¹⁶. Altri inibitori tipo Kunitz sono stati progettati per aumentarne l'affinità verso il complesso TF-FVIIa^{17,18} o verso il solo FVIIa utilizzando una forma solubile del TF legata ad un dominio Kunitz¹⁹. NAPc2 è una proteina che inibisce il complesso TF-FVIIa isolata e clonata da alcune specie di vermi ematofagi²⁰. Questa molecola si lega al FXa ed ha un meccanismo inibitorio simile a quello del TFPI. L'effetto antitrombotico di NAPc2 è stato recentemente dimostrato in uno studio di prevenzione del tromboembolismo venoso in pazienti operati di protesi totale del ginocchio²¹. Un altro inibitore del complesso TF-FVIIa è rappresentato dal FVIIa ricombinante umano in cui il sito attivo viene bloccato da un inibitore in grado di legarsi con legame covalente, quale il clorometilchetone (conosciuto come FVIIai o ASIS). Tale sostanza è stata recentemente prodotta ed

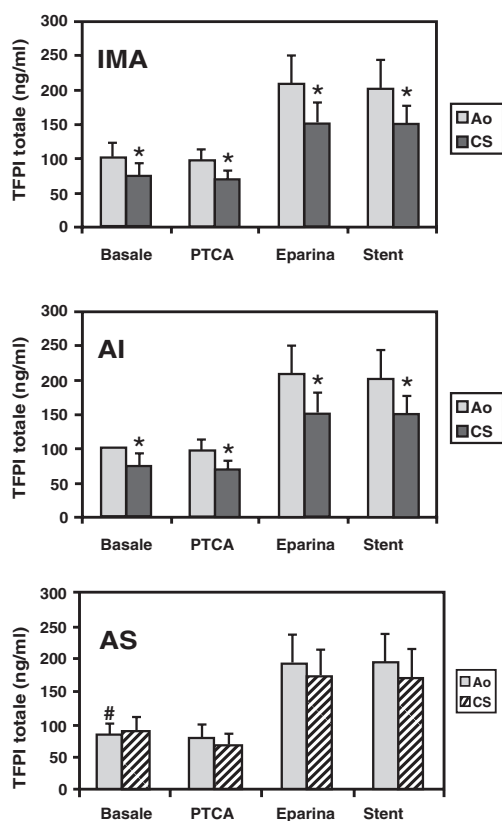


Figura 3. Livelli plasmatici totali di tissue factor pathway inhibitor (TFPI) (forma libera e legata) attraverso il circolo coronarico in pazienti con infarto miocardico (IMA) sottoposti ad angioplastica coronarica (PTCA) primaria (pannello superiore), con angina instabile (AI) (pannello centrale) sottoposti a PTCA urgente e con angina stabile da sforzo (AS) sottoposti a PTCA d'elezione (pannello inferiore). I livelli di TFPI nel seno coronarico (CS) risultavano significativamente più bassi di quelli in aorta (Ao) in pazienti con IMA e AI ma non in pazienti con AS, ad indicare un'attivazione della cascata della coagulazione fattore tissutale-dipendente ed il contemporaneo coinvolgimento del TFPI nell'arteria coronaria sede della lesione culprit anche dopo somministrazione di eparina. Queste differenze persistono dopo impianto di stent. Da Golino et al.⁶, modificata.

usata con successo per contrastare l'azione procoagulante del complesso TF-FVIIa. Il razionale dell'utilizzo del FVIIai risiede nel fatto che esso presenta la stessa

affinità del FVIIa per il TF, ma avendo il sito attivo permanente bloccato non può attivare i substrati naturali del complesso TF-FVIIa, il fattore X ed il fattore IX, inibendo così la cascata coagulativa. In differenti modelli animali, il FVIIai ha evidenziato importanti effetti antitrombotici (Figura 4) impedendo anche la restenosi nel punto del danno vascolare, senza effetti sistemici potenzialmente pericolosi²²⁻²⁵. Dati recenti emersi da ricerche effettuate dal nostro gruppo hanno indicato che il FVIIai possiede effetti antitrombotici molto prolungati, cioè almeno 24 h, a seguito di una singola somministrazione endovenosa²⁶. Studi di immunostochimica hanno mostrato che il FVIIai ha un'affinità molto alta per il TF. Infatti, in sezioni istologiche arteriose ottenute 24 h dopo la somministrazione endovenosa di FVIIai, è possibile evidenziare ancora la presenza di FVIIai, nonostante le sue concentrazioni plasmatiche siano indosabili, a dimostrazione del fatto che il FVIIai era stato completamente eliminato dal circolo. Considerate nel loro complesso, queste caratteristiche rendono il FVIIai un interessante presidio antitrombotico per la pratica clinica²⁷.

Inibizione dell'espressione del fattore tissutale

Un metodo innovativo per inibire l'espressione di una determinata proteina (in questo caso il TF), è la distruzione del suo mRNA mediante l'uso di un RNA catalitico, definito ribozima²⁸. I ribozimi sono molecole di RNA che possiedono proprietà enzimatiche^{29,30}. Una volta legatosi alla catena complementare di RNA, si innescano l'attività catalitica che porta alla degradazione dell'acido nucleico legato al ribozima. Contrariamente alle molecole farmacologiche tradizionali, i ribozimi contrastano il flusso di informazione genetica che dal nucleo va verso la sintesi proteica, piuttosto che interferire con la funzione proteica³¹. Poiché è noto che il danno vascolare comporta esposizione del TF preformato ma anche l'induzione di sintesi *ex novo* nelle cellule che compongono la parete vascolare³², l'utilizzo dei ribozimi permette di ottenere un'inibizione com-

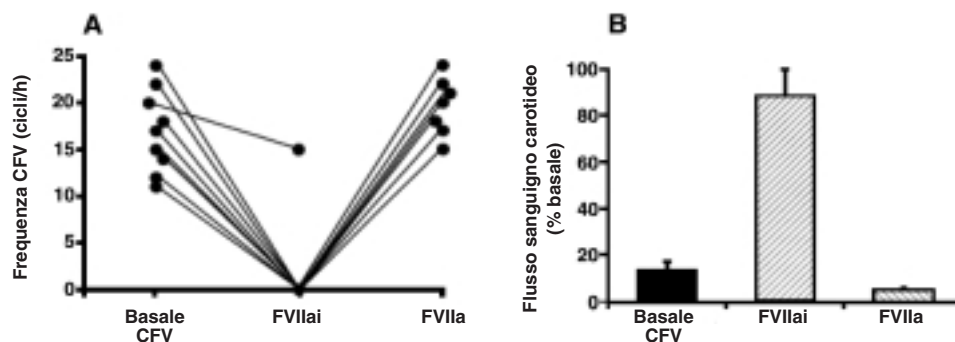


Figura 4. A: il grafico mostra gli effetti del fattore VIIa inattivato (FVIIai) sulla trombosi ricorrente espressa come numero di cicli di occlusione/riperfuazione all'ora in un modello sperimentale. La frequenza della trombosi ricorrente si riduce a zero in tutti gli animali, tranne uno, dopo la somministrazione FVIIai, ad indicare un potente effetto antitrombotico del farmaco. La trombosi ricorrente viene invece ristabilita in tutti gli animali nei quali era stata precedentemente inibita dal FVIIai dopo somministrazione di fattore VII attivato (FVIIa). B: severità della trombosi intracarotidea, espressa come velocità del flusso sanguigno carotideo (CFV). La somministrazione di FVIIai provocava un aumento significativo nel CFV rispetto al valore basale. La somministrazione di FVIIa provocava una diminuzione significativa della velocità carotidea simile a quella osservata in condizioni basali.

pleta dell'induzione del gene del TF e di conseguenza della sua attività³³. L'applicazione terapeutica dei ribozimi *in vivo* ne richiede un'alta concentrazione all'interno delle cellule bersaglio³⁴⁻³⁷ e la loro efficacia non è dimostrata.

Inibitori della propagazione della coagulazione

La propagazione della cascata coagulativa può essere inibita da farmaci che bloccano il fattore IX attivato o il FXa, o i loro cofattori, fattore VIIIa o fattore Va.

Inibitori del fattore IX attivato

Il fattore IX attivato è essenziale per l'amplificazione del processo coagulativo³⁸. Strategie di inibizione di questo fattore sono ancora in fasi iniziali di sviluppo.

Inibitori del fattore X attivato

Il FXa rappresenta un bersaglio di molte strategie anti-trombotiche a causa della sua posizione chiave nella cascata coagulativa. Il FXa è situato all'inizio della cosiddetta via comune, alla convergenza tra la via intrinseca e quella estrinseca e rappresenta un importante fattore di amplificazione dato che è il componente limitante nella generazione di trombina. Infatti, l'inibizione di una molecola di FXa previene la formazione di circa 138 molecole di trombina^{38,39}. Per tale motivo, negli ultimi anni si è assistito ad un'intensa ricerca di inibitori del FXa come nuovi agenti antitrombotici³⁹. Inibitori selettivi del FXa sono stati sintetizzati sulla base del dominio pentasaccaridico in grado di legare l'antitrombina III presente sulla molecola dell'eparina. Il cambio conformazionale risultante nella molecola di antitrombina III permette il legame specifico di quest'ultima al FXa con conseguente inattivazione di tale fattore. Fondaparinux ed idraparinix sono pentasaccaridi di sintesi ad alta affinità per l'antitrombina III che quindi inibiscono indirettamente il FXa⁴⁰⁻⁴². Alcuni trial clinici, come il PENTATHLON, il PENTAMAKS, l'EPHESUS, il PENTHIFRA e il PENTHIFRA-Plus, hanno evidenziato l'efficacia e la sicurezza del fondaparinux nella prevenzione e nel trattamento della trombosi venosa profonda (con o senza embolia polmonare)⁴³⁻⁴⁷. Inoltre, tali inibitori si sono anche dimostrati promettenti in alcune esperienze cliniche preliminari eseguite in pazienti con sindromi coronariche acute. Ad esempio, risultati incoraggianti sono stati ottenuti con il fondaparinux in pazienti con sindrome coronarica acuta nello studio PENTUA (pentasaccaride nell'angina instabile) e nel PENTALYSE (pentasaccaride come aggiunta alla fibrinolisi nell'infarto miocardico acuto con sopraslivellamento del tratto ST)^{48,49}. Mentre il fondaparinux offre benefici aggiuntivi rispetto alle eparine a basso peso molecolare ed all'eparina non frazionata, l'incidenza delle complicanze emorragiche è però significativamente più alta con il fondaparinux che con l'eparina

non frazionata^{50,51}. L'idraparinix ha un'emivita più lunga rispetto al fondaparinux ed è pertanto somministrabile una volta alla settimana; alla pari del fondaparinux accelera l'inibizione delle proteasi della cascata della coagulazione rispetto all'eparina e all'eparina a basso peso molecolare⁵².

Trombomodulina solubile

La trombomodulina è un anticoagulante naturale che attiva la proteina C, conducendo all'inattivazione dei fattori Va e VIIIa, con conseguente riduzione della formazione della trombina. La trombomodulina umana ricombinante è un anticoagulante di nuova generazione a lunga emivita come dimostrato da studi condotti in diversi modelli animali. Studi di fase I sulla farmacocinetica, farmacodinamica e sulla sicurezza della trombomodulina solubile umana ricombinante sono tuttora in corso. Il farmaco, utilizzato per via sottocutanea, si è dimostrato ben tollerato ed è attualmente in uso in studi di tromboprofilassi⁵³.

Proteina C attivata

La proteina C è un anticoagulante naturale che agisce inibendo i fattori Va e VIIIa della coagulazione, portando quindi ad una riduzione della formazione di trombina. Cofattore della proteina C attivata è la proteina S. La proteina C umana è stata recentemente prodotta in forma attiva mediante DNA ricombinante. È stata impiegata in vari trial clinici in pazienti affetti da shock settico con riduzione della mortalità, anche se il suo uso si associa ad un aumento delle complicanze emorragiche.

Inibitori diretti della trombina

Gli inibitori diretti della trombina offrono parecchi vantaggi rispetto all'eparina e agli eparinoidi. Poiché essi non agiscono indirettamente attraverso il legame con l'antitrombina III e non si legano alle proteine plasmatiche, l'effetto anticoagulante è molto più prevedibile. Questi agenti non sono neutralizzati dal fattore piastrinico 4, la cui concentrazione risulta aumentata in prossimità di trombi ricchi di piastrine^{54,55}, rendendo così più efficace l'effetto antitrombotico. Un ulteriore vantaggio di queste molecole è di inibire sia la trombina legata alla fibrina che quella libera nel plasma favorendo in questo modo l'azione antitrombotica⁵⁶. Lo svantaggio, invece, più importante di questi inibitori specifici è la mancanza di un antidoto specifico. Pertanto, il loro utilizzo nella pratica clinica richiede una perfetta conoscenza della loro farmacocinetica e del loro metabolismo.

Gli inibitori della trombina, quali irudina, bivalirudina ed argatroban, sono molecole per uso parenterale, mentre lo ximelagatran, molecola di ultima generazione, viene somministrato per via orale e convertito a livello epatico nella sua forma attiva, il melagatran.

L'irudina è un polipeptide isolato dalla saliva della sanguisuga in grado di inibire irreversibilmente sia il sito catalitico che quello di legame della trombina al fi-

brinogeno⁵⁷. Diversi studi clinici che hanno testato l'azione di questa molecola nelle sindromi coronariche acute e nell'angioplastica coronarica hanno dimostrato che l'irudina è efficace almeno quanto l'eparina nella riduzione degli eventi cardiovascolari maggiori⁵⁸⁻⁶⁵. Tuttavia, è improbabile che l'irudina sia approvata per le sindromi coronariche acute a causa della ristretta finestra terapeutica e delle più frequenti complicanze emorragiche legate al suo utilizzo⁶⁶⁻⁶⁸. L'irudina si è anche dimostrata più efficace sia dell'eparina non frazionata⁶⁹ che dell'eparina a basso peso molecolare⁷⁰ nella profilassi del tromboembolismo venoso in pazienti sottoposti ad artroplastica d'elezione. Tuttavia, malgrado queste evidenze, lo sviluppo clinico dell'irudina per la profilassi del tromboembolismo venoso non è stato perseguito.

La bivalirudina, un derivato sintetico dell'irudina, possiede lo stesso meccanismo d'azione dell'irudina, ma la sua azione farmacologica risulta meno potente ed è pertanto più sicura per l'uso clinico. Le massime concentrazioni plasmatiche si rilevano già dopo 5 min dalla somministrazione, con un'emivita pari a circa 25 min⁵⁴. La molecola è ad esclusiva eliminazione renale e pertanto ne è richiesta una riduzione del dosaggio in pazienti con insufficienza renale severa⁷⁰. Studi clinici hanno dimostrato che la bivalirudina è efficace almeno quanto l'eparina non frazionata nel prevenire le complicanze ischemiche in corso di angioplastica coronarica, mentre nel Bivalirudin Angioplasty Study si è riscontrata una ridotta frequenza di eventi emorragici nel braccio di trattamento con bivalirudina rispetto al braccio di trattamento con eparina, anche se nessuna differenza è stata osservata per quanto riguarda le emorragie intracraniche⁷¹⁻⁷³. Studi successivi hanno indicato che la bivalirudina offre risultati favorevoli in termini di eventi ischemici ed emorragici anche in paziente sottoposti ad angioplastica coronarica con impianto di stent e concomitante trattamento con clopidogrel e/o inibitori della glicoproteina (GP) IIb/IIIa^{74,75}. Nello studio REPLACE-2, la bivalirudina associata agli inibitori della GPIIb/IIIa si è dimostrata non inferiore all'eparina non frazionata associata agli inibitori della GPIIb/IIIa e superiore all'eparina da sola in termini di endpoint ischemici ed emorragici in corso di angioplastica coronarica⁷⁵. La bivalirudina, da sola o in associazione agli inibitori della GPIIb/IIIa, si presenta pertanto come un'alternativa valida alla terapia standard con eparina da sola o in associazione agli inibitori della GPIIb/IIIa in corso di angioplastica coronarica⁷⁵.

Lo ximelagatran è un inibitore diretto della trombina che è stato studiato per la prevenzione ed il trattamento dei fenomeni tromboembolici in pazienti con fibrillazione atriale cronica. Come la bivalirudina, lo ximelagatran è un inibitore reversibile della trombina attivo per via orale in grado di bloccare sia la forma libera della trombina circolante che quella legata alla fibrina. Possiede profili farmacocinetici e farmacodinamici favorevoli, compresi ampi indici terapeutici, rapida ve-

locità d'azione e ridotta variabilità interpaziente rispetto agli inibitori indiretti della trombina. La molecola è dotata di elevata biodisponibilità dopo somministrazione orale. Lo ximelagatran si è dimostrato sicuro ed efficace almeno quanto l'eparina a basso peso molecolare sia in pazienti sottoposti a chirurgia ortopedica che nella prevenzione di eventi ischemici in pazienti con tromboembolismo venoso o infarto del miocardio⁷⁶⁻⁸³. Inoltre, lo ximelagatran è più efficace degli anticoagulanti orali nella prevenzione delle complicanze emboliche dovute a fibrillazione atriale, con sicurezza paragonabile, anche se il suo uso è associato ad un'epatotossicità che sembra limitarne le indicazioni^{84,85}.

Inibitori piastrinici

L'adesione piastrinica al sito di danno della parete vasale rappresenta il primo evento della formazione del trombo. Le piastrine aderiscono al subendotelio per interazione tra il fattore von Willebrand (vWF) e la GPIIb/IIIa esposta sulla superficie delle piastrine. L'adesione, inizialmente reversibile, permette alle piastrine di rotolare sopra la zona danneggiata, con successiva adesione irreversibile mediata dal recettore per il collagene, GPVI, con conseguente passaggio alla fase successiva, l'attivazione piastrinica. Ciò comporta il rilascio di una serie di mediatori chimici solubili, quali il trombossano A₂, la serotonina, l'adenosina difosfato, il fattore di attivazione piastrinica, ecc., tutti in grado di stimolare specifici recettori di membrana, il legame con i quali comporta il reclutamento di altre piastrine circolanti, fenomeno che culmina con l'esposizione del recettore della GPIIb/IIIa che media il legame al fibrinogeno e quindi l'aggregazione piastrinica vera e propria.

Nell'ultima decade, un elevato numero di molecole sono state sviluppate per inibire a diversi livelli l'aggregazione piastrinica. Tra queste, gli inibitori della GPIIb/IIIa e del recettore per l'adenosina difosfato (ticlopidina e clopidogrel) hanno dimostrato in numerosi trial clinici di essere estremamente efficaci in ambito cardiovascolare.

Teoricamente, interferire con la tappa iniziale del processo di adesione piastrinico, quale il legame della GPIIb al vWF⁸⁶ o l'interazione di quest'ultimo con il collagene⁸⁷, offrirebbe vantaggi significativi rispetto ai farmaci antiplastrinici "classici" come l'aspirina. Infatti, l'interazione vWF-GPIIb/IIIa assume piena importanza fisiologica soltanto in condizioni di elevato "shear stress" di parete, quali quelle riscontrabili in prossimità di una stenosi significativa del lume arterioso. Pertanto, l'inibizione di questa interazione avrà poca influenza sul sistema emostatico in condizioni di basso "shear stress", riducendo quindi l'incidenza di complicanze emorragiche. Inoltre, interferire con la tappa iniziale, non ridondante dell'attivazione piastrinica, dovrebbe comportare un effetto antitrombotico più marcato^{86,87}.

Inibitori dell'interazione glicoproteina Ib-fattore von Willebrand

Tre sono le principali categorie di inibitori del legame della GPIb al vWF che possono esplicare un effetto antitrombotico: anticorpi monoclonali anti-GPIb, peptidi e veleni di serpente.

Anticorpi monoclonali antiglicoproteina Ib

La ricerca ha permesso di sviluppare diverse molecole anticorpali anti-GPIb umana, per esempio SZ2^{88,89}, G19h10^{90,91}, LJIb⁹², 6B4⁹³ e molti altri. Tutti questi anticorpi, tuttavia, sebbene siano molto attivi in diversi modelli sperimentali, non sono al momento in fase di sviluppo clinico.

Frammenti di fattore von Willebrand ed altri peptidi

Proprietà antiplastriniche *in vitro* ed *in vivo* sono state descritte per la forma ricombinante del vWF in cui il dominio A1 contiene la mutazione Arg₅₄₅ Cys⁹⁴. La molecola rVWF445-733 (o RG12986) è un altro frammento ricombinante di vWF in cui il dominio A1 contiene residui alchilati e ridotti di cisteina. Il frammento rVWF445-733 è espresso in *Escherichia coli* e regola l'interazione vWF-GPIb⁹⁵ legandosi spontaneamente alla GPIb in assenza di qualsiasi modulatore come la ristocetina o la botrocetina, impedendo il legame, in condizioni di elevato "shear stress", con il vWF nativo⁹⁵. VCL è un terzo frammento ricombinante di vWF, espresso anch'esso in *Escherichia coli* che contiene la sostituzione Leu-504-Ser-728 nel suo dominio A1, con un singolo legame disolfuro intracatena tra i residui Cys-509-Cys-695⁹⁶. VCL è in grado di inibire sia l'interazione vWF-piastrina che l'interazione piastrina-piastrina favorita dalla ristocetina e dalla botrocetina⁹⁷. Il peptide Trp9-Ile-Arg-Arg-Pro-Phe-Phe-Pro-Phe17, un nuovo potente inibitore dell'adesione piastrinica, è stato prodotto sulla base di studi condotti sulla sequenza dell' α B-cristallina⁹⁷, una "heat shock protein". Questo peptide inibisce fortemente sia l'aggregazione trombinica-indotta che quella ristocetina-botrocetina-indotta^{98,99}. Non sono stati dimostrati effetti sull'aggregazione indotta dall'adenosina difosfato, dal collagene o da peptidi agonisti di PAR-4.

Molecole derivate da veleni di serpente

Una grande varietà di proteine e peptidi biologicamente attivi presenti nei veleni di serpente si sono dimostrati in grado di interagire con il processo emocoagulativo sia in termini pro- che antitrombotici. Molti di questi sono enzimi, mentre altri, come le disintegrine e le lectine C, non hanno attività enzimatica¹⁰⁰. Studi *in vitro* hanno permesso di identificare dai veleni diverse molecole che possiedono effetti inibitori nei confronti del legame tra GPIb/IX/V e vWF¹⁰¹. Al momento, tuttavia, l'unica molecola tra quelle fin qui menzionate, il frammento VCL del vWF, è stata testata con successo *in vivo*¹⁰¹.

Conclusioni

Numerosi sono i farmaci antitrombotici che nell'ultimo decennio sono giunti all'osservazione della comunità scientifica. Molti, sebbene interessanti per ciò che riguarda il meccanismo d'azione, sono rimasti nell'ambito sperimentale e non sono ancora disponibili clinicamente; altri hanno raggiunto questo traguardo e fanno attualmente parte dell'arsenale farmacologico a disposizione del medico. La ricerca in questo campo è molto attiva e rappresenta il cardine per poter sviluppare la migliore strategia antitrombotica del futuro.

Riassunto

La ricerca dei meccanismi fisiopatologici che portano alla formazione del trombo è stata molto attiva nell'ultimo decennio. Ciò ha permesso lo sviluppo di differenti strategie terapeutiche che interferiscono con tappe diverse del processo coagulativo, dell'adesione, attivazione ed aggregazione piastrinica. Molti di questi farmaci non hanno portato a termine un completo sviluppo clinico, mentre altri sono attualmente disponibili per il clinico. Lo scopo di questa rassegna è di fare il punto sulle nuove strategie terapeutiche sviluppate negli ultimi anni in termini di antiaggregazione ed anticoagulazione.

Parole chiave: Anticoagulanti; Antitrombotici; Sindromi coronariche acute; Trombosi.

Bibliografia

1. Cirillo P, Calì G, Golino P, et al. Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation. *Circulation* 2004; 109: 2911-6.
2. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995; 74: 90-3.
3. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6 (Suppl 1): S7-S13.
4. Ragni M, Golino P, Cirillo P, et al. Endogenous tissue factor pathway inhibitor modulates thrombus formation in an *in vivo* model of rabbit carotid artery stenosis and endothelial injury. *Circulation* 2000; 102: 113-7.
5. Golino P, Cirillo P, Calabrò P, et al. Expression of exogenous tissue factor pathway inhibitor *in vivo* suppresses thrombus formation in injured rabbit carotid arteries. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 569-76.
6. Golino P, Ravera A, Ragni M, Cirillo P, Piro O, Chiariello M. Involvement of tissue factor pathway inhibitor in the coronary circulation of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 108: 2864-9.
7. Haskel EJ, Torr SR, Day KC, et al. Prevention of arterial re-occlusion after thrombolysis with recombinant lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Circulation* 1991; 84: 821-7.
8. Jang Y, Guzman LA, Lincoff AM, et al. Influence of blockade at specific levels of the coagulation cascade on restenosis in a rabbit atherosclerotic femoral artery injury model. *Circulation* 1995; 92: 3041-50.
9. Oltrona L, Speidel CM, Recchia D, Wickline SA, Eisenberg PR, Abendschein DR. Inhibition of tissue factor-mediated coagulation markedly attenuates stenosis after balloon-in-

- duced arterial injury in minipigs. *Circulation* 1997; 96: 646-52.
10. St Pierre J, Yang LY, Tamirisa K, et al. Tissue factor pathway inhibitor attenuates procoagulant activity and upregulation of tissue factor at the site of balloon-induced arterial injury in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2263-8.
 11. Abraham E. Tissue factor inhibition and clinical trial results of tissue factor pathway inhibitor in sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28: 831-3.
 12. Zoldhelyi P, Chen ZQ, Shelat HS, McNatt JM, Willerson JT. Local gene transfer of tissue factor pathway inhibitor regulates intimal hyperplasia in atherosclerotic arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4078-83.
 13. Atsuchi N, Nishida T, Marutsuka K, et al. Combination of a brief irrigation with tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and adenovirus-mediated local TFPI gene transfer additively reduces neointima formation in balloon-injured rabbit carotid arteries. *Circulation* 2001; 103: 570-5.
 14. Pawashe AB, Golino P, Ambrosio G, et al. A monoclonal antibody against rabbit tissue factor inhibits thrombus formation in stenotic injured rabbit carotid arteries. *Circ Res* 1994; 74: 56-63.
 15. Ragni M, Cirillo P, Pascucci I, et al. Monoclonal antibody against tissue factor shortens tissue plasminogen activator lysis time and prevents reocclusion in a rabbit model of carotid artery thrombosis. *Circulation* 1996; 93: 1913-8.
 16. Petersen LC, Sprecher CA, Foster DC, Blumberg H, Hamamoto T, Kisiel W. Inhibitory properties of a novel human Kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry* 1996; 35: 266-72.
 17. Kondo S, Kisiel W. Regulation of factor VIIa in plasma: evidence that antithrombin III is the sole plasma proteinase inhibitor of human factor VIIa. *Thromb Res* 1987; 46: 325-31.
 18. Girard TJ, MacPhail LA, Likert KM, Novotny WF, Miletich JP, Broze GJ Jr. Inhibition of factor VIIa-tissue factor coagulation activity by a hybrid protein. *Science* 1990; 248: 1421-4.
 19. Dennis MS, Lazarus RA. Kunitz domain inhibitors of tissue factor-factor VIIa. II: Potent and specific inhibitors by competitive phage selection. *J Biol Chem* 1994; 269: 22137-44.
 20. Stassen JM, Lambeir AM, Matthyssens G, et al. Characterisation of a novel series of aprotinin-derived anticoagulants. I: In vitro and pharmacological properties. *Thromb Haemost* 1995; 74: 646-54.
 21. Lee A, Agnelli G, Buller H, et al. Dose-response study of recombinant factor VIIa/tissue factor inhibitor recombinant nematode anticoagulant protein c2 in prevention of postoperative venous thromboembolism in patients undergoing total knee replacement. *Circulation* 2000; 104: 74-8.
 22. Harker LA, Hanson SR, Wilcox JN, Kelly AB. Antithrombotic and antileSION benefits without hemorrhagic risks by inhibiting tissue factor pathway. *Haemostasis* 1996; 26 (Suppl 1): 76-82.
 23. Himer J, Kirchhofer D, Riederer M, Tschopp TB, Steiner B, Roux SP. Dissociation of antithrombotic effect and bleeding time prolongation in rabbits by inhibiting tissue factor function. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1142-9.
 24. Harker LA. Therapeutic inhibition of thrombin activities, receptors, and production. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12: 1211-30.
 25. Golino P, Ragni M, Cirillo P, et al. Antithrombotic effects of recombinant human, active site-blocked factor VIIa in a rabbit model of recurrent arterial thrombosis. *Circ Res* 1998; 82: 39-46.
 26. Golino P, Cirillo P, D'Andrea D, et al. Long-term antithrombotic effects of human recombinant, active site-blocked factor VIIa in a chronic model of intravascular thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 992-8.
 27. Rao LV, Ezban M. Active site-blocked activated factor VII as an effective antithrombotic agent: mechanism of action. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11 (Suppl 1): S135-S143.
 28. Marschall P, Thomson JB, Eckstein F. Inhibition of gene expression with ribozymes. *Cell Mol Neurobiol* 1994; 14: 523-38.
 29. Cech TR. Self-splicing of group I introns. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 543-68.
 30. Symons RH. Small catalytic RNAs. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 641-71.
 31. Kiehnopf M, Esquivel EL, Brach MA, Hermann F. Ribozymes: biology, biochemistry, and implications for clinical medicine. *J Mol Med* 1995; 73: 65-71.
 32. Golino P, Ravera A, Ragni M, Cirillo P, Piro O, Chiariello M. Induction of tissue factor in the arterial wall during recurrent thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1684-9.
 33. Cavusoglu E, Chen I, Rappaport J, Marmur JD. Inhibition of tissue factor gene induction and activity using a hairpin ribozyme. *Circulation* 2002; 105: 2282-7.
 34. Feldman LJ, Steg G. Optimal techniques for arterial gene transfer. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 391-404.
 35. Brieger D, Topol E. Local drug delivery systems and prevention of restenosis. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 405-13.
 36. Nabel EG. Gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* 1995; 91: 541-8.
 37. Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4239-42.
 38. Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood* 1995; 86: 1794-801.
 39. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 17-25.
 40. Samama MM, Gerotziafas GT. Evaluation of the pharmacological properties and clinical results of the synthetic pentasaccharide (fondaparinux). *Thromb Res* 2003; 109: 1-11.
 41. Keam SJ, Goa KL. Fondaparinux sodium. *Drugs* 2002; 62: 1673-85.
 42. Hoppensteadt D, Walenga JM, Fareed J, Bick RL. Heparin, low-molecular-weight heparins, and heparin pentasaccharide: basic and clinical differentiation. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003; 17: 313-41.
 43. Weitz JI, Hirsh J, Samama MM. New anticoagulant drugs: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; 126 (Suppl): 265S-286S.
 44. Turpie AG, Gallus AS, Hoek JA, for the Pentasaccharide Investigators. A synthetic pentasaccharide for the prevention of deep-vein thrombosis after total hip replacement. *N Engl J Med* 2001; 344: 619-25.
 45. Bauer KA, Eriksson BI, Lassen MR, Turpie AG, for the Steering Committee of the Pentasaccharide in Major Knee Surgery Study. Fondaparinux compared with enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after elective major knee surgery. *N Engl J Med* 2001; 345: 1305-10.
 46. Lassen MR, Bauer KA, Eriksson BI, et al, for the European Pentasaccharide Elective Surgery Study (EPHESUS) Steering Committee. Postoperative fondaparinux versus preoperative enoxaparin for prevention of venous thromboembolism in elective hip-replacement surgery: a randomised double-blind comparison. *Lancet* 2002; 359: 1715-20.
 47. Bauer KK, Eriksson BI, Lassen MR, Turpie AG. Influence of the duration of fondaparinux prophylaxis in preventing venous thromboembolism following hip fracture surgery. (abstr) *Blood* 2002; 100: 83A.

48. Ferguson JJ. Meeting highlights: American Heart Association scientific sessions 2001. *Circulation* 2002; 105: e37-e41.
49. Coussement PK, Bassand JP, Convens C, et al. A synthetic factor Xa inhibitor (ORG31540/SR9017A) as an adjunct to fibrinolysis in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2001; 22: 1716-24.
50. Bijsterveld NR, Moons AH, Boekholdt SM, et al. Ability of recombinant factor VIIa to reverse the anticoagulant effect of the pentasaccharide fondaparinux in healthy volunteers. *Circulation* 2002; 106: 2550-4.
51. MATISSE Investigators. Fondaparinux (Arixtra) in comparison to low molecular weight heparin for the initial treatment of symptomatic deep venous thrombosis or pulmonary embolism: the MATISSE clinical outcome studies. (abstr) *Blood* 2002; 100: 83A.
52. Olson ST, Swanson R, Raub-Segall E, et al. Accelerating ability of synthetic oligosaccharides on antithrombin inhibition of proteinases of the clotting and fibrinolytic systems. Comparison with heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost* 2004; 92: 929-39.
53. Moll S, Lindley C, Pescatore S, et al. Phase I study of a novel recombinant human soluble thrombomodulin, ART-123. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1745-51.
54. Fox I, Dawson A, Loynds P, et al. Anticoagulant activity of hirulog, a direct thrombin inhibitor, in humans. *Thromb Haemost* 1993; 69: 157-63.
55. Stringer KA, Lindenfeld J. Hirudins: antithrombin anticoagulants. *Ann Pharmacother* 1992; 26: 1535-40.
56. Weitz JI, Hudoba M, Massel D, Maraganore J, Hirsh J. Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *J Clin Invest* 1990; 86: 385-91.
57. Hofsteenge J, Stone SR, Donella-Deane A, Pinna LA. The effect of substituting phosphotyrosine for sulphotyrosine on the activity of hirudin. *Eur J Biochem* 1990; 188: 55-9.
58. Antman EM. Hirudin in acute myocardial infarction. Thrombolysis and Thrombin Inhibition in Myocardial Infarction (TIMI) 9B trial. *Circulation* 1996; 94: 911-21.
59. The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO) IIB Investigators. A comparison of recombinant hirudin with heparin for the treatment of acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1996; 335: 775-82.
60. Neuhaus KL, Molhoek GP, Zeymer U, et al. Recombinant hirudin (lepirudin) for the improvement of thrombolysis with streptokinase in patients with acute myocardial infarction: results of the HIT-4 trial. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 966-73.
61. Simes R, Granger C, Antman EM, Califf RM, Braunwald E, Topol EJ. Impact of hirudin versus heparin on mortality and (re)infarction in patients with acute coronary syndromes: a prospective meta-analysis of the GUSTO IIB and TIMI 9B trials. (abstr) *Circulation* 1996; 94 (Suppl 1): 430.
62. Metz BK, White HD, Granger CB, et al. Randomized comparison of direct thrombin inhibition versus heparin in conjunction with fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction: results from the GUSTO-IIB trial. Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries in Acute Coronary Syndromes (GUSTO-IIB) Investigators. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1493-8.
63. Organization to Assess Strategies for Ischemic Syndromes (OASIS) Investigators. Comparison of the effects of two doses of recombinant hirudin compared with heparin in patients with acute myocardial ischemia without ST elevation: a pilot study. *Circulation* 1997; 96: 769-77.
64. Organisation to Assess Strategies for Ischemic Syndromes (OASIS-2) Investigators. Effects of recombinant hirudin (lepirudin) compared with heparin on death, myocardial infarction, refractory angina, and revascularisation procedures in patients with acute myocardial ischaemia without ST elevation: a randomised trial. *Lancet* 1999; 353: 429-38.
65. Fox KA. Implications of the organization to assess strategies for ischemic syndromes-2 (OASIS-2) study and the results in the context of other trials. *Am J Cardiol* 1999; 84 (Suppl 5): 26M-31M.
66. Antman EM, for the TIMI-9A Investigators. Hirudin in acute myocardial infarction: safety report from the thrombolysis and thrombin inhibition in myocardial infarction (TIMI) 9A trial. *Circulation* 1994; 90: 1624-30.
67. The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO) IIA Investigators. Randomized trial of intravenous heparin versus recombinant hirudin for acute coronary syndromes. *Circulation* 1994; 90: 1631-7.
68. Neuhaus KL, von Essen R, Tebbe U, et al. Safety observations from the pilot phase of the randomized r-Hirudin for Improvement of Thrombolysis (HIT-III) study: a study of the Arbeitsgemeinschaft Leitender Kardiologischer Krankenhausärzte (ALKK). *Circulation* 1994; 90: 1638-42.
69. Eriksson BI, Ekman S, Lindbratt S, et al. Prevention of thromboembolism with use of recombinant hirudin: results of a double-blind, multicenter trial comparing the efficacy of desirudin (Revasc) with that of unfractionated heparin in patients having a total hip replacement. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79: 326-33.
70. Eriksson BI, Wille-Jørgensen P, Kalebo P, et al. A comparison of recombinant hirudin with a low-molecular-weight heparin to prevent thromboembolic complications after total hip replacement. *N Engl J Med* 1997; 337: 1329-35.
71. Bittl JA, Strony J, Brinker J, et al, for the Hirulog Angioplasty Study Investigators. Treatment with bivalirudin (hirulog) as compared with heparin during coronary angioplasty for unstable or post-infarction angina. *N Engl J Med* 1995; 333: 764-9.
72. Bittl JA, Chairman BR, Feit F, Kimball W, Topol EJ. Bivalirudin versus heparin during coronary angioplasty for unstable or post-infarction angina: final report reanalysis of the Bivalirudin Angioplasty Study. *Am Heart J* 2001; 142: 952-9.
73. Bittl JA. Comparative safety profiles of hirulog and heparin in patients undergoing coronary angioplasty. The Hirulog Angioplasty Study Investigators. *Am Heart J* 1995; 130: 658-65.
74. Lincoff AM, Kleiman NS, Kottke-Marchant K, et al. Bivalirudin with planned or provisional abciximab versus low-dose heparin and abciximab during percutaneous coronary revascularization: results of the Comparison of Abciximab Complications with Hirulog for Ischemic Events Trial (CACHET). *Am Heart J* 2002; 143: 847-53.
75. Lincoff AM, Bittl JA, Harrington RA, et al, for the REPLACE-2 Investigators. Bivalirudin and provisional glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with heparin and planned glycoprotein IIb/IIIa blockade during percutaneous coronary intervention: REPLACE-2 randomized trial. *JAMA* 2003; 289: 853-63.
76. Heit JA, Colwell DW, Francis CW, et al, for the Astra-Zeneca Arthroplasty Study Group. Comparison of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran with enoxaparin as prophylaxis against venous thromboembolism after total knee replacement: a phase 2 dose-finding study. *Arch Intern Med* 2001; 161: 2215-21.
77. Eriksson BI, Agnelli G, Cohen AT, et al, on behalf of the EXPRESS Study Investigators. The oral direct thrombin inhibitor ximelagatran, and its subcutaneous form, melagatran, compared with enoxaparin for prophylaxis of venous thromboembolism in total hip or total knee replacement: the EXPRESS study. (abstr) *Blood* 2002; 100: 299.
78. Eriksson BI, Agnelli G, Cohen AT, et al, for the METHRO

- III Study Group. Direct thrombin inhibitor melagatran followed by oral ximelagatran in comparison with enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after total hip or knee replacement. *Thromb Haemost* 2003; 89: 288-96.
79. Colwell CW, Berkowitz SD, Davidson BL, et al. Randomized, double-blind, comparison of ximelagatran, an oral direct thrombin inhibitor, and enoxaparin to prevent venous thromboembolism after total hip arthroplasty. (abstr) *Blood* 2001; 98: 2952.
80. Francis CW, Davidson BL, Berkowitz SD, et al. Ximelagatran versus warfarin for the prevention of venous thromboembolism after total knee arthroplasty: a randomized, double-blind trial. *Ann Intern Med* 2002; 137: 648-55.
81. Francis CS, Berkowitz SD, Comp PC, et al. Randomized, double-blind, comparison of ximelagatran, an oral direct thrombin inhibitor, and warfarin to prevent venous thromboembolism after total knee replacement. (abstr) *Blood* 2002; 100: 300.
82. Eriksson H, Wahlander K, Lundstrom T, Lundstrom T, Clason SB, Schulman S, for the THRIVE III Investigators. Extended secondary prevention with the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran for 18 months after 6 months of anticoagulation in patients with venous thromboembolism: a randomized, placebo-controlled trial. (abstr) *Blood* 2002; 100: 297.
83. Eriksson H, Wahlander K, Gustafsson D, Welin LT, Frison L, Schulman S, for the THRIVE I Investigators. A randomized, controlled, dose-guiding study of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran compared with standard therapy for the treatment of acute deep vein thrombosis: THRIVE I. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 41-7.
84. Petersen P, Grind M, Adler J, for the SPORTIF II Investigators. Ximelagatran versus warfarin for stroke prevention in patients with nonvalvular atrial fibrillation. SPORTIF II: a dose-guiding, tolerability, and safety study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1445-51.
85. Peterson P. A long-term follow-up of ximelagatran as an oral anticoagulant for the prevention of stroke and systemic embolism in patients with atrial fibrillation. (abstr) *Blood* 2001; 98: 2953.
86. Vanhoorelbeke K, Ulrichs H, Schoolmeester A, Deckmyn H. Inhibition of platelet adhesion to collagen as a new target for antithrombotic drugs. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003; 3: 125-40.
87. Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. The role of von Willebrand factor-collagen interaction in acute platelet thrombus formation. *Drugs of the Future* 2003; 28: 61-7.
88. Ruan CG, Du XP, Xi XD, Castaldi PA, Berndt MC. A murine antiglycoprotein-Ib complex monoclonal-antibody, Sz 2, inhibits platelet-aggregation induced by both ristocetin and collagen. *Blood* 1987; 69: 570-7.
89. Ruan C, Tobelem G, McMichael AJ, et al. Monoclonal antibody to human platelet glycoprotein I. II: Effects on human platelet function. *Br J Haematol* 1981; 49: 511-9.
90. Montgomery RR, Kunicki TJ, Taves C, Pidard D, Corcoran M. Diagnosis of Bernard-Soulier syndrome and Glanzmann's thrombasthenia with a monoclonal assay on whole blood. *J Clin Invest* 1983; 71: 385-9.
91. Jurk K, Clemetson KJ, de Groot PG, et al. Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *FASEB J* 2003; 17: 1490-2.
92. Vanhoorelbeke K, Depraetere H, Romijn RA, Huizinga EG, De Maeyer M, Deckmyn H. A consensus tetrapeptide selected by phage display adopts the conformation of a dominant discontinuous epitope of a monoclonal anti-VWF antibody that inhibits the von Willebrand factor-collagen interaction. *J Biol Chem* 2003; 278: 37815-21.
93. Cauwenberghs N, Meiring M, Vauterin S, et al. Antithrombotic effect of platelet glycoprotein Ib-blocking monoclonal antibody Fab fragments in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1347-53.
94. Gurevitz O, Goldfarb A, Hod H, et al. Recombinant von Willebrand factor fragment AR545C inhibits platelet aggregation and enhances thrombolysis with rTPA in a rabbit thrombosis model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 200-7.
95. Sugimoto M, Ricca G, Hrinda ME, et al. Functional modulation of the isolated glycoprotein Ib binding domain of von Willebrand factor expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1991; 30: 5202-9.
96. Gralnick HR, Williams S, McKeown L, et al. A monomeric von Willebrand factor fragment, Leu-504-Lys-728, inhibits von Willebrand factor interaction with glycoprotein Ib-IX. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7880-4.
97. Matsuno H, Ishisaki A, Nakajima K, Kato K, Kozawa O. A peptide isolated from alpha B-crystallin is a novel and potent inhibitor of platelet aggregation via dual prevention of PAR-1 and GPIb/V/IX. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2636-42.
98. Matsuno H, Kozawa O, Niwa M, et al. A heat shock-related protein, p20, plays an inhibitory role in platelet activation. *FEBS Lett* 1998; 429: 327-9.
99. Kozawa O, Matsuno H, Niwa M, Hatakeyama D, Kato K, Uematsu T. Alpha B-crystallin, a low-molecular-weight heat shock protein, acts as a regulator of platelet function. *Cell Stress Chaperones* 2001; 6: 21-8.
100. Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 2000; 82: 851-9.
101. Yamamoto H, Vreys I, Stassen JM, Yoshimoto R, Vermylen J, Hoylaerts MF. Antagonism of vWF inhibits both injury induced arterial and venous thrombosis in the hamster. *Thromb Haemost* 1998; 79: 202-10.