



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 342**

51 Int. Cl.:
A61K 31/727 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05824840 .2**
96 Fecha de presentación : **26.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1807095**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2007**

54 Título: **Heparina 2-O, 3-O desulfatada para el tratamiento del síndrome de trombocitopenia inducido por heparina (HIT).**

30 Prioridad: **27.10.2004 US 974566**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2011

73 Titular/es: **PARINGENIX, Inc.**
1792 Bell Tower Lane
Weston, Florida 33326, US

72 Inventor/es: **Walenga, Jeanine, M. y**
Kennedy, Thomas, Preston

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 366 342 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

Heparina 2-O, 3-O desulfatada para el tratamiento del síndrome de trombocitopenia inducido por heparina (HIT).

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere un medicamento para tratar y prevenir la activación plaquetaria o la trombosis en presencia de anticuerpos reactivos frente al complejo de heparina-factor plaquetario 4 utilizando una heparina 2-O, 3-O desulfatada.

Técnica anterior

- 10 El fármaco heparina, descubierto hace casi un siglo, se sigue utilizando en la actualidad para evitar la coagulación de la sangre. Su aplicación varía desde la prevención de la trombosis de venas profundas en paciente médicos y quirúrgicos en riesgo de una trombosis venosa y posterior embolia pulmonar, a una anticoagulación total como tratamiento de pacientes que padecen embolia pulmonar, infarto de miocardio u otros trastornos trombóticos, y a una anticoagulación total en pacientes que están sometidos a procedimientos de cateterización intravascular o cirugía cardíaca, de forma que se evita la trombosis sobre los catéteres o las máquinas de bypass cardiopulmonares. En
15 fecha reciente, se ha descubierto que la heparina también es útil para tratar trastornos de proliferación vascular o inflamación, y ha demostrado ser beneficiosa en una plétora de otras enfermedades, incluyendo hipertensión pulmonar hipóxica secundaria, asma, fibrosis quística, enfermedad inflamatoria del intestino, eccema, quemaduras y glomerulonefritis. Sin embargo, la heparina tiene dos efectos secundarios importantes y graves que limitan su uso.

- 20 El primero de éstos es su principal indicación terapéutica: un sangrado excesivo debido a la anticoagulación. Aunque la anticoagulación es beneficiosa para la prevención o el tratamiento de enfermedades trombóticas, es un inconveniente si la heparina se utiliza para tratar otras enfermedades, tales como asma, en las que la anticoagulación no es necesaria para obtener el beneficio terapéutico, e incluso puede plantear un riesgo adicional al paciente. Un sangrado impropio debido a la anticoagulación es incluso el principal efecto secundario cuando se emplea la heparina para la prevención o el tratamiento de trastornos trombóticos en los que la anticoagulación sí está indicada. Afortunadamente, el efecto secundario del sangrado habitualmente está autolimitado. Cuando finaliza
25 la terapia con heparina y se reponen las pérdidas de sangre procedentes del espacio vascular, la función de la coagulación y la presión sanguínea normalmente vuelven a la normalidad tras un tiempo corto, con lo que finaliza el periodo de riesgo.

- 30 Un segundo efecto secundario, la trombocitopenia inducida por heparina, es menos frecuente pero mucho más grave. Este trastorno se refiere a la disminución del recuento de plaquetas sanguíneas que aparece en algunos pacientes que reciben una terapia con heparina en cualquier forma. El trastorno ha sido analizado a fondo por varios autores (Fabris, F., Ahmad, S., Cella, G., Jeske, W.P., Walenga, J.M., Fareed, J., Pathophysiology of heparin-induced thrombocytopenia. Clinical and diagnostic implications - a review, *Archiv. Pathol. Lab. Med.*, 124:1657-1666, 2000; Arepally, G., Cines, D.B., Pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Autoimmunity Rev.*, 1:125-132, 2002; Warkentin, T.E., Greinacher, A., Heparin-induced thrombocytopenia and cardiac surgery, *Ann. Thorac. Surg.*, 76:638-648, 2003; Warkentin, T.E., Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management, *Brit. J. Haematol.*, 121:535-555, 2003; Chong, G.H., Heparin-induced thrombocytopenia, *J. Thromb. Haemostas.*, 1:1471-1478, 2003).

- 40 Existen dos tipos de trombocitopenia inducida por heparina (HIT). La trombocitopenia inducida por heparina-I (HIT-1) se caracteriza por una caída breve y asintomática en el recuento de plaquetas hasta unos niveles tan bajos como $100 \times 10^9/l$. Este trastorno se resuelve de modo espontáneo por sí mismo y no requiere la suspensión del fármaco. Se cree que este trastorno está provocado por el agrupamiento de plaquetas inducido por heparina, no se ha identificado ningún componente inmunológico de la enfermedad, y las complicaciones del trastorno son poco habituales.

- 45 El segundo tipo de trombocitopenia inducida por heparina es más letal. La trombocitopenia inducida por heparina-II (HIT-2) tiene una causa inmunológica y se caracteriza por una profunda disminución en el recuento de plaquetas (>50%) a menudo después del quinto día de la terapia con heparina. Por contraste con la HIT-1, en la que las complicaciones son raras, la HIT-2 normalmente viene acompañada de trombosis microvascular, venosa o arterial mayor, con pérdida de funciones de los órganos o perfusión de extremidades. Si no se trata, el trastorno puede
50 provocar la muerte. Más común con heparina derivada de pulmón bovino (5% de los pacientes) que con heparina intestinal porcina (1% de los pacientes), la incidencia de la enfermedad ha variado ampliado, dependiendo del tipo de heparina, de la vía de administración o de la población de pacientes.

- La heparina intravenosa está asociada con una incidencia global de la HIT-2 de aproximadamente 1,7%, mientras que es raro que el trastorno se produzca con una administración profiláctica subcutánea para evitar la trombosis de venas profundas (Schmitt, B.P., Adelman, B., Heparin-associated thrombocytopenia: a critical review and pooled analysis, *Am. J. Med. Sci.*, 305:208-215, 1993). El uso de heparinas de bajo peso molecular pero totalmente anticoagulantes, tales como enoxaparina o dalteparina, disminuye la probabilidad de que aparezca el síndrome, pero

ha habido informes de HIT-2 con heparinas de bajo peso molecular. El único anticoagulante que se cree totalmente exento de riesgo de inducir la HIT-2 es el recientemente aprobado inhibidor del factor Xa, el pentasacárido sintético fondaparinux sodio (Walenga, J.M., Jeske, W.P., Bara, L., Samama, M.M., Fareed, J., artículo de la técnica actualizada, *Biochemical and Pharmacologic rationale for the development of a Heparin pentasaccharide*, *Thromb. Res.*, 86(1):1-36 (1997)).

La patogénesis de la HIT-2 se centra en el factor-4 de plaquetas (PF4), una quimioquina específica de plaquetas de 70 aminoácidos (7,78 kD) que se almacena en los gránulos α de plaquetas, en los que está unida al glicosaminoglicano sulfato de condroitina. Cuando se libera, el PF4 se autoasocia en un tetrámero de aproximadamente 31 kD. El PF4 es muy básico (32 restos lisinas y 12 restos arginina por tetrámero), lo que hace que tenga una carga positiva muy alta. Los niveles plasmáticos normales de PF4 son bajos, del orden de 8 nmol/l. El PF4 liberado de las plaquetas tras la activación plaquetaria se une al glicocáliz de las células endoteliales como depósito. La infusión de heparina aumenta de forma transitoria los niveles de PF4 de 15 a 30 veces durante varias horas desplazando el PF4 de la interfase endotelial vascular.

La formación del complejo de PF4-heparina se produce de manera óptima a concentraciones estequiométricas equivalentes de PF4 y heparina. Cuando se administra como un anticoagulante terapéutico, los niveles de heparina varían de 0,2 a 0,4 IU/ml, o 100-200 nmol/l, mayores que las concentraciones óptimas para la formación del complejo de PF4-heparina. Sin embargo, en pacientes como los que se someten a cirugía cardíaca o de cadera, se produce la activación *in vivo* de las plaquetas, liberando PF4 a la circulación y aumentando los niveles de PF4 en la circulación (de 75-100 nmol/l) hacia las concentraciones óptimas para la formación del complejo estequiométrico 1:1. Cuando la heparina se une al PF4 produce cambios conformacionales en la proteína, exponiendo los epítopos antigénicos a los cuales se une un anticuerpo.

El anticuerpo HIT se une a los complejos de heparina-PF4 con alta afinidad. Este complejo de anticuerpo-heparina-PF4 entonces se une a las plaquetas mediante la unión del dominio Fc del anticuerpo al receptor de Fc de las plaquetas (Fc γ R1IIa). Esto, a su vez, reticula los receptores de Fc de plaquetas, induciendo la activación de las plaquetas, la síntesis de tromboxano y la agregación de las plaquetas. El PF4 liberado de las plaquetas activadas agregantes forma un complejo con más heparina extracelular para formar más complejos de heparina-PF4 que se unen a la superficie de las plaquetas y actúan como otros sitios para la unión del anticuerpo HIT. Esta siguiente ola unión de los anticuerpos HIT a los complejos de heparina-PF4 localizados en las plaquetas se produce a través del dominio Fab del anticuerpo, dejando el dominio Fc libre para que interaccione con los receptores de Fc de las plaquetas adyacentes, reticulando los receptores Fc γ R1IIa e induciendo más activación y agregación plaquetaria. En paralelo, la activación de las plaquetas también produce la liberación y la interacción del ligando de CD40/CD40, dando como resultado la inducción de la expresión del factor tisular sobre la superficie de células endoteliales y macrófagos. La generación de micropartículas de plaquetas cuando están presentes los anticuerpos HIT que son muy procoagulantes, la sobreexpresión de la selección de moléculas P de adhesión en la superficie de las plaquetas, y la inducción de un estado proinflamatorio con HIT demuestra la implicación de los neutrófilos y de los monocitos con las plaquetas activadas por los anticuerpos HIT, así como la sobreexpresión de citoquinas en los pacientes (Walenga, J.M., Jeske, W.P., Prechel, M.M., Makhos, M., *Newer insights on the mechanism of heparin-induced thrombocytopenia*, *Semin. Thromb. Hemost.*, 30(supl. 1):57-67 (2004)). Esto agrava el estado hipercoagulable proporcionando un estímulo para el inicio de la cascada de coagulación extrínseca, y proporciona el telón de fondo para las complicaciones trombóticas del síndrome de HIT-2. La trombocitopenia está provocada por la eliminación de las plaquetas activadas y de los agregados plaquetarios por el sistema reticuloendotelial.

El síndrome clínico que caracteriza la HIT-2 se distingue por una caída sustancial en el recuento de plaquetas normalmente en más del 50% hasta un nadir medio de aproximadamente $55 \times 10^9/l$. La disminución en las plaquetas puede venir acompañada por el desarrollo de trombosis venosa y embolia pulmonar o, de manera menos habitual, de trombosis arterial que implica a las grandes arterias de las extremidades inferiores. Con menos frecuencia se producen el ictus trombótico y el infarto de miocardio. Otra característica del síndrome es la aparición de lesiones en la piel en los sitios de inyección de la heparina, que varían desde la aparición de placas eritematosas hasta una franca necrosis de la piel. Una cuarta parte de los pacientes desarrolla un síndrome agudo de fiebre, escalofríos, insuficiencia respiratoria, hipertensión y amnesia global cuando reciben la heparina por vía intravenosa en un momento en que los anticuerpos HIT-2 en la circulación están presentes. Incluso puede producirse una coagulación intravascular diseminada. Para evitar estas complicaciones, se sugiere que cuando HIT-2 sea reconocido se detenga el heparinoide precipitante y el paciente sea totalmente anticoagulado con otro agente, tal como un inhibidor directo de la trombina (lepirudina, argatrobano o bivalirudina) o el pentasacárido sintético fondaparinux, que no presenta reacción cruzada con los anticuerpos HIT. Debido a que el uso de warfarina de forma aguda en casos de HIT-2 se ha asociado con el desarrollo de trombosis microvasculares o necrosis de la piel, la anticoagulación de seguimiento a largo plazo con warfarina se retrasa hasta la resolución de la trombocitopenia. Esto a menudo necesita una hospitalización prolongada para la administración de anticoagulantes alternativos, tales como los inhibidores directos de trombina.

Las características estructurales de los heparinoides que están asociados con HIT-2 se han caracterizado en detalle (Greinacher, A., Alban, S., Dummel, V., Franz, G., Mueller-Eckhardt C., *Characterization of the structural requirements for a carbohydrate based anticoagulant with a reduced risk of inducing the immunological type of heparin-associated thrombocytopenia*, *Thromb. Haemostas.*, 74:886-892 (1995); Walenga, J.M. *et al.*, *supra* (2004);

Walenga, J.M., Koza, M.J., Lewis, B.E., Pifarré, R., Relative heparin induced thrombocytopenic potential of low molecular weight heparins and new antithrombotic agents, *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2(supl. 1):S21-S27 (1996); y Jeske, W.P., Jay, A.M., Hass, S., Walenga, J.M., Heparin-induced thrombocytopenic potential of GAG and non-GAG-based antithrombotic agents, *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 5(supl. 1):S56-S62 (1999)). Con sulfatos de carbohidratos de tipo heparina lineales, el riesgo de la activación plaquetaria en presencia de un anticuerpo HIT y PF4 depende de modo crítico del peso molecular del polímero y de su grado de sulfatación (es decir, del número medio de sulfatos por monómero de carbohidrato). Se descubrió que el grado crítico de sulfatación para formar el complejo antigénico de heparina-PF4 reactivo con HIT está entre 0,6 y 1,20 (es decir, de 0,6 a 1,2 grupos sulfato por monómero de carbohidrato). La tendencia de un polisacárido sulfatado para formar el complejo antigénico de heparina-PF4 reactivo con HIT, con la posterior activación de las plaquetas, también está gobernada por el peso molecular. Se requirieron concentraciones crecientes de heparina para la formación de los complejos cuando se estudiaron heparinas con un peso molecular desceinte hasta 2,4 kD. Con sacáridos por debajo de 2,4 kD no se observó formación de complejos. Tampoco se observó la activación de anticuerpos HIT con el pentasacárido sintético fondaparinux, que pesa aproximadamente 1,7 kD. Los investigadores concluyeron que sólo dos estrategias reducían de forma predecible el riesgo de formación del complejo de heparina-PF4 reactivo con HIT: 1) reducir el grado de sulfatación hasta <0,6 sulfatos por unidad de carbohidrato; o 2) disminuir el peso molecular del polisacárido a <2,4 kD.

Un compuesto de tipo heparina que no interacciona con PF4 para formar complejos reactivos con HIT ofrecería mayores ventajas frente a las heparinas de bajo peso molecular o no fraccionadas que están disponibles en la actualidad para un uso terapéutico. La heparina 2-O desulfatada descrita en el documento WO 2004/050673 es uno de los anticoagulantes que no se une a PF4. Por tanto, reduce el riesgo de fatalidad debida a HIT. Aunque no existen pruebas clínicas de que sea un anticoagulante, el nuevo pentasacárido fondaparinux también parece haber logrado este objetivo, puesto que no activa a las plaquetas en presencia del anticuerpo HIT (Greinacher, A. *et al.*, *supra*; Walenga, J.M. *et al.*, *supra* (2004); Walenga, J.M. *et al.*, *supra* (1996); y Jeske, W.P. *et al.*, *supra* (1999)). Sin embargo, aunque resulta ideal como agente anticoagulante, este análogo de la heparina de pequeño peso molecular es totalmente anticoagulante, colocando al paciente en riesgo de un sangrado excesivo si tiene una diatesis sangrante o un desgarro en la integridad de su sistema vascular. Esto es especialmente problemático en sujetos con HIT que también han sufrido hemorragia gastrointestinal o del sistema nervioso central. La anticoagulación con fondaparinux o con cualquier agente es necesaria en HIT para evitar una trombosis arterial o venosa potencialmente fatal, pero puede poner en peligro la vida del sujeto si éste también tiene una hemorragia activa. Además, aunque el sujeto no tenga una hemorragia, una estrategia de baja anticoagulación para tratar la HIT sería mucho más segura y más preferiblemente que las estrategias disponibles en la actualidad, que emplean todas fármacos totalmente anticoagulantes y que incluyen los inhibidores directos de la trombina argatrobano y lepirudina.

La presente invención alcanza este objetivo. Se ha sintetizado una heparina 2-O, 3-O desulfatada que es útil como agente para inhibir la inflamación, tal como las lesiones por reperfusión isquémica en el corazón como consecuencia de un infarto de miocardio. Una ventaja de la presente invención es que se han proporcionado los métodos para producir esta heparina 2-O, 3-O desulfatada (heparina ODS) en grandes cantidades a una escala comercial. La heparina ODS también tiene un USP y una actividad anticoagulante anti-Xa muy reducidos, haciendo que sea más segura para su uso a dosis antiinflamatorias y que sea menos probable que provoque sangrado. El peso molecular medio de la heparina 2-O, 3-O desulfatada es de 10,5 kD, y su grado de sulfatación aproximado es de 1,0 (5 grupos sulfato por pentasacárido, véase la figura 1), colocándola bien dentro del intervalo de riesgo para una interacción con el anticuerpo HIT (Greinacher A., *et al.*, *supra*). De manera sorprendente, y a pesar de que su tamaño y grado de sulfatación predecirían lo contrario, la heparina ODS no provoca la activación de las plaquetas en presencia de un antisuero reactivo con HIT conocido a concentraciones bajas o altas. Por tanto, la heparina ODS también constituye una alternativa más segura a otras heparinas antiinflamatorias porque presenta un riesgo significativamente reducido de producir trombosis y trombocitopenia asociada a HIT-2.

De manera aún más sorprendente, la heparina 2-O, 3-O desulfatada también es útil para tratar el síndrome de HIT cuando ya ha aparecido, y reduce la actividad de la agregación de las plaquetas consecuencia de un anticuerpo dirigido contra el complejo de heparina-PF4. Por tanto, la administración de heparina 2-O, 3-O desulfatada, que tiene una actividad anticoagulante y un riesgo de sangrado muy reducidos, puede utilizarse como tratamiento clínico para el síndrome de HIT, eliminando la necesidad de los arriesgados tratamientos totalmente anticoagulantes que se utilizan en la actualidad para la terapia de la HIT.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir un análogo de la heparina que no produzca la activación de las plaquetas en presencia de suero que contenga anticuerpos HIT.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un análogo de la heparina que pueda utilizarse para tratar el síndrome de HIT establecido y que evite la agregación plaquetaria y la trombosis vascular que resultan de este trastorno.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un análogo de la heparina que tenga un tamaño suficientemente grande y que posea un grado suficiente de sulfatación retenida para que sea antiinflamatorio.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un análogo de la heparina que sustancialmente no induzca una actividad anticoagulante.

Como otro objeto de la presente invención se proporciona un agente terapéutico que puede utilizarse para tratar el síndrome de HIT establecido sin inducir una actividad anticoagulante.

- 5 Otro objeto de esta invención es que el agente terapéutico se produzca a partir de un compuesto toxicológicamente caracterizado.

Además, otro objeto de la presente invención es que la síntesis de la heparina 2-O, 3-O desulfatada pueda producirse a niveles viables desde el punto de vista comercial.

- 10 Según la presente invención, se proporciona un medicamento que comprende una heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante, en el que dicha heparina desulfatada no induce la activación plaquetaria en presencia de anticuerpos dirigidos contra el complejo de heparina-factor plaquetario 4, para su uso para tratar el síndrome de trombocitopenia inducida por heparina en un paciente.

- 15 En otro aspecto, la invención proporciona un medicamento que comprende una heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante, en el que dicha heparina desulfatada no induce la activación plaquetaria en presencia de anticuerpos dirigidos contra el complejo de heparina-factor plaquetario 4, para su uso para mejorar el síndrome de trombocitopenia inducida por heparina.

- 20 En otro aspecto, se proporciona un medicamento que comprende una heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante, en el que dicha heparina desulfatada no induce la activación plaquetaria en presencia de anticuerpos dirigidos contra el complejo de heparina-factor plaquetario 4, para su uso para prevenir el síndrome de trombocitopenia inducida por heparina.

- 25 También se proporciona un medicamento que comprende una heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante, en el que dicha heparina desulfatada no induce la activación plaquetaria en presencia de anticuerpos dirigidos contra el complejo de heparina -factor plaquetario 4, y un fármaco seleccionado del grupo que consiste en fármacos antitrombina, fármacos antiplaquetas y fármacos antiinflamatorios, para su uso en combinación para tratar el síndrome de trombocitopenia inducida por heparina en un paciente.

- En otra realización, se proporciona el uso de una heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante, en el que la heparina desulfatada no induce la activación plaquetaria en presencia de anticuerpos dirigidos contra el complejo de heparina-factor plaquetario 4, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el síndrome de trombocitopenia inducido por heparina en un paciente.

- 30 La presente invención se refiere a un medicamento para la heparina exento de riesgo o reactividad frente a HIT, que comprende una cantidad eficaz como tratamiento de una heparina 2-O, 3-O desulfatada en un vehículo fisiológicamente aceptable. El vehículo fisiológicamente aceptable puede seleccionarse del grupo que consiste fundamentalmente de disolución salina fisiológicamente tamponada, disolución salina normal y agua destilada. El medicamento comprende preferiblemente una dosis de entre 2 mg/kg de peso corporal del paciente y 100 mg/kg, pero preferiblemente 3,5-25 mg/kg. Estas dosis también se proporcionan en un vehículo fisiológicamente aceptable.

- 35 Los inventores describen un medicamento de heparina sustancialmente exento de riesgo o reactividad frente a HIT que tiene un peso molecular mayor que 2,4 kD y un grado de sulfatación mayor que 0,6. También se describe un medicamento de heparina que puede suprimir de modo activo la interacción de un anticuerpo HIT con sus determinantes antigénicos y que disminuye la agregación plaquetaria resultante y el estado procoagulante inducido por el síndrome de HIT.

- 40 En realizaciones preferidas de la invención, el análogo de heparina 2-O, 3-O desulfatada exento de riesgo o reactividad frente a HIT puede administrarse mediante aerosolización, mediante inyección intravenosa, mediante inyección subcutánea, por vía oral o mediante instilación rectal. Una dosis eficaz para la administración a un ser humano, en especial cuando se utiliza por vía intravenosa, es una dosis entre 2 mg/kg y 100 mg/kg de heparina 2-O, 3-O desulfatada. En otras realizaciones de la invención, el peso molecular es mayor que 2,4 kD. En otra realización de la invención, el grado de sulfatación es mayor que 0,6 pero menor que 1,2. Preferiblemente, el medicamento incluye un vehículo fisiológicamente aceptable que puede seleccionarse del grupo que consiste en disolución salina fisiológicamente tamponada, disolución salina normal y agua destilada.

- 45 Los inventores también describen un método para producir un análogo de heparina sustancialmente exento de riesgo o reactividad frente a un anticuerpo HIT, y que también puede utilizarse para tratar activamente de forma eficaz el síndrome de HIT, comprendiendo dicho método reducir la heparina en disolución y liofilizar la disolución de heparina reducida. En otro ejemplo, el análogo de heparina sustancialmente exento de riesgo o reactividad frente a un anticuerpo HIT y que también es útil para el tratamiento del síndrome de HIT se produce liofilizando la heparina en disolución sin reducirla. El pH de la disolución de heparina reducida o no reducida puede aumentarse por encima de 13.

55

Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetos, ventajas y características de la invención, y las maneras en las que pueden lograrse serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención, tomada junto con los dibujos adjuntos que ilustran las realizaciones preferidas y ejemplares, en las que:

- 5 la FIGURA 1 muestra una fórmula química de la secuencia de unión a pentasacáridos de una heparina no fraccionada y la secuencia comparable de la heparina 2-O, 3-O desulfatada (heparina ODS);
- la FIGURA 2 muestra los diagramas de distribución del peso molecular diferencial determinados mediante dispersión de luz de láser de múltiples ángulos, junto con la cromatografía de exclusión molecular de alta resolución de la heparina ODS, comparada con la heparina intestinal porcina de origen a partir de la cual fue producida;
- 10 la FIGURA 3A muestre el análisis de disacáridos de la heparina;
- la FIGURA 3B muestra el análisis de disacáridos de la heparina ODS de esta invención;
- la FIGURA 4 muestra un esquema de reacción propuesto para desulfatar la posición 2-O del ácido α -L-idurónico en la secuencia de unión a pentasacáridos de la heparina;
- 15 la FIGURA 5 muestra la reactividad cruzada de la heparina 2-O desulfatada de esta invención con el anticuerpo de heparina, según se determina mediante el ensayo de liberación de serotonina;
- la FIGURA 6 muestra la reactividad cruzada de la heparina 2-O, 3-O desulfatada de esta invención con el anticuerpo de heparina, según se determina mediante la expresión de la P-selectina de la superficie de plaquetas (CD62) cuantificada mediante citometría de flujo;
- 20 la FIGURA 7 es una gráfica que demuestra que concentraciones crecientes de heparina 2-O desulfatada, que también está 3-O desulfatada, suprimen la activación plaquetaria mediada por HIT, como se demuestra por la liberación de serotonina de plaquetas en respuesta a añadir heparina 0,1 ó 0,5 U/ml al suero de un paciente con síndrome de HIT;
- 25 la FIGURA 8 es una gráfica que muestra la media de los resultados de experimentos en los que la heparina 2-O desulfatada, que también está 3-O desulfatada, suprime la activación plaquetaria, como se demuestra por la liberación de serotonina inducida por heparina 0,1 U/ml (UFH) en presencia de suero de cuatro pacientes con síndrome de HIT;
- 30 la FIGURA 9 muestra una gráfica de la media de los resultados de experimentos en los que la heparina 2-O desulfatada, que también está 3-O desulfatada, suprime la activación plaquetaria, como se demuestra por la liberación de serotonina inducida por heparina 0,5 U/ml (UFH) en presencia de suero de cuatro pacientes con síndrome de HIT;
- la FIGURA 10 es una gráfica que demuestra que la heparina 2-O desulfatada, que también está 3-O desulfatada, suprime la formación de partículas de plaquetas cuando el suero de un paciente con HIT se mezcla con heparina 0,1 ó 0,5 U/ml;
- 35 la FIGURA 11 es una gráfica que muestra la media de los resultados de experimentos en los que la heparina 2-O desulfatada, que también está 3-O desulfatada, suprime la formación de partículas de plaquetas cuando el suero de cada uno de cuatro pacientes con HIT se mezcla con heparina 0,1 U/ml;
- la FIGURA 12 es una gráfica que muestra la media de los resultados de experimentos en los que la heparina 2-O desulfatada, que también está 3-O desulfatada, suprime la formación de partículas de plaquetas cuando el suero de cada uno de cuatro pacientes con HIT se mezcla con heparina 0,5 U/ml;
- 40 la FIGURA 13 es una gráfica que demuestra que la heparina 2-O desulfatada, que también está 3-O desulfatada, suprime la activación de plaquetas inducida por HIT, medida mediante la expresión en la superficie de las plaquetas de P-selectina (CD62);
- 45 la FIGURA 14 es una gráfica que muestra la media de los resultados de experimentos en los que la heparina 2-O desulfatada, que también está 3-O desulfatada, suprime la expresión sobre la superficie de plaquetas de P-selectina (CD62) inducida por suero de HIT de cada uno de cuatro pacintes con HIT en presencia de 0,1 U/ml de heparina no fraccionada;
- 50 la FIGURA 15 es una gráfica que muestra la media de los resultados de experimentos en los que la heparina 2-O desulfatada, que también está 3-O desulfatada, suprime la expresión sobre la superficie de plaquetas de P-selectina (CD62) inducida por suero de HIT de cada uno de cuatro pacintes con HIT en presencia de 0,5 U/ml de heparina no fraccionada;
- la FIGURA 16 es una gráfica que muestra las concentraciones sanguíneas de heparina 2-O, 3-O desulfatada,

denominada ODSH, después de la inyección final en perros de raza sabueso en dosis de 4 mg/kg cada 6 horas (16 mg/kg/día), 12 mg/kg cada 6 horas (48 mg/kg/día) y 24 mg/kg cada 6 horas (96 mg/kg/día) durante 10 días;

5 la FIGURA 17 muestra una gráfica del contenido en hemoglobina medido en el fluido de lavado broncoalveolar 24 horas después de la administración de disolución salina (control), elastasa de leucocitos humana (HLE), HLE más heparina, y HLE más heparina ODS;

la FIGURA 18 muestra una gráfica de la concentración de proteína en el fluido de lavado broncoalveolar 24 horas después de la administración de disolución salina (control), elastasa de leucocitos humana (HLE), HLE más heparina, y HLE más heparina ODS;

10 la FIGURA 19 muestra una gráfica del número de células de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en el fluido de lavado broncoalveolar 24 horas después de la administración de disolución salina (control), elastasa de leucocitos humanos (HLE), HLE más heparina, y HLE más heparina ODS;

la FIGURA 20 es una gráfica que demuestra que la heparina y la heparina desulfatada ODS reducen el tamaño del infarto plasmático (proporción entre área de necrosis/área en riesgo o AN/AAR);

15 la FIGURA 21 demuestra que la heparina y la heparina ODS reducen la actividad de creatina quinasa plasmática después de un infarto de miocardio;

la FIGURA 22 demuestra que la heparina y la heparina ODS reducen el flujo de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en el miocardio después de un infarto de miocardio, medido por la actividad de la enzima específica de PMN mieloperoxidasa en el tejido del miocardio;

20 la FIGURA 23 demuestra que la heparina ODS no produce anticoagulación *in vivo*, medida por el tiempo de coagulación activado (ACT), pero que cantidades idénticas de heparina producen una anticoagulación profunda, medida por la prolongación del ACT;

la FIGURA 24 demuestra que la heparina y la heparina ODS bloquean la adherencia de PMN al endotelio de la arteria coronaria normal *in vitro*;

25 la FIGURA 25 ilustra que la heparina y la heparina ODS reducen la adherencia de PMN al endotelio de la arteria coronaria postexperimental;

la FIGURA 26 demuestra que la heparina y la heparina ODS conservan la función vasodilatadora de arterias coronarias con reperfusión isquémica;

la FIGURA 27A demuestra que el factor nuclear- κ B (NF- κ B, teñido de marrón) está normalmente presente en el citoplasma de células endoteliales de vena umbilical humana no estimuladas (HUVEC);

30 la FIGURA 27B muestra HUVEC estimuladas con el factor de necrosis tumoral α (TNF α) sin la adición de heparina. Algunos, pero no todos los núcleos muestran tinción positiva para anti-p65, que corresponde a trans;

la FIGURA 27C demuestra que la estimulación con TNF α no produce la translocación de NF- κ B desde el citoplasma al núcleo en HUVEC pretratadas con heparina ODS 200 μ g/ml;

35 la FIGURA 28 son ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética de proteínas nucleares que demuestran que la heparina ODS disminuye la unión a ADN de NF- κ B en HUVEC estimuladas con TNF; y

la FIGURA 29 son ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética de proteínas nucleares procedentes del miocardio de rata con reperfusión isquémica que demuestran que la heparina ODS disminuye la unión a ADN de NF- κ B estimulada por la reperfusión isquémica.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención se describirá a continuación más a fondo haciendo referencia a los ejemplos adjuntos, en los que se muestran las realizaciones preferidas de la invención.

Se ha descubierto que la heparina en dosis anticoagulantes mayores que las normales y una diversidad de heparinas no anticoagulantes (heparina N-desulfatada; 2-O, 3-O o 6-O desulfatada; N-desulfatada y reacetilada; y O-d Descarboxilada) pueden atenuar las respuestas inflamatorias *in vivo*, tal como inhibiendo los efectos destructivos de la elastasa de leucocitos humana (HLE) en el pulmón cuando se instilan en la tráquea. Estas mismas heparinas y heparinas no anticoagulantes pueden atenuar las lesiones por reperfusión isquémica en el corazón, el cerebro y otros órganos, y reducen el tamaño del infarto del órgano según se mide por el tamaño de la necrosis del órgano. Los ejemplos de la preparación de heparina no anticoagulante 2-O desulfatada, que también está 3-O desulfatada, pueden encontrarse, por ejemplo, en la patente de EEUU nº 5.668.188; la patente de EEUU nº 5.912.237; y la patente de EEUU nº 6.489.311, incorporadas en la presente como referencia. Pueden administrarse cantidades de heparina 2-O, 3-O desulfada de 2 mg/kg a 100 mg/kg, pero preferiblemente en cantidades de aproximadamente 3,5

mg/kg a 25 mg/kg. La heparina 2-O, 3-O desulfada no anticoagulante tiene la ventaja de inhibir la inflamación, tal como la inflamación de pulmón inducida por HLE o la inflamación de miocardio inducida por reperfusión isquémica, pero sin el efecto secundario de la excesiva anticoagulación que resultaría de dosis equivalentes de heparina no modificada. Otras heparinas no anticoagulantes, heparinas de bajo peso molecular (Yanaka, K., Spellman, S.R., McCarthy, J.B., Oegema, T.R. Jr., Low, W.C., Camarata, P.J., Reduction of brain injury using heparin to inhibit leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia, I. Protective mechanism, *J. Neurosurg.*, 85:1102-1107, 1996) y análogos de heparina de polisacáridos sulfatados (Kilgore, K.S., Naylor, K.B., Tanhehco, E.J., Park, J.L., Booth, E.A., Washington, R.A., Lucchesi, B.R., The semisynthetic polysaccharide pentosan polysulfate prevents complement-mediated myocardial injury in the rabbit perfused heart, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 285:987-994, 1998) también pueden inhibir la inflamación. Sin embargo, éstas y otras heparinas y análogos de heparina de glicosaminoglicanos sulfatados reaccionan con anticuerpos de heparina para formar complejos de glicosaminoglicano-PF4-anticuerpo reactivo a HIT capaces de inducir la activación plaquetaria y el síndrome trombótico HIT-2. Este riesgo potencialmente mortal limita gravemente el uso de heparinas no anticoagulantes como terapia antiinflamatoria.

El único polisacárido sulfatado que puede emplearse de modo predecible sin riesgo de síndrome trombótico HIT-2 es el pentasacárido anticoagulante sintético fondaparinux (Greinacher, A. *et al.*, *supra*). Este análogo de la heparina de peso molecular ultrabajo es un anticoagulante eficaz pero es menos útil para tratar la inflamación porque es totalmente anticoagulante y, por tanto, presenta riesgo de inducir el sangrado, y porque su pequeño tamaño reduce en gran medida su actividad para bloquear la unión de PMN mediada por selectina (Koenig, A. *et al.*, *supra*).

Los requerimientos estructurales para un carbohidrato sulfatado exento de reactividad frente al anticuerpo HIT se han caracterizado como un peso molecular <2,4 kD y un grado de sulfatación de <0,6 sulfatos por resto carbohidrato (Greinacher, A. *et al.*, *supra*). Con polisacáridos sulfatados lineales con una longitud de cadena constante de 35 monosacáridos, el grado crítico de sulfatación para formar el antígeno HIT es de entre 0,6 y 1,2 sulfatos por monosacárido. Para los carbohidratos sulfatados en la gama de las heparinas disponibles en el mercado, la activación plaquetaria mediada por HIT alcanzó un máximo a un grado de sulfatación de 1,25. La activación plaquetaria en presencia de polisacáridos sulfatados lineales con un grado fijo de sulfatación también depende del peso molecular, necesitándose concentraciones decrecientes de polisacárido sulfatado para alcanzar 50% del máximo de la activación plaquetaria mediada por HIT a medida que aumenta el peso molecular. Como ejemplo, se requirió una concentración de 50 nmol/l de polisacárido sulfatado para el 50% del máximo de la activación plaquetaria a un peso molecular de 12,2 kD, aproximadamente la de la heparina comercial no fraccionada. Esta concentración está cerca de la concentración de heparina óptima para provocar el síndrome de HIT-2 clínicamente. En el caso de la heparina, se descubrió que en realidad el peso molecular óptimo era de 4,8 kD (un hexadecasacárido), cercano al peso molecular de heparinas de bajo peso molecular disponibles en el mercado, pero pesos moleculares mayores también respaldan la activación plaquetaria mediada por HIT. Los carbohidratos sulfatados de cadena ramificada fueron capaces de formar el antígeno HIT con PF4 a grados aún menores de sulfatación y peso molecular (Walenga, J.M. *et al.*, *supra* (2004); Walenga, J.M. *et al.*, *supra* (1996); y Jeske, W.P. *et al.*, *supra*). Sólo los polisacáridos sulfatados con un peso molecular menor que 2,4 kD o con un grado de sulfatación menor que 0,6 grupos sulfato por monosacárido estaban exentos de reactividad frente a HIT. Como ejemplo, el pentasacárido totalmente anticoagulante fondaparinux, con un peso molecular de 1,78 kD, no produjo activación plaquetaria en presencia de anticuerpos HIT, independientemente de la concentración de pentasacárido utilizada.

La heparina parcialmente desulfatada 2-O, 3-O desulfatada se produce como se indica en la patente de EEUU nº 5.668.188; la patente de EEUU nº 5.912.237; y la patente de EEUU nº 6.489.311, reduciendo la heparina en disolución y secando, liofilizando o destilando al vacío la disolución de heparina reducida. Se puede introducir la heparina de partida por ejemplo en agua u otro disolvente. La concentración típica de la disolución de heparina puede ser del 1% al 10% de heparina. La heparina utilizada en la reacción puede obtenerse a partir de numerosas fuentes, conocidas en la técnica, tal como intestino porcino o pulmón de res. Se puede utilizar heparina que se haya modificado de cualquiera de las formas conocidas por los expertos en la técnica, tales como heparinas de bajo peso molecular que se han producido por oxidación de peryodato o despolimerización de ácido nitroso. También se pueden utilizar como material de partida las heparinas de bajo peso molecular totalmente anticoagulantes disponibles en la actualidad enoxaparina o dalteparina. Otros materiales de partida posibles serán evidentes para los expertos en la técnica, dadas las indicaciones proporcionadas en la presente.

La heparina seleccionada como material de partida en la disolución puede reducirse en la disolución incubando con un agente reductor, tal como borohidruro de sodio, hidrógeno catalítico o hidruro de litio y aluminio. Una reducción preferida de la heparina se realiza incubando la heparina con borohidruro de sodio, generalmente a una concentración (al p/v) del 1%, o 10 gramos de NaBH₄ por litro de disolución. Además pueden utilizarse otros agentes reductores conocidos. La incubación con una sustancia reductora puede lograrse a lo largo de una amplia gama de temperaturas, teniendo cuidado de que la temperatura no sea lo suficientemente alta como para que la heparina se caramelicé. Un intervalo de temperatura sugerido es de aproximadamente 4 °C a 30 °C, o preferiblemente de aproximadamente 20-25 °C. La longitud de tiempo de la incubación también puede variar a lo largo de un amplio intervalo, con la condición de que sea suficiente para que se produzca la reducción. Por ejemplo, pueden ser suficientes varias horas a toda la noche (es decir, de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas). Sin embargo, el tiempo puede extenderse a más de varios días, por ejemplo más de aproximadamente 60 horas. Como alternativa a la reducción de la heparina, que conserva su peso molecular durante la liofilización, se puede omitir

esta etapa y proceder directamente a la liofilización o el secado para la producción. Sin embargo, la despolimerización se produce con más intensidad sin la etapa reductora, y el peso molecular del producto resultante será previsiblemente menor.

Además, el método para producir la heparina 2-O, 3-O desulfatada comprende también aumentar el pH de la heparina reducida o no reducida hasta 13 o mayor añadiendo una base capaz de aumentar el pH hasta 13 o mayor a la disolución de heparina reducida o no reducida. El pH puede aumentarse añadiendo cualquiera de una serie de agentes, incluyendo hidróxidos, tales como hidróxido de sodio, potasio o bario. Un agente preferido es hidróxido de sodio (NaOH). Cuando se haya logrado un pH de 13 o mayor, puede ser beneficioso aumentar aún más la concentración de la base. Por ejemplo, resulta preferible añadir NaOH a una concentración de aproximadamente 0,25 M a aproximadamente 0,5 M. Esta disolución alcalina entonces se seca, se liofiliza o se destila al vacío.

La heparina parcialmente desulfatada producida mediante estos métodos, según se indica en la patente de EEUU nº 5.668.188; la patente de EEUU nº 5.912.237; y la patente de EEUU nº 6.489.311, es una heparina 2-O desulfatada que también está en gran medida 3-O desulfatada, y posee un grado de sulfatación de aproximadamente 1,0 (5 grupos sulfato por pentasacárido; véase la figura 1). Si se emplea una heparina porcina no fraccionada con un peso molecular medio de 11,5 kD como material de partida y se reduce con borohidruro de sodio antes de la liofilización, el producto resultante tiene un peso molecular medio de 10,5 kD. Con un grado de sulfatación de 1,0 y un peso molecular de 10,5 kD, se predice que este análogo de la heparina desencadena significativamente la activación plaquetaria en presencia de un anticuerpo HIT y PF4. Mientras que la heparina no fraccionada estimula activamente la activación plaquetaria bajo estas circunstancias cuando se proporciona a concentraciones de 0,4 μ moles/l, que es la concentración anticoagulante terapéutica habitual de este fármaco, el análogo de heparina 2-O, 3-O desulfatada mediante el método descrito no activa a las plaquetas cuando se estudia en concentraciones que varían de 0,78 μ moles/l a 100 μ moles/l. Estos resultados se obtienen cuando la activación plaquetaria se estudia mediante la liberación de 14 C-serotonina desde las plaquetas o cuando la activación de las plaquetas se mide mediante la formación de micropartículas, detectadas utilizando citometría de flujo. Los ejemplos que aparecen a continuación ilustran estos puntos en detalle. El hecho de que la heparina 2-O desulfatada no induzca el antígeno HIT en presencia de anticuerpo HIT es una ventaja importante, y hace que sea terapéuticamente más segura como análogo de la heparina para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios y otros trastornos en los que un heparinoide podría estar indicado o ser útil.

De modo aún más sorprendente, la heparina 2-O, 3-O desulfatada no sólo no desencadena la activación plaquetaria de tipo HIT, sino que también es eficaz en sí misma para suprimir la activación de plaquetas cuando se exponen a una heparina no modificada en presencia de suero procedente de pacientes con el síndrome de HIT clínico. Para la activación plaquetaria de HIT, se observó una mejoría en la liberación de serotonina a una concentración de heparina 2-O, 3-O desulfatada tan baja como 3,13 μ g/ml en el sistema de ensayo en que se añaden concentraciones antitrombóticas bajas de heparina a las plaquetas y al suero de HIT. Se necesitó una concentración mayor (6,25 μ g/ml) para iniciar la mejoría cuando se añadieron concentraciones anticoagulantes mayores de heparina a las plaquetas y al suero de HIT. Se observó una mejoría completa en la liberación de serotonina a 25 μ g/ml y concentraciones mayores de heparina 2-O, 3-O desulfatada. Cuando en el sistema de ensayo de la activación plaquetaria de HIT se produjo la formación de micropartículas a partir de las plaquetas activadas, se observó una mejoría a concentraciones de heparina 2-O, 3-O desulfatada tan bajas como 6,25 μ g/ml en sistemas de ensayo que utilizaban 0,1 y 0,5 U/ml de heparina para activar a las plaquetas en presencia de suero de HIT. La mejoría completa de la formación de micropartículas de plaquetas en respuesta a la heparina y al suero de HIT se logró a concentraciones de heparina 2-O, 3-O desulfatada de 50 μ g/ml. Por último, cuando la activación plaquetaria se midió como expresión de P-selectina (CD62) sobre la superficie de las plaquetas, unas concentraciones de heparina 2-O, 3-O desulfatada tan bajas como 1,56 μ g/ml mejoraron la activación plaquetaria en presencia de suero de HIT y heparina no fraccionada 0,1 ó 0,5 U/ml. La mejoría completa de la expresión de P-selectina en plaquetas se observó con concentraciones de heparina 2-O, 3-O desulfatada >25 μ g/ml. En conjunto, considerando los tres métodos para medir la activación plaquetaria, la heparina 2-O, 3-O desulfatada fue eficaz para suprimir la activación plaquetaria inducida por HIT comenzando a 6,25 μ g/ml, y la activación plaquetaria inducida por HIT se suprimió completamente a 50 μ g/ml de heparina 2-O, 3-O desulfatada. Estas son concentraciones de heparina 2-O, 3-O desulfatada que pueden lograrse *in vivo* con dosis modestas de fármaco.

Dependiendo de la vía de administración prevista, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una forma de dosificación sólida, semisólida o líquida, tales como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, lociones, cremas, geles o similares, preferiblemente en una forma de dosificación unitaria adecuada para la administración individual de una dosificación precisa. Las composiciones incluirán una cantidad eficaz del fármaco seleccionado en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, diluyentes y similares.

La invención proporciona además partículas en aerosol que comprenden un vehículo fisiológicamente aceptable y una cantidad eficaz de heparina 2-O, 3-O desulfatada o su análogo. Las partículas pueden consistir fundamentalmente en partículas menores de 10 micrómetros y preferiblemente menores que 5 micrómetros. Para la administración a las vías respiratorias o al pulmón, la heparina 2-O, 3-O desulfatada puede administrarse como un

polvo micronizado o inhalarse como una disolución con el uso de un dispositivo nebulizador disponible en el mercado. Para la administración a la mucosa nasal, la heparina 2-O, 3-O desulfatada puede administrarse como una disolución que se aerosoliza mediante un dispositivo de pulverización o de nebulización disponible en el mercado, o puede administrarse como un polvo seco micronizado administrado por vía nasal.

5 Para las composiciones sólidas, los vehículos sólidos no tóxicos convencionales incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Las composiciones farmacéuticamente administrables líquidas pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc. un compuesto activo como se describe en la presente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un excipiente, tal como, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar con ello una disolución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que se va a administrar puede contener también cantidades pequeñas de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulgentes, agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, acetato de sodio de trietanolamina y oleato de trietanolamina. Las composiciones líquidas pueden aerosolizarse para su administración. Los métodos reales para preparar estas formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en la técnica; véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, E.W. Martin (ed.), Mack Publishing Co., Easton, PA.

20 Para la administración oral, los polvos finos o gránulos pueden contener agentes diluyentes, dispersantes y/o tensioactivos, y pueden presentarse en agua o en un jarabe, en cápsulas o en sobres en estado seco, o en una disolución o suspensión no acuosa en la que pueden incluirse agentes suspensores, en comprimidos en los que pueden incluirse ligantes y lubricantes, o en una suspensión en agua o un jarabe. Cuando sea necesario o deseable, pueden incluirse agentes aromatizantes, conservantes, suspensores, espesantes o emulgentes. Los comprimidos y los gránulos son formas de administración oral preferidas y pueden estar revestidos. Para potenciar la penetración oral y la absorción gastrointestinal, la heparina 2-O, 3-O desulfatada puede formularse con mezclas de aceite de oliva, sales biliares o N-[8-(2-hidroxibenzoil)amino]caprilato de sodio (SNAC). Se emplea una proporción preferible de aproximadamente 2,25 g de SNAC a 200-1.000 mg de heparina 2-O desulfatada. Otras formulaciones que facilitan la absorción gastrointestinal pueden fabricarse formulando vesículas de transporte de cocleato de precipitados de fosfolípidos-cationes de heparina 2-O, 3-O desulfatada con fosfotidilserina y calcio, utilizando los métodos descritos en las patentes de EEUU nº 6.153.217, 5.994.318, y 5.840.707, entre otras.

30 Para la administración rectal, la heparina 2-O, 3-O desulfatada puede administrarse en un supositorio, espuma, gel, disolución o enema.

35 La administración parenteral, si se utiliza, se caracteriza en general por utilizar una inyección. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, como disoluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para su disolución o suspensión en un líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Un enfoque revisado recientemente para la administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de forma que se mantiene un nivel de dosificación constante. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 3.710.795, que se incorpora como referencia en la presente.

40 "Farmacéuticamente aceptable" significa un material que no es biológicamente indeseable ni indeseable desde otro punto de vista, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con la heparina 2-O, 3-O desulfatada o el análogo de heparina sin provocar efectos biológicos indeseables o interaccionar de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en que está contenido.

La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

45 Ejemplo I: Producción de una heparina 2-O, 3-O desulfatada que es no anticoagulante, no activa a las plaquetas en presencia de un anticuerpo de trombocitopenia inducida por heparina, e incluso mejora la activación plaquetaria inducida por heparina en presencia de un anticuerpo de trombocitopenia inducida por heparina

50 Puede producirse una heparina parcialmente desulfatada 2-O, 3-O desulfatada en cantidades prácticas desde el punto de vista comercial mediante los métodos descritos en la patente de EEUU nº 5.668.188; la patente de EEUU nº 5.912.237; y la patente de EEUU nº 6.489.311. La modificación en la heparina (para producir heparina ODS) se realizó añadiendo 500 g de heparina de sodio de la mucosa intestinal porcina procedente del lote EM3037991 a 10 l de agua desionizada (concentración final de heparina de 5%). Se añadió borohidruro de sodio hasta una concentración final de 1%, y la mezcla se incubó durante la noche a 25 °C. Entonces se añadió hidróxido de sodio hasta una concentración final de 0,4 M (pH mayor que 13) y la mezcla se liofilizó hasta la sequedad. Se retiró el exceso de borohidruro de sodio y de hidróxido de sodio mediante ultrafiltración. El producto final se ajustó a pH 7,0, se precipitó mediante la adición de tres volúmenes de etanol frío y se secó. La heparina 2-O, 3-O desulfatada producida mediante este procedimiento era un polvo ligeramente blancuzco cristalino fino con menos de 10 unidades USP/mg de actividad anticoagulante y menos de 10 unidades anti-Xa/mg de actividad anticoagulante. La estructura de esta heparina se muestra en la FIGURA 1. El peso molecular se determinó mediante una cromatografía de exclusión molecular de alta resolución junto con dispersión de luz de láser de múltiples ángulos,

utilizando un detector miniDAWN (Wyatt Technology Corporation, Santa Bárbara, CA) que se hizo funcionar a 690 nm. Comparado con un peso molecular medio de 13,1 kD del material de partida, la heparina ODS tenía un peso molecular medio de 11,8 kD.

En la FIGURA 2 se muestran las distribuciones del peso molecular diferencial de la molécula de origen y la heparina ODS. El análisis de los disacáridos se realizó mediante el método de Guo y Conrad (Guo, Y., Conrad, H.E., Analysis of oligosaccharides from heparin by reversed-phase ion-pairing high performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 178:54-62, 1988). Comparado con el material de partida que aparece en la FIGURA 3A, la heparina ODS es una heparina 2-O desulfatada (que se muestra en la FIGURA 3B) que se caracteriza por la conversión de ISM [L-ácido idurónico(2-sulfato)-2,5-anhidromanitol] en IM [L-ácido idurónico-2,5-anhidromanitol], y de ISMS [L-ácido idurónico(2-sulfato)-2,5-anhidromanitol(6-sulfato)] en IMS [L-ácido idurónico-2,5-anhidromanitol(6-sulfato)], indicando ambos la 2-O desulfatación. La secuencia propuesta de la 2-O desulfatación se muestra en la FIGURA 4. La heparina ODS también es una heparina 3-O desulfatada, que se caracteriza por la conversión de GMS2 [D-ácido glucurónico-2,5-anhidromanitol(3,6-disulfato)] en GMS [D-ácido glucurónico-2,5-anhidromanitol(6-sulfato)], que indica la 3-O desulfatación.

El potencial de esta heparina 2-O, 3-O desulfatada para interactuar con el anticuerpo HIT y plaquetas activas se estudió utilizando plaquetas y suero donantes de tres pacientes diferentes con un diagnóstico clínico de HIT-2, mediante la manifestación de una trombocitopenia relacionada con la exposición a la heparina, la corrección de la trombocitopenia tras la eliminación de la heparina, y un ensayo de activación de plaquetas positivo, con o sin trombosis. Se emplearon dos técnicas para medir la activación plaquetaria en respuesta a la heparina o a la heparina 2-O, 3-O desulfatada en presencia de suero reactivo a HIT.

La primera técnica fue el ensayo de liberación de serotonina (SRA), considerado el ensayo de laboratorio de patrón oro para HIT, y se realizó como describe Sheridan (Sheridan, D., Carter, C., Kelton, J.C., A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia, *Blood*, 67:27-30, 1986). Las plaquetas lavadas se cargaron con ¹⁴C-serotonina (¹⁴C-sulfato de hidroxitriptamincreatina, Amersham), y después se incubaron con diversas concentraciones de heparina o análogo de heparina de ensayo en presencia de suero procedente de pacientes con HIT-positiva conocida como fuente de anticuerpo. La activación se evaluó como liberación de ¹⁴C-serotonina desde la plaquetas durante la activación, cuantificándose la ¹⁴C-serotonina utilizando un contador de centelleo líquido. La formación del complejo de heparina-PF4-anticuerpo HIT produjo la activación plaquetaria y la liberación del isótopo hacia el medio tampón. Las plaquetas activadas se definen como un porcentaje de liberación del isótopo $\geq 20\%$.

De manera específica, se extrajo sangre completa utilizando una técnica de dos jeringas de un donante voluntario y se introdujo en citrato de sodio (0,109 M) en una proporción de 1 parte de anticoagulante a 9 partes de sangre completa. Los primeros 3 ml de sangre completa en la primera jeringa se rechazaron. La sangra anticoagulada se centrifugó (80 x g, 15 min, temperatura ambiente) para obtener el plasma rico en plaquetas (PRP). El PRP se marcó con ¹⁴C-serotonina 0,1 μ Ci/ml (45 min, 37 °C), después se lavó y se resuspendió en disolución de Tyrode exenta de albúmina hasta un recuento de 300.000 plaquetas/ μ l. El suero HIT (20 μ l) se incubó (1 hora a temperatura ambiente) con 70 μ l de suspensión de plaquetas y 5 μ l de heparina 2-O, 3-O desulfatada (0, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 μ g/ml de concentraciones finales). Para los controles del sistema, se emplearon 10 μ l de heparina no fraccionada (UFH; concentración final de 0,1 ó 0,5 U/ml, que se corresponde con las concentraciones que aparecen en el plasma de pacientes con dosis antitrombóticas o totalmente anticoagulantes, respectivamente) en lugar de la heparina 2-O, 3-O desulfatada en el ensayo. Se añadió EDTA para detener la reacción, y la mezcla se centrifugó para sedimentar las plaquetas. Se midió la liberación de ¹⁴C-serotonina hacia el sobrenadante en un contador de centelleo. Se midió la liberación máxima tras la lisis de las plaquetas con Triton X-100 al 10%. El ensayo es positivo si la liberación es $\geq 20\%$ de serotonina con UFH 0,1 y 0,5 U/ml (sin añadir heparina 2-O, 3-O desulfatada) y $< 20\%$ de serotonina con UFH 100 U/ml. El ensayo es positivo para la reactividad cruzada entre los anticuerpos HIT y la heparina 2-O, 3-O desulfatada si se produce una liberación de serotonina $\geq 20\%$.

La segunda técnica fue un análisis de plaquetas citométrico de flujo. En este ensayo funcional, las plaquetas en sangre completa se activaron con heparina o con el análogo de heparina en presencia del anticuerpo de heparina en suero procedente de un paciente con diagnóstico clínico de HIT. Utilizando la citometría de flujo, se determinó la activación plaquetaria de dos maneras: mediante la formación de micropartículas de plaquetas y mediante el aumento de la P-selectina unida a la superficie de las plaquetas. Normalmente, las plaquetas en su estado inactivado no expresan CD62 sobre su superficie, y las micropartículas de las plaquetas apenas pueden detectarse. Una respuesta positiva se define como cualquier respuesta significativamente mayor que la respuesta del control de disolución salina.

De manera específica, sangre completa extraída de forma cuidadosa mediante la técnica de doble jeringa se anticoaguló con hirudina (10 μ g/ml de concentración final). Una parte alícuota de sangre completa (50 μ l) se fijó inmediatamente en 1 ml de paraformaldehído al 1% (control de ventana de análisis). Se añadió el suero de HIT (160 μ l) y la heparina 2-O, 3-O desulfatada (50 μ l; 0, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 μ g/ml de concentraciones finales) a la sangre completa (290 μ l) y se incubó (37 °C, 15 minutos con agitación a 600 rpm). Se retiraron partes alícuotas (50 μ l) y se fijaron en 1 ml de paraformaldehído (30 minutos, 4 °C). Las muestras se centrifugaron (350 g, 10 minutos) y se retiró el sobrenadante de paraformaldehído. Las células se resuspendieron en disolución de Tyrode

exenta de calcio (500 μ l, pH 7,4 \pm 0,1). Se añadieron 150 μ l de la suspensión celular a 6,5 μ l de anticuerpo anti-CD61 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Becton-Dickinson, San José, CA; específico para GPIIIa en todas las plaquetas). Las muestras se incubaron (30 minutos, temperatura ambiente) en la oscuridad. Todos los anticuerpos se valoraron frente a células que expresan su antígeno específico antes de la experimentación para evaluar la concentración saturante. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo EPICS XL (Beckman-Coulter, Hialeah, FL) para el dispersión de luz de ángulo directo (FALS) y de ángulo lateral, y para la fluorescencia de FITC y PE. Antes de ensayar las muestras cada día se realizó una calibración del tamaño ensayando esferas marcadas con fluorescencia de un tamaño conocido (Flow-Check, Coulter) y se ajustó la ganancia de forma que las esferas de 1,0 μ m se encuentran al comienzo de la segunda década de una escala de dispersión de luz FALS logarítmica de 4 décadas. Se empleó un discriminador de umbral ajustado sobre la señal de FITC para excluir los acontecimientos que no están marcados con el anticuerpo anti-CD61 (que no son plaquetas).

Utilizando la muestra control de ventana de análisis, se extrajo que las regiones amorfas incluían plaquetas individuales y micropartículas de plaquetas. Las micropartículas de plaquetas se distinguieron de las plaquetas basándose en su perfil citométrico de flujo característico del tamaño celular (FALS) y fluorescencia de FITC (marcador de plaquetas CD61). Las micropartículas de plaquetas se definen como acontecimientos CD61-positivos que son menores que la población de plaquetas no agregadas individuales (< aproximadamente 1 μ m). Se recogieron 20.000 acontecimientos CD61-positivos totales (plaquetas) para cada muestra. Los datos se indican como porcentaje del número total de acontecimientos CD61-positivos analizados. Para ensayar la reactividad cruzada con un anticuerpo HIT dependiente de heparina, los controles de UFH (sin heparina 2-O, 3-O desulfatada) deben mostrar una respuesta positiva (mayor porcentaje de acontecimientos CD61-positivos en la región de micropartículas de plaquetas a UFH 0,1 y 0,5 U/ml pero no a UFH 100 U/ml). El ensayo es positivo para la reactividad cruzada de los anticuerpos HIT con la heparina 2-O, 3-O desulfatada si se produce un aumento en la formación de micropartículas de plaquetas.

La cuantificación de la expresión de P-selectina inducida sobre la superficie de plaquetas mediante la activación de plaquetas relacionada con HIT se determinó como sigue. Para cuantificar la expresión en la superficie de las plaquetas de P-selectina se recogió plasma rico en plaquetas y las plaquetas se marcaron como se describió anteriormente, pero se marcaron también con 6,5 μ l de anticuerpo marcado con ficoeritrina (PE) (Becton-Dickinson; específico para la P-selectina expresada sobre plaquetas activadas). La muestra de control de ventana de análisis se empleó para establecer las regiones de plaquetas individuales y de micropartículas de plaquetas basándose en FALS y en fluorescencia de CD61-FITC. Se realizó una ventana de análisis con un histograma de fluorescencia de PE (expresión de P-selectina) para excluir los agregados plaquetarios. Se ajustó un marcador que incluía el pico completo para determinar la mediana de la fluorescencia de P-selectina. Los resultados se indican en unidades de intensidad de fluorescencia media (MFI) de CD62 en la población de plaquetas no agregadas. Para ensayar la reactividad cruzada con un anticuerpo HIT dependiente de heparina, los controles de UFH deben mostrar una respuesta positiva (mayor fluorescencia de la mediana de P-selectina) a UFH 0,1 y 0,5 U/ml, pero no a UFH 100 U/ml. El ensayo es positivo para la reactividad cruzada de los anticuerpos HIT con la heparina 2-O, 3-O desulfatada si se produce un aumento en la expresión de P-selectina en plaquetas.

La FIGURA 5 demuestra que la heparina no fraccionada a la concentración anticoagulante terapéutica habitual de 0,4 μ g/ml provoca la liberación de >80% de la serotonina radiomarcada total en este sistema. Por contraste, la heparina 2-O, 3-O desulfatada, estudiada en el intervalo de concentraciones de 0,78 a 100 μ g/ml, no produce una liberación de ¹⁴C-serotonina sustancial, lo cual indica que esta heparina 2-O, 3-O desulfatada no interacciona con un anticuerpo HIT preformado que provoca la activación plaquetaria.

La FIGURA 6 demuestra que cuando se incuba la heparina no fraccionada a la concentración anticoagulante terapéutica habitual de 0,4 μ g/ml con plaquetas y suero positivo a anticuerpo HIT, se produce una expresión marcada de CD62 sobre la superficie de aproximadamente 20% de las plaquetas. Las incubaciones de controles de disolución salina se caracterizaron por una baja expresión de CD62 (<2% de plaquetas). Por contraste, la heparina 2-O, 3-O desulfatada, estudiada de 0,78 a 100 μ g/ml, no aumentó los niveles de expresión de CD62 por encima de los observados en las incubaciones control con disolución salina. Además, mientras que la heparina no fraccionada 0,4 μ g/ml produjo una sustancial formación de micropartículas de plaquetas, la heparina 2-O desulfatada de 0,78 a 100 μ g/ml no estimuló la formación de micropartículas de plaquetas por encima de la de las incubaciones control de disolución salina (<5% de actividad).

Con un peso molecular de 10,5 kD y un grado de sulfatación mayor que 1,0, se predice que la heparina ODS provocaría una respuesta de activación plaquetaria similar a la HIT en los ensayos de liberación de serotonina y de formación de micropartículas de plaquetas (Greinacher, A. *et al.*, *supra*). Por tanto, resulta sorprendente e impredecible a partir de la técnica anterior que la heparina 2-O desulfatada no reaccione con el anticuerpo HIT y PF4 para activar a las plaquetas y no es probable que produzca el síndrome de HIT. Esto indica que la heparina 2-O, 3-O desulfatada es un análogo de la heparina terapéutica más seguro para la administración a pacientes para el tratamiento de la inflamación y otros trastornos que necesiten una terapia con heparina o con análogos de la heparina, puesto que la heparina 2-O, 3-O desulfatada no produce el síndrome de HIT-2, que es grave y peligroso para la vida.

De manera más sorprendente, la heparina 2-O, 3-O desulfatada en realidad suprime la activación plaquetaria inducida por el anticuerpo HIT y la heparina no fraccionada. Para estos experimentos de mejoría, la heparina 2-O, 3-O desulfatada fue fabricada mediante un proceso comercial mayor detallado en el ejemplo III. Se emplearon técnicas de SRA y de citometría de flujo ligeramente modificadas con respecto a lo descrito anteriormente para demostrar este efecto exclusivo de la heparina 2-O, 3-O desulfatada.

De manera específica, para el SRA se recogió plasma rico en plaquetas, se preparó y se marcó como se ha descrito previamente. La mezcla del sistema de ensayo incorporaba 5 µl de heparina 2-O, 3-O desulfatada (0, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 µg/ml de concentraciones finales) y 5 µl de heparina no fraccionada (0,1 ó 0,5 U/ml de concentración final). El SRA es positivo para la mejoría de la activación plaquetaria inducida por heparina no fraccionada realizada por la heparina 2-O, 3-O desulfatada si la respuesta de UFH es inhibida en presencia de la heparina 2-O, 3-O desulfatada. Una liberación <20% de serotonina en presencia de UFH y de heparina 2-O, 3-O desulfatada se considera una mejoría completa.

De modo específico, para el análisis citométrico de flujo, se recogió sangre completa y se preparó como se describió previamente. La mezcla del sistema de ensayo incorpora 25 µl de heparina 2-O, 3-O desulfatada (0, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 µg/ml de concentraciones finales) y 25 µl de heparina no fraccionada (0,1 ó 0,5 U/ml de concentración final). Se empleo heparina sin heparina 2-O, 3-O desulfatada como control (UFH 0, 0,1, 0,5 y 100 U/ml de concentraciones finales). Cualquier agente de ensayo, tal como heparina 2-O, 3-O desulfatada, se considera positivo para la mejoría si la respuesta de UFH 0,1 y 0,5 U/ml es inhibida. Se produce la mejoría completa si la respuesta de activación plaquetaria es equivalente a la del control de UFH 100 U/ml (sin que estuviese presente un agente de ensayo, tal como la heparina 2-O, 3-O desulfatada).

En el SRA, la mejoría puede observarse a concentraciones de heparina 2-O desulfatada, que también está 3-O desulfatada, tan bajas como 3,13 µg/ml. Se necesita una concentración mayor de heparina 2-O, 3-O desulfatada (de media 6,25 µg/ml frente a 3,13 µg/ml) para iniciar la mejoría en el sistema de UFH 0,5 U/ml, comparada con la necesaria en el sistema de UFH 0,1 U/ml. Siempre se obtiene un bloqueo completo de la activación plaquetaria inducida por heparina no fraccionada/anticuerpo HIT, pero las concentraciones de la heparina 2-O, 3-O desulfatada difieren dependiendo de la fuerza del anticuerpo HIT. La FIGURA 7 muestra los resultados de la mejoría de SRA utilizando suero procedente de un paciente con HIT típica. En la mayoría de los sueros de los pacientes se observó una mejoría completa (definida como <20% de liberación de serotonina) a 12,5 µg/ml y concentraciones mayores de heparina 2-O, 3-O desulfatada. Se muestran las gráficas compuestas de los datos obtenidos estudiando la inhibición de SRA con sueros de cuatro pacientes con HIT diferentes utilizando el sistema UHF 0,1 U/ml (FIGURA 8) y el sistema UHF 0,5 U/ml (FIGURA 9). Puede observarse que la mejoría se inicia a 6,25 µg/ml, y que la mejoría completa de la respuesta de SRA se logra con 25 µg/ml de heparina 2-O, 3-O desulfatada. No se observó activación plaquetaria en presencia de 50 µg/ml de heparina 2-O, 3-O desulfatada. Debido a la coherencia de los datos no se muestran las barras de error (error estándar de la media, EEM).

La evaluación de la heparina 2-O, 3-O desulfatada para la mejoría de la activación plaquetaria inducida por anticuerpos HIT/heparina no fraccionada utilizando el análisis citométrico de flujo de la formación de micropartículas de plaquetas y la expresión de P-selectina sobre la superficie celular como medida de la activación plaquetaria mostró un efecto de mejoría en todos los sistemas de ensayo (definido como la inhibición de la respuesta obtenida con UFH 0,1 y 0,5 U/ml cuando no estaba presente la heparina 2-O, 3-O desulfatada). Para la formación de micropartículas de plaquetas, se observó la mejoría a unas concentraciones de heparina 2-O, 3-O desulfatada tan bajas como 6,25 µg/ml. No se produjo ninguna diferencia notable entre la respuesta de mejoría observada en los sistemas de UFH 0,1 U/ml y 0,5 U/ml. De media, la mejoría se inició a 6,26 µg/ml de heparina 2-O, 3-O desulfatada. Siempre se obtiene un bloqueo completo de la activación plaquetaria, pero las concentraciones de la heparina 2-O, 3-O desulfatada difieren dependiendo de la fuerza del anticuerpo HIT. La FIGURA 10 muestra los resultados de la mejoría de la formación de micropartículas de plaquetas inducida por HIT/heparina no fraccionada utilizando suero procedente de un paciente con HIT típica. Se muestran las gráficas compuestas de los datos obtenidos estudiando la inhibición de la formación de micropartículas de plaquetas con sueros de cuatro pacientes con HIT diferentes utilizando el sistema UHF 0,1 U/ml (FIGURA 11) y el sistema UHF 0,5 U/ml (FIGURA 12). Se observa una mejoría completa (definida como una respuesta de activación plaquetaria equivalente a la del control de UFH 100 U/ml cuando no estaba presente el agente de ensayo de heparina 2-O, 3-O desulfatada) desde 6,25 µg/ml y concentraciones mayores de heparina 2-O, 3-O desulfatada. De media, se necesitó una concentración de 50 µg/ml de heparina 2-O, 3-O desulfatada para lograr la remisión completa de la formación de micropartículas de plaquetas.

Para la expresión de P-selectina (CD62), puede observarse una mejoría a concentraciones de heparina 2-O, 3-O desulfatada tan bajas como 1,56 µg/ml. No había diferencias notables entre la respuesta de mejoría observada en los sistemas de UFH 0,1 U/ml y 0,5 U/ml. De media, la mejoría se inició a heparina 2-O, 3-O desulfatada 6,25 µg/ml. Siempre se obtiene un bloqueo completo de la activación plaquetaria, pero las concentraciones de la heparina 2-O, 3-O desulfatada difieren dependiendo de la fuerza del anticuerpo HIT. La FIGURA 13 muestra los resultados de la mejoría de la expresión de CD62 de plaquetas inducida por HIT/heparina no fraccionada utilizando suero procedente de un paciente con HIT típica. Se observa una mejoría completa desde 6,25 µg/ml y concentraciones mayores de heparina 2-O, 3-O desulfatada. De media, se necesitó una concentración >25 µg/ml de heparina 2-O, 3-O desulfatada para lograr la mejoría o supresión completa de la activación plaquetaria. Se muestran las gráficas

compuestas de los datos obtenidos estudiando la inhibición de la expresión de CD62 de plaquetas con sueros de cuatro pacientes con HIT diferentes utilizando el sistema UHF 0,1 U/ml (FIGURA 14) y el sistema UHF 0,5 U/ml (FIGURA 15). La mejoría se inicia a 6,25 µg/ml, y la mejoría completa de las respuestas de activación plaquetaria, medida mediante la expresión de CD62, se logra con 50 µg/ml de heparina 2-O, 3-O desulfatada.

5 Ejemplo II: Una inyección intravenosa de heparina 2-O, 3-O desulfatada produce unos niveles sanguíneos necesarios para la mejoría completa de la activación plaquetaria por la heparina en presencia de un anticuerpo de trombocitopenia inducida por heparina

Para determinar si los niveles de heparina 2-O, 3-O desulfatada alcanzan una concentración suficiente *in vivo* para suprimir la activación plaquetaria relacionada con HIT, se inyectaron a tres grupos de perros sabuesos (n = 4 en cada uno) la heparina 2-O, 3-O desulfatada (ODSH) producida como en el ejemplo III. Las inyecciones se administraron a lo largo de 2 minutos en dosis de 0 (control de disolución salina, grupo 1), 4 (grupo 2), 12 (grupo 3) y 24 mg/kg (grupo 4). Las inyecciones se realizaron 4 veces diarias durante 10 días. Diariamente, las dosis de ODSH total administradas fueron de 0, 16, 48 y 96 mg/kg. Se recogió sangre completa en los días del estudio 1, 2, 4, 6 y 8, a los 15 minutos y 6 horas después de la primera inyección del día. Además, después de la inyección de ODSH final, se recogieron muestras a los 15 minutos, y 1, 2, 4, 6 y 8 horas. Todas las muestras se recogieron en tubos Vacutainer que contenían citrato como anticoagulante.

La concentración de ODSH se midió mediante un ensayo potenciométrico desarrollado para la medición de polisacáridos sulfatados en fluidos biológicos (véase Ramamurthy, N., Baliga, N., Wakefield, T.W., Andrews, P.C., Yang, V.C., Myerhoff, M.E., Determination of low-molecular-weight heparins and their binding to protamine and a protamine analog using polyion-sensitive membrane electrodes, *Anal. Biochem.*, 266:116-124, 1999). Se prepararon electrodos cilíndricos sensibles a policationes como se ha descrito previamente (véase Ramamurthy, N., Baliga, N., Whar, J.A., Schaller, U., Yang, V.C., Myerhoff, M.E., Improved protamine-sensitive membrane electrode for monitoring heparin concentrations in whole blood via protamine titration, *Clin. Chem.*, 44:606-661, 1998). Se preparó un cóctel con una composición de sulfonato de dinoilnaftaleno al 1% (en p/p), nitrofeniloctil éter al 49,5% (en p/p), y poliuretano M48 al 49,5% (en p/p) disolviendo los componentes en tetrahidrofurano destilado (200 mg/ml). La disolución resultante se reviste por inmersión sobre los extremos redondeados de tubos capilares de vidrio sellados que sobresalen ligeramente de trozos de 2,54 cm de tubos Tygon (d.i. = 1,3-1,5 mm). Después de revestir por inmersión en la disolución 12 veces a intervalos de 15 minutos, los cuerpos de los sensores se secaron durante la noche en una campana de humo. En el día de su uso, los cuerpos sensores se sumergieron durante al menos una hora en PBS y se retiraron con cuidado los capilares de vidrio. El cuerpo del sensor entonces se rellenó con PBS y se insertó un alambre de Ag/AgCl para completar el sensor. Los sensores se utilizaron una vez y después se desecharon. Dos sensores y un alambre de referencia de Ag/AgCl se conectaron a un módulo amplificador VF-4 (World Precision Instruments) que está en interfase con una placa de entrada/salida analógica/digital (National Instruments) en un ordenador Mac Ilcx. Los datos se muestrean a intervalos de 3 segundos y se registran con un programa informático LabView 2.0. Se prepara una disolución de valorador de sulfato de protamina 1 mg/ml (forma de clupeína, Sigma) en PBS, y el valorador se administra de modo continuo a través de una bomba de jeringa (Bioanalytical Systems). Los criterios de valoración se calcularon utilizando el método de Kolthoff (véase Sergeant, E.P., Potentiometry and potentiometric titrations, en: *Chemical Abstracts*, Kolthoff, I.M., Elwing, P.J., eds., 69:362-364, 1985), seguido de la aplicación de un factor de corrección de sustracción equivalente a la concentración de protamina requerida para alcanzar el criterio de valoración de la curva de calibración.

La FIGURA 16 muestra las concentraciones de ODSH en plasma a intervalos de recolección cronometrados para los tres grupos de dosis y el control. En la tabla 1, a continuación, se muestran las concentraciones medias en diversos momentos.

Tabla 1: Concentraciones medias de heparina ODS después de la inyección

Muestra	Concentración de heparina ODS (µg/ml)			
	0 mg/kg/día	16 mg/kg/día	48 mg/kg/día	160 mg/kg/día
15 min después de la inyección	-0,1 ± 0,4	14,0 ± 0,9	50,4 ± 18,9	237,9 ± 26,5
1 h después de la inyección	2,3 ± 0,7	2,4 ± 0,7	14,6 ± 0,9	86,4 ± 12,1
3 h después de la inyección	0,9 ± 0,7	0,6 ± 0,7	1,7 ± 0,7	17,2 ± 0,8
4 h después de la inyección	1,0 ± 0,7	0,4 ± 0,7	-0,1 ± 0,7	10,7 ± 0,8
6 h después de la inyección	1,8 ± 0,7	0,4 ± 0,7	1,4 ± 0,7	5,7 ± 0,8
8 h después de la inyección	0,9 ± 0,7	0,1 ± 0,7	0,9 ± 0,7	2,1 ± 0,8
12 h después de la inyección	1,7 ± 0,7	2,3 ± 0,7	0,9 ± 0,7	3,7 ± 0,8

La modelización compartimental se realizó utilizando WinNonlin versión 4.1. Las tablas 2 y 3 muestran los parámetros farmacocinéticos ABC (área bajo la curva), K10-SV (semivida terminal), Cmax (concentración máxima), EL (eliminación), ABCM (área bajo la curva del momento), TMR (tiempo medio de residencia), y Vee (volumen de la distribución en estado estacionario) para cada grupo, respectivamente.

5

Tabla 2: Resumen de los parámetros farmacocinéticos*

Dosis (mg/kg/día)	ABC (hr*ug/ml)	Vee (ml/kg)	EL (ml/hr/kg)	Cmax (ug/ml)	Semivida (hr)
16	12,39 ± 1,92	127,23 ± 11,63	322,80 ± 49,98	23,28 ± 1,41	0,27 ± 0,06
48	59,90 ± 1,41	80,01 ± 1,11	200,35 ± 4,71	111,47 ± 1,03	0,28 ± 0,01
96	134,14 ± 10,96	97,39 ± 4,68	178,91 ± 14,63	197,60 ± 7,43	0,38 ± 0,04

* Las estimaciones son ± EEM

Tabla 3: Resultados del análisis compartimental

Dosis	Parámetro	Unidades	Estimación	Error estándar	CV%
16	ABC	hr*ug/ml	12,391491	1,916640	15,47
16	H10-HL	hr	0,273207	0,057834	21,17
16	Cmax	ug/ml	23,279975	1,406524	6,04
16	EL	ml/hr/kg	322,802142	49,978994	15,48
16	ABCM	hr*hr*ug/ml	6,433104	1,988164	30,91
16	TMR	hr	0,394155	0,083437	21,17
16	Vee	ml/kg	127,234069	11,627849	9,14
48	ABC	hr*ug/ml	59,895111	1,405766	2,35
48	H10-HL	hr	0,276820	0,008857	3,20
48	Cmax	ug/ml	111,469287	1,030526	0,92
48	EL	ml/hr/kg	200,350243	4,707016	2,35
48	ABCM	hr*hr*ug/ml	31,407007	1,471781	4,69
48	TMR	hr	0,399367	0,012778	3,20
48	Vee	ml/kg	80,013235	1,107527	1,38
96	ABC	hr*ug/ml	134,144991	10,958943	8,17
96	H10-HL	hr	0,377308	0,039373	10,44
96	Cmax	ug/ml	197,599118	7,433318	3,76
96	EL	ml/hr/kg	178,910892	14,630699	8,18
96	ABCM	hr*hr*ug/ml	89,788574	14,548574	16,20
96	TMR	hr	0,544340	0,056803	10,44
96	Vee	ml/kg	97,388309	4,684936	4,81

10

Se logran unos niveles de heparina 2-O, 3-O desulfatada que mejoran todos los aspectos de la activación de plaquetas de HIT a unas dosis de inyección de 4 mg/kg (16 mg/kg/día) y mayores. Con una carga y una velocidad de infusión de aproximadamente una quinta parte de la dosis de carga cada hora, es probable que se logren unos niveles de estado estacionario en todos los casos.

Ejemplo III. Producción viable desde el punto de vista comercial de una heparina 2-O, 3-O desulfatada que es no anticoagulante e inhibidora para la elastasa de leucocitos humana

15

La heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante puede producirse en cantidades aún mayores, viables desde el punto de vista comercial. La heparina intestinal porcina USP se adquiere de un vendedor comercial fiable, tal como

Scientific Protein Laboratories (SPL), Waukegan, WI. Se disuelve a temperatura ambiente (20 ± 5 °C) para preparar una disolución al 5% (en peso/volumen) en agua desionizada. Como etapa reductora se añade borohidruro de sodio al 1% (en peso/volumen) y se agita durante 2 horas. La disolución entonces se deja en reposo a temperatura ambiente durante 15 horas. El pH de la disolución después se alcaliniza hasta más de 13 mediante la adición de hidróxido de sodio al 50%. La disolución alcalinizada se agita durante 2-3 horas. Esta disolución alcalinizada entonces se carga en bandejas de un liofilizador comercial y se congela enfriando hasta -40 °C. Se aplica el vacío al liofilizador y la disolución congelada se liofiliza hasta la sequedad. El producto liofilizado se disuelve en agua fría (<10 °C) para lograr una disolución al 5%. El pH se ajusta hasta aproximadamente 6,0 mediante la adición lenta de ácido clorhídrico con agitación, teniendo cuidado de evitar que la temperatura de la disolución sea <15 °C. La disolución entonces se dializa con al menos 10 volúmenes de agua o se somete a ultrafiltración para eliminar el exceso de sales y agente reductor. A la disolución dializada se le añade una cantidad de cloruro de sodio al 2% (en peso/volumen). El producto de heparina 2-O, 3-O desulfatada entonces se precipita utilizando un volumen de hisol (etanol desnaturalizado). Después de que la precipitación se decantase durante aproximadamente 16 horas, el sobrenadante se retira con sifón. El precipitado se redissuelve en agua hasta una disolución al 10% (en peso/volumen). El pH se ajusta a 5-6 utilizando ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, y la disolución se filtra a través de una cápsula de filtro de 0,2 μ hacia un recipiente limpio. La disolución filtrada entonces se liofiliza hasta la sequedad. El producto resultante puede prepararse mediante este método con rendimientos de hasta 1,5 kg. El producto final es una heparina 2-O, 3-O desulfatada con un pH de 6,4, una actividad anticoagulante USP de aproximadamente 6 U/mg, y una actividad anticoagulante anti-Xa de 1,9 U/mg. El producto está exento de contaminación microbiana y de endotoxinas, y el contenido en boro medido mediante ICP-AES es <5 ppm. Esta heparina 2-O, 3-O desulfatada se ha ensayado en ratas y perros a dosis tan altas como 160 mg/kg diarios durante hasta 10 días, sin toxicidad sustancial.

La heparina 2-O, 3-O desulfatada resultante es útil para inhibir la actividad enzimática de la elastasa de leucocitos humana. Esto se ensaya mediante los métodos detallados en la patente de EEUU nº 5.668.188, la patente de EEUU nº 5.912.237, y la patente de EEUU nº 6.489.311, incorporadas en la presente como referencia. Brevemente, la inhibición de la elastasa de leucocitos humana (HLE) se midió incubando una cantidad constante de HLE (100 pmol) con una cantidad equimolar de la heparina 2-O, 3-O desulfatada (proporción I/E 1:1) durante 30 minutos a 25 °C en 500 μ l de tampón Hepes (0,125 M, Triton X-100 al 0,125%, pH 7,5) diluido hasta un volumen final de 900 μ l. La actividad enzimática remanente se midió añadiendo 100 μ l de N-Suc-Ala-Ala-Val-nitroanalida 3 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO, preparada en dimetilsulfóxido). La velocidad de cambio en la absorbancia del cromógeno liberado proteolíticamente 4-nitroanilina se controla a 405 nm. El porcentaje de inhibición se calcula basándose en la actividad enzimática sin inhibidor. La heparina 2-O, 3-O desulfatada producida mediante los anteriores métodos inhibe la HLE >90% a una proporción molar de enzima a inhibidor 1:1.

El producto a granel puede formularse en viales de dosis unitaria convenientes de 50 mg/ml. Esto se logra añadiendo heparina 2-O, 3-O desulfatada a agua estéril para inyección USP para preparar una disolución al 6,5% (en peso/peso). Se añade cloruro de sodio y agua estéril para inyección para ajustar la osmolalidad final a 280-300 mOsm, y el pH se ajusta a 7,1-7,3 utilizando ácido clorhídrico 1 N o hidróxido de sodio si es necesario. La disolución se filtra y se traslada a un área de clase 100 de relleno estéril en la que los viales de vidrio de dosis unitaria se rellenan con 21 ml de disolución en cada uno, se sellan, se encañonan y se etiquetan.

40 Ejemplo IV: Prevención de lesiones pulmonares provocadas por la elastasa de leucocitos humana con la heparina 2-O desulfatada

Se evaluó la capacidad de la heparina 2-O, 3-O desulfatada para evitar las lesiones pulmonares mediadas por la elastasa de leucocitos humana (HLE) en hámsters sirios dorados hembra (Harlan Industries, Indianápolis, IN) que pesan de 90 a 110 g. Los hámsteres anestesiados con pentobarbital se inyectaron por vía intratraqueal con 0,25 ml de disolución salina al 0,9% estéril (NS), 0,25 ml de NS que contenía HLE (100 μ g) o 0,25 ml de NS que contenía 500 μ g de heparina (Sigma) o heparina 2-O, 3-O desulfatada según el ejemplo 1, seguido de 0,25 ml de NS con HLE. Los animales se sacrificaron mediante exanguinaciones 24 horas después del tratamiento. La garganta se abre y los pulmones se diseccionan en bloque. La tráquea se canula con tubos de polietileno y se lava con cinco partes alícuotas secuenciales de 3 ml de NS. El fluido de lavado se centrifuga a 200 x g durante 10 minutos. El sedimento celular resultante se resuspende en 1 ml de disolución salina equilibrada de Hank (HBSS) para realizar el recuento celular y el diferencial. El sobrenadante se ensaya para proteínas y hemoglobina como índices de lesión aguda. Los resultados se muestran en las FIGURAS 17-19. Tanto la heparina como la heparina 2-O, 3-O desulfatada son potentes inhibidores de las lesiones inducidas por la elastasa *in vivo*.

La heparina 2-O, 3-O desulfatada del ejemplo I se ensaya para la toxicidad. Otros inhibidores de polisacáridos sulfatados de la elastasa, tales como sulfato de dextrano, producen hemorragias hacia los sacos aéreos pulmonares (hemorragia alveolar) cuando se inyectan en ratas por vía intratraqueal en dosis tan bajas como 0,5 mg/kg. La heparina 2-O, 3-O desulfatada del ejemplo I no produce hemorragia alveolar en ratas incluso en dosis intratraqueales de 10 mg/kg.

La heparina 2-O, 3-O desulfatada del ejemplo I puede utilizarse en seres humanos para tratar las lesiones pulmonares mediadas por elastasa. Como ejemplo, para el tratamiento de un paciente con fibrosis quística, se prepara una dosis que proporciona una proporción 5:1 de inhibidor a proteasa, y se administra como un aerosol. En

un paciente que produce 50 ml de esputo diarios y que produce cantidades medias de elastasa de leucocitos en el esputo, esta dosis puede ser de aproximadamente 25-250 mg de heparina 2-O, 3-O desulfatada administrados mediante un nebulizador a lo largo de 24 horas. Los niveles de elastasa en el esputo de los pacientes pueden controlarse durante el tratamiento. La ventaja de la heparina 2-O, 3-O desulfatada frente a la heparina no modificada para tratar las lesiones pulmonares mediadas por la elastasa humana es que la heparina 2-O, 3-O desulfatada es no anticoagulante y es menos probable que provoque hemorragia pulmonar en pacientes, tales como pacientes con fibrosis quística, que son propensos a toser sangre (hemoptisis). Otra ventaja sustancial de la heparina 2-O, 3-O desulfatada frente a la heparina no modificada es que la heparina 2-O, 3-O desulfatada no reacciona con anticuerpos HIT, por tanto no existe riesgo de trombosis y trombocitopenia inducida por heparina, que pone en peligro la vida.

Ejemplo V: Materiales utilizados en posteriores ejemplos

El cloruro de acetilcolina, el ionóforo de calcio A23187, la nitroprusida de sodio, y la indometacina (Sigma, St. Louis, MO) y U-46619 (Upjohn, Kalamazoo, MI) se emplean en concentraciones determinadas por Sato et al. (véase Sato, H. et al., L-arginine inhibits neutrophil adherence and coronary artery dysfunction, *Cardiovasc. Res.*, 31:63-72, 1996). La sal de sodio de heparina de calidad I-A procedente de la mucosa intestinal porcina (Sigma) se resuspendió con tampón Krebs-Henseliet (K-H) y se administró como una inyección en embolada intravenosa (3 mg/kg a perros). Se sintetizó una heparina no anticoagulante 2-O, 3-O desulfatada (ODS-HEP) según el ejemplo I y según Fryer et al. (véase, Fryer, A. et al., Selective O-desulfation produces nonanticoagulant heparin that retains pharmacologic activity in the lung, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 282:208-219, 1997) a partir de heparina intestinal porcina no fraccionada con 170 USP/mg de actividad anticoagulante y 150 U/mg de actividad anti-Xa. Mientras que 1,0 mg/ml de la heparina no modificada inhibió $91 \pm 2\%$ de la lisis de eritrocitos en plasma canino, la ODS-HEP redujo la lisis de eritrocitos sólo en $4 \pm 2\%$ a 1,0 mg/ml. La ODS-HEP se resuspendió en tampón Krebs-Heinseleit (K-H) y se administró como una inyección en embolada intravenosa (3 mg/kg a perros; 6 mg/kg a ratas, con 100 μ g/ml añadidos al perfusionado de K-H para los corazones aislados).

Ejemplo VI: Realización de estudios de reperfusión isquémica *in vivo*

Procedimiento quirúrgico

Todos los animales se manipularon según the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, publicado por the National Institutes of Health (NIH, nº de publicación 85-23, revisado 1985). The Institutional Animal Care and Use Committees of Emory University y Carolinas Medical Center aprobaron los protocolos del estudio.

Veinticuatro perros adultos de ambos sexos sin dirofilariasis se anestesiaron con pentobarbital sodio (20 mg/kg) y se intubaron de modo endotraqueal. La anestesia se suplementó con citrato de fentanilo (0,3 μ g/kg/min) y diazepam (0,03 μ g/kg/min) administrados por vía intravenosa según fuera necesario para mantener una anestesia profunda. Cada perro se ventiló con un respirador regulado por volumen utilizando el aire ambiental enriquecido en oxígeno. Se insertó una sonda de temperatura rectal para medir la temperatura interna corporal. La arteria y la vena femoral derecha se canularon con catéteres de polietileno para la toma de muestras de sangre arterial y para el acceso intravenoso, respectivamente. Se midieron los gases de la sangre arterial en serie para mantener una tensión de oxígeno arterial mayor que 100 mmHg. Se mantuvo la tensión de dióxido de carbono arterial entre 30 y 40 mmHg, y el pH arterial se mantuvo entre 7,35 y 7,45 mediante el ajuste de la velocidad ventiladora, y se contrarrestó la acidemia con bicarbonato de sodio intravenoso.

Después de una esternotomía media, se formó un lazo con la vena cava superior e inferior mediante cintas umbilicales y el corazón se suspendió utilizando una cuna pericárdica. Se colocaron transductores de presión terminados con un catéter Millar (Millar Instruments, Houston, Texas) en la aorta proximal y en la cavidad ventricular izquierda para medir la presión aórtica y ventricular izquierda, respectivamente. Se insertó un catéter de polietileno en la aurícula izquierda para la inyección de microesferas coloreadas. Una porción de un centímetro de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) distal a la primera rama diagonal se diseccionó y se rodeó con una sutura de seda 2-0 sin apretar. Se colocó un par de cristales ultrasónicos opuestos de modo intramiocárdico dentro del área en riesgo isquémica propuesta dentro de la distribución de la arteria coronaria descendente anterior izquierda, y se emplearon para evaluar la función regional dentro del área en riesgo (véase Jordan, J.E. et al., Adenosine A2 receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary adherence, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 280:301-309, 1997).

Protocolo experimental

Los perros se aleatorizaron en uno de tres grupos (n = 8 en cada grupo): 1) control (disolución salina), 2) heparina no modificada (HEP, 3 mg/kg), y 3) heparina modificada (ODS-HEP, 3 mg/kg). La DAI se ocluyó durante 90 min, produciendo isquemia, y después se liberó durante cuatro horas de reperfusión. Cada agente farmacéutico (disolución salina, HEP, ODS-HEP) se infundió como una inyección en embolada intravenosa 10 minutos antes del inicio de la reperfusión y a los 90 y 180 minutos durante la reperfusión. Se muestrearon los datos cardiodinámicos y hemodinámicos analógicos mediante un ordenador personal utilizando un convertidor de datos analógicos a digitales (Data Translation, Marlboro, MA). Se estableció la media de los datos cardiodinámicos y hemodinámicos

procedentes de no menos de 10 ciclos cardíacos. Se determinó el porcentaje de acortamiento sistólico, el trabajo segmental, y las características de la rigidez segmental mediante análisis de ajuste de curva exponencial, según ha sido descrito previamente por J.E. Jordan *et al.*, *supra*. Se midió el tiempo de coagulación activado (ACT, en segundos) a lo largo del experimento utilizando el sistema de coagulación de sangre completa Hemochron 401 (International Technidyne, Edison, NJ). Se añadió la actividad creatina quinasa de la sangre arterial utilizando un kit de Sigma Diagnostics y se expresó como unidades internacionales por gramo de proteína. El experimento se terminó con una inyección en embolada de pentobarbital sodio intravenosa (100 mg/kg). El corazón se extirpó inmediatamente para posteriores análisis y se colocó en tampón Krebs-Henseleit (K-H) enfriado en hielo que tenía la siguiente composición (mmol/l): NaCl 118, KCl 4,7, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄ 7 H₂O 1,2, CaCl₂ 2 H₂O 2,5, NaHCO₃ 12,5, y glucosa 11, a pH 7,4.

Determinación del área en riesgo, tamaño del infarto y flujo sanguíneo miocárdico regional

Después de la extirpación postexperimental del corazón se determinó el área miocárdica en riesgo y el tamaño del infarto según J.E. Jordan *et al.*, *supra*, utilizando exclusión de pigmentos Unisperse y cloruro de trifeniltetrazolio al 1%, respectivamente. El área en riesgo (AAR) y el tamaño del infarto se calcularon gravimétricamente como ha sido descrito previamente (J.E. Jordan *et al.*, *supra*). Se obtuvo el flujo sanguíneo miocárdico regional en el miocardio no isquémico y con reperfusión isquémica mediante un análisis espectrofotométrico de microesferas coloreadas de liberación de tinte (Triton Technology, San Diego, CA). Se realizaron inyecciones en la aurícula izquierda y toma de muestras sanguíneas de referencia en la línea de base, al final de 90 minutos de isquemia, y a los 15 minutos y 4 horas de reperfusión.

Medición de la acumulación de neutrófilos miocárdica

Se tomaron muestras de tejido de 0,4 g de la zona no isquémica y de las regiones necróticas y no necróticas del área en riesgo para el análisis espectrofotométrico de la actividad mieloperoxidasa (MPO) (δ absorbancia/minuto) para evaluar la acumulación de neutrófilos (PMN) en el miocardio, según se describe en Jordan, J.E. *et al.*, *supra*.

Adherencia de PMN al endotelio de la arteria coronaria postexperimental

Se empleó la adherencia de PMN a las arterias coronarias postexperimental como bioensayo de la función endotelial basal. Se aislaron PMN caninos de sangre arterial y se marcaron de modo fluorescente como se ha descrito previamente (véase Zhao, Z.-Q., Sato, H., Williams, M.W., Fernández, A.Z., Vinten-Johansen, J., Adenosine A₂-receptor activation inhibits neutrophil-mediated injury to coronary endothelium, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 271:H1456-H1464, 1996). Después de la extirpación del corazón, se aislaron segmentos de DAI con reperfusión isquémica y segmentos de DAI circunfleja izquierda (CxI) no isquémicos, se cortaron en segmentos de 3 mm, se abrieron para exponer el endotelio mientras se sumergían en tampón K-H enfriado en hielo, y después se colocaron en placas que contenían tampón K-H a 37 °C. Después de incubar PMN no estimulados y marcados con fluorescencia (6×10^6 células/placa) con los segmentos postexperimentales durante 15 minutos, los segmentos coronarios se lavaron de los PMN no adherentes, se montaron sobre portaobjetos de vidrio, y se contaron los PMN adherentes con microscopía de epifluorescencia (490 nm de excitación, 504 nm de emisión) como se ha descrito previamente (véase Thourani, V.H., Nakamura, N., Durarter, I.G., Bufkin, B.L., Zhao, Z.-Q., Jordan, J.E., Shearer, S.T., Guyton, R.A., Vinten-Johansen, J., Ischemic preconditioning attenuates postischemic coronary artery endothelial dysfunction in a model of minimally invasive direct coronary artery bypass grafting, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 117:838-889, 1999).

Relajación macrovascular estimulada por agonistas

Se estudió la vasorreactividad estimulada por agonistas en macrovasos epicárdicos de zonas isquémicas (DAI) y no isquémicas (CxI) utilizando la técnica de cámaras de órganos (véase Zhao, Z.-Q. *et al.*, *supra*). Se empleó indometacina (10 μ g/ml) para inhibir la liberación de prostaglandinas. Se precontraeraron los anillos coronarios con el mimético de tromboxano A₂ U-46619 (5 nmol/l). La función endotelial se evaluó comparando las respuestas de vasorelajación con concentraciones crecientes de acetilcolina (1-686 μ mol/l) y A23187 (1-191 μ mol/l), mientras que se evaluó la función del músculo liso con nitroprusida de sodio (1-381 μ mol/l).

Ejemplo VII: Realización de estudios de reperfusión isquémica *in vitro*

Desgranulación de los PMN

Se midió la actividad MPO en el sobrenadante como el producto de la desgranulación de PMN caninos utilizando el método de Ely modificado por Jordan, J.E., Thourani, V.H., Auchampach, J.A., Robinson, J.A., Wang, N.-P., Vinten-Johansen, J., A₃ adenosine receptor activation attenuates neutrophil function and neutrophil-mediated reperfusion injury, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 277:H1896-H1905, 1999. Se incubaron PNM caninos (20×10^6 células/ml) en presencia o en ausencia de heparina ODS y se estimularon para que se desgranulasen con el factor activador de plaquetas (PAF, 10 μ mol/l) y citocalasina B (5 μ g/ml). Se ensayó la actividad MPO en los sobrenadantes de modo espectrofotométrico.

Adherencia de PMN al endotelio de la arteria coronaria normal

Se evaluó la adherencia de PMN a arterias epicárdicas caninas normales utilizando segmentos coronarios y PMN de animales normales. Los PMN no estimulados y los segmentos de arteria coronaria preparados y marcados como se ha descrito para los estudios de adherencia se incubaron en presencia o en ausencia de heparina o de heparina ODS. Después de la estimulación con PAF (100 nmol/l) durante 15 min, se contaron los PMN adherentes como se indicó anteriormente.

Experimentos con células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)

Se aislaron HUVEC primarias según el método de Jaffe *et al.* (Jaffe, E.A., Nachmann, R.L., Becker, C.G., Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphological criteria, *J. Clin. Invest.*, 52:2745-2750, 1973), se cultivaron sobre cubreobjetos utilizando medio de crecimiento de células endoteliales (Clonetics) y se ensayaron para la expresión del factor de von Willebrand. Las HUVEC se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en medio de Neuman/Tytell solo durante 24 h, seguido de una incubación con lipopolisacárido (1 µg/ml) más TNF α 10-20 ng/ml durante 2 horas, o en heparina u ODS-HEP (200 µg/ml) durante 4 horas con la adición de lipopolisacárido y TNF α después de 2 horas. Las HUVEC se fijaron durante 20 minutos en hielo con paraformaldehído al 4% en CEB (Tris-HCl 10 mmol/l, pH 7,9, KCl 60 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, ditioneitol 1 mmol/l) con inhibidores de proteasas, PI (Pefabloc 1 mmol/l, antipaína 50 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, bestatina 40 µg/ml, E-64 3 µg/ml, y quimostatina 100 µg/ml), se permeabilizaron durante 2 minutos con NP40 al 0,1% en CEB/PI, se lavaron una vez con CEB frío y se fijaron como se indicó anteriormente durante 10 minutos. Los cubreobjetos se incubaron en H₂O₂ al 3% durante 30 minutos para suprimir la peroxidasa, se lavaron tres veces en PBS frío, se bloquearon durante 2 horas con albúmina de suero bovina (BSA) al 2% en PBS sobre hielo y se incubaron durante la noche a 4 °C con 1 µg/ml de anticuerpo anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluido en BSA al 0,1%/PBS. El anticuerpo anti-p65 no unido se lavó con BSA al 2%/PBS y el anticuerpo unido se incubó con inmunoglobulina anti-conejo de cerdo biotinilada (1:1000) en BSA al 0,1%/PBS durante 45 minutos en hielo, seguido de 3 lavados con BSA al 2%/PBS. Los cubreobjetos entonces se incubaron con estreptavidina-biotina-peroxidasa a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavaron de nuevo, se incubaron con 3,3'-diaminobenzidina al 0,03% en p/v con H₂O₂ al 0,003% hasta que pudo observarse un producto de la reacción marrón, se contratiñeron con eosina y se observaron con microscopía óptica.

También se utilizaron ensayos de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA) para estudiar la translocación de NF- κ B desde el citoplasma hacia el núcleo. Las proteínas nucleares se obtuvieron a partir de HUVEC según describe Digman *et al.* (Digman, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G., Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei, *Nucleic Acid Res.*, 11:1475-1481, 1983) con la adición de los siguientes inhibidores de proteasas: fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mmol/l, pepstatina A 1 µg/ml, quimostatina 0,5 µg/ml, antipaína 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, y aprotinina 4 µg/ml. La sonda de ADN oligonucleotídica bicatenaria (Santa Cruz) de la secuencia consenso de NF- κ B AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC (SEQ ID NO:1) se marcó en el extremo 5'OH con [γ -³²P]ATP utilizando polinucleótido quinasa. Los radionucleótidos libres se retiraron utilizando una columna de Sephadex G-25. La sonda (0,5 ng) se incubó con 10 µg de proteína nuclear de HUVEC (método de Bio-Rad) en 20 µl de tampón que contenía una concentración final de HEPES 10 mmol/l, pH 7,5, KCl 50 mmol/l, MgCl₂ 5 mmol/l, ditioneitol 1 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, y glicerol al 5%, más 5 µg de poli(dI-dC) para reducir la unión no específica. Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las reacciones se sometieron a electroforesis a 14 V/cm durante 1,5-2,0 horas en un gel de poli(acrilamida no desnaturante al 6% en 0,5 x TBE (Tris borato 45 mmol/l, ácido bórico 25 mmol/l, EDTA 1 mmol/l) a 4 °C, y se autorradiografiaron a -80 °C.

Experimentos con corazones de rata perfusionados aislados

Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley macho (300-400 g) con pentobarbital sodio (40 mg/kg, por vía intraperitoneal), y los corazones se extirparon con rapidez y se perfusionaron en un aparato Langendorff como se ha descrito previamente (Watts, J.A., Maiorano, P.C., Trace amounts of albumin protect against ischemia and reperfusion injury in isolated rat hearts, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 31:1653-1662, 1999) con tampón bicarbonato de Krebs-Henseleit (KHB) que consiste en (mmol/l): NaCl 118, KCl 4,7, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄ 7 H₂O 1,2, CaCl₂ 2 H₂O 3,0 (produciendo Ca²⁺ libre 2,5 mmol/l en presencia de EDTA), EDTA 0,5, dextrosa 11, y NaHCO₃ 25. Se estudiaron tres grupos: 1) corazones control no isquémicos se perfusionaron durante 45 minutos; 2) corazones con reperusión isquémica se sometieron a 15 minutos de isquemia global caliente y 15 minutos de reperusión; y 3) corazones con heparina ODS procedentes de ratas inyectadas con heparina ODS 6 mg/mg por vía intravenosa 120 minutos antes de la extirpación del corazón se sometieron a 15 minutos de cada uno de isquemia global y reperusión, con heparina ODS 100 µg/ml en tampón de perfusión. Después de la perfusión, los ventrículos se congelaron con pinzas Wollenberger preenfriadas en N₂ líquido, y se pulverizaron en N₂ líquido. Las proteínas nucleares se aislaron inmediatamente a partir de los polvos miocárdicos congelados mediante el método de Li *et al.* (Li, C., Browder, W., Kao, R., Early activation of transcription factor NF- κ B during ischemia in perfused rat heart, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 276:H543-H552, 1999). Se realizaron los EMSA utilizando 15 µg de proteína nuclear (ensayo de proteínas Pierce) en cada reacción de unión. Se realizaron experimentos de competición mediante la incubación de proteínas nucleares con 10 x NF- κ B no marcado u oligonucleótidos del elemento de respuesta a AMP-cíclico (CRE, AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG (SEQ ID NO:2)) durante 5 minutos antes de la adición de la sonda de NF- κ B marcada con ³²P. Se realizaron ensayos de superdesplazamiento añadiendo 0,5 µg de anticuerpos a los

componentes p65 y p50 de NF- κ B (Santa Cruz) para la reacción de unión después de la sonda marcada. Las reacciones se sometieron a electroforesis a 100 V durante 2 horas a temperatura ambiente sobre un gel de policarilamida no desnaturante al 5% en 0,5 x TGE (glicina 120 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, Tris 2,5 mmol/l, pH 8,5) y se autorradiografiaron.

5 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con un análisis de una vía de la varianza o análisis de dos vías de la varianza de mediciones repetidas para análisis de grupo, tiempo e interacciones grupo-tiempo. Si se encuentran interacciones significativas se aplicaron ensayos de múltiples comparaciones post hoc de Student-Newman-Keuls o de Tukey para localizar la fuente de las diferencias. Las diferencias en las densidades de la banda del gel que contenía p65 de NF- κ B entre los corazones de rata con reperfusión isquémica tratados y no tratados se compararon utilizando el ensayo de la *t*. Un $p < 0,05$ se consideró significativo, y los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM).

Ejemplo VIII: La heparina 2-O desulfatada reduce el tamaño del infarto

Utilizando los procedimientos descritos anteriormente, la heparina y la heparina 2-O, 3-O desulfatada reducen significativamente el tamaño del infarto de miocardio. Tal como se muestra en la FIGURA 20, el área en riesgo (AAR) se expresa como el porcentaje del ventrículo izquierdo (VI) en riesgo de infarto. El tamaño del infarto (área de necrosis, AN) se expresa como porcentaje del área en riesgo (AAR). * $p < 0,05$ frente al control. El tratamiento con heparina (HEP) o heparina 2-O, 3-O desulfatada (ODS-HEP) disminuye el tamaño del infarto (área de necrosis, AN), expresado como un porcentaje de área en riesgo (AN/AAR) de 35% y 38%, respectivamente, comparado con los controles. No hubo diferencia estadística en el tamaño de los infartos entre los grupos HEP y ODS-HEP, y el área en riesgo debido a la oclusión de DAI, expresada como porcentaje de masa del ventrículo izquierdo (AAR/VI) fue comparable entre los grupos.

Tal como se muestra en la FIGURA 21, se empleó la actividad de la creatina quinasa plasmática (CK) para confirmar la medición histológica del tamaño del infarto durante el transcurso del experimento. * $p < 0,05$ HEP y OPSHEP frente al control. No hubo diferencias significativas en la actividad CK plasmática en la línea de base entre los grupos y no se produjeron aumentos en la actividad CK después de la isquemia regional. Los corazones en el grupo control mostraron un aumento pronunciado en la actividad CK dentro de la primera hora de la reperfusión, que fue reducida significativamente por el tratamiento con HEP u ODS-HEP, lo cual es coherente con los tamaños de infarto más pequeños en estos grupos (CK después de 4 horas de reperfusión = $43,4 \pm 3,7$ para el control; $27,6 \pm 5,3$ para HEP; y $21,9 \pm 4,0$ unidades internacionales/g de proteína para ODS-HEP).

A pesar de sus efectos favorables sobre el tamaño del infarto, HEP y ODS-HEP no produjeron cambios significativos en el flujo de sangre miocárdica. El flujo de sangre subendocárdica en la región de la arteria coronaria DAI con reperfusión isquémica era estadísticamente comparable entre los tres grupos en la línea de base. El flujo sanguíneo miocárdico regional se estudió en el área en riesgo (AAR) que está en la distribución de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) con reperfusión isquémica. Tampoco hubo diferencias en el flujo sanguíneo miocárdico regional en la distribución de la arteria coronaria circunfleja izquierda (CxI) sin reperfusión isquémica. El flujo sanguíneo transmural en el área en riesgo disminuyó significativamente durante la isquemia, no habiendo diferencias entre los grupos. Todos los grupos mostraron una respuesta hiperémica comparable en el área en riesgo a los 15 minutos de la reperfusión, tras lo cual el flujo sanguíneo disminuyó hasta niveles similares en todos los grupos en cuatro horas. En la región de la arteria coronaria CxI sin reperfusión isquémica, el flujo sanguíneo transmural es comparable en todos los grupos a lo largo del protocolo.

Además, las diferencias en el tamaño del infarto no procedían de diferencias hemodinámicas o cardiodinámicas. Las hemodinámicas en la línea de base y durante la isquemia y reperfusión son comparables entre los grupos (los datos no se muestran). La frecuencia cardíaca aumentó significativamente durante la isquemia y reperfusión en todos los animales, y la presión diastólica final ventricular a la par era elevada durante la isquemia en todos los grupos. Tras la isquemia, los corazones en todos los grupos mostraron disquinesia en el área en riesgo. Todos los corazones mostraron una mala recuperación del porcentaje de acortamiento sistólico a lo largo de las cuatro horas de reperfusión ($-6 \pm 2\%$ para los corazones control; $-7 \pm 3\%$ para los corazones tratados con HEP; y $-6 \pm 4\%$ para los corazones tratados con ODS-HEP a las 4 horas de reperfusión), y la rigidez diastólica (medida mediante el coeficiente β sin valor) aumentó tras la isquemia hasta niveles comparables en todos los grupos (desde $0,2 \pm 0,05$ en la línea de base hasta $0,7 \pm 0,1$ unidades después de 4 horas de reperfusión en los corazones control; desde $0,2 \pm 0,04$ en la línea de base hasta $1,0 \pm 0,2$ unidades después de 4 horas de reperfusión en los corazones tratados con HEP; y desde $0,2 \pm 0,04$ en la línea de base hasta $0,5 \pm 0,2$ unidades después de 4 horas de reperfusión en los corazones tratados con ODS-HEP).

Ejemplo IX: La heparina y la heparina 2-O, 3-O desulfatada reducen la acumulación de PMN en el miocardio reperfusionado

Utilizando los procedimientos descritos anteriormente, se descubrió que la heparina y la heparina 2-O, 3-O desulfatada reducen la acumulación de PMN en el miocardio reperfusionado. La entrada de PMN es un mecanismo

muy importante subyacente a las lesiones por reperfusión letales. El tratamiento con HEP u ODS-HEP reduce significativamente la actividad mieloperoxidasa (MPO) en el miocardio necrótico en 50%, comparado con el grupo control, tal como se muestra en la FIGURA 22. En la FIGURA 22 se muestra la actividad mieloperoxidasa, un índice de la acumulación de PMN, en muestras de tejido normal isquémico y de tejido miocárdico necrótico de cada grupo. *p < 0,05 HEP y ODS-HEP frente al control. La acumulación de PMN dentro del miocardio normal era baja y comparable entre los grupos control, HEP y ODS-HEP (16 ± 8, 18 ± 11, y 18 ± 8 unidades de absorbancia δ/minuto, respectivamente). HEP y ODS-HEP disminuyeron la actividad MPO en el área no necrótica en riesgo, pero estos cambios no alcanzaron significancia (p > 0,10).

Ejemplo X: La heparina 2-O, 3-O desulfatada no produce anticoagulación

10 A pesar de reducir el tamaño del infarto, la ODS-HEP no produjo anticoagulación. Tal como se muestra en la FIGURA 23, se estudió la anticoagulación de sangre completa sistémica utilizando el tiempo de coagulación activado, medido en segundos. *p < 0,05 HEP frente a otros grupos. A las cuatro horas de reperfusión, el tiempo de coagulación activado (ACT) aumentó en más de 10 veces después del tratamiento con HEP, comparado con el control (1425 ± 38 segundos frente a 123 ± 10 segundos, respectivamente). Por contraste, el ACT en el grupo de ODS-HEP (145 ± 10 segundos) no era diferente de los controles (123 ± 10 segundos, p = 0,768). Por tanto, la ODS-HEP fue capaz de lograr los mismos beneficios que HEP sin anticoagulación.

Ejemplo XI: La heparina y la heparina 2-O, 3-O desulfatada reducen la adherencia de neutrófilos y la disfunción endotelial en arterias coronarias

20 Este ejemplo demuestra que la heparina y la heparina 2-O, 3-O desulfatada reducen los neutrófilos y la disfunción endotelial en arterias coronarias. La ODS-HEP no reduce significativamente la desgranulación de PMN estimulada por PAF, lo cual sugiere que la ODS-HEP tiene poco efecto directo sobre la actividad de PMN. Sin embargo, la adherencia de PMN estimulada por PAF al endotelio coronario fue significativamente reducida por HEP y ODS-HEP de una manera dependiente de la dosis (FIGURA 24). La adherencia de neutrófilos al endotelio coronario normal fue estimulada por el factor activador de plaquetas (PAF) 100 nM añadido al medio, y fue inhibida de una manera dependiente de la dosis por HEP u ODS-HEP. *p < 0,05 grupo HEP frente al control de HEP, @p < 0,05 grupo HEP frente a 0 mg del grupo HEP, +p < 0,05 ODS-HEP frente al control de ODS, y #p < 0,05 ODS-HEP frente a 0 mg del grupo ODS. La inhibición de la adherencia de PMN al endotelio coronario estimulado con PAF es dependiente de la carga, tal como sugiere la reversión de los efectos inhibidores de los polianiones HEP u ODS-HEP tras la unión por el polícatión protamina (PMN/mm² de endotelio = 66 ± 3 con HEP 100 µg/ml frente a 180 ± 8 con HEP + protamina 1 mg/ml; 86 ± 4 con ODS-HEP 100 µg/ml frente a 136 ± 4 con ODS-HEP + protamina 1 mg/ml; p < 0,05 para ambos).

35 La HEP y la ODS-HEP también redujeron la adherencia de PMN al endotelio coronario con reperfusión isquémica *in vivo*. La gráfica de barras de la FIGURA 25 demuestra que la adherencia de PMN a la arteria coronaria DAI con reperfusión isquémica aumentó en 300% en el grupo control no tratado comparado con la arteria CxI sin reperfusión isquémica. La adherencia de neutrófilos (PMN) al endotelio coronario se cuantificó como el número de PMN adherentes/mm² de endotelio coronario. CxI = arteria coronaria circunfleja izquierda sin reperfusión isquémica, DAI = arteria coronaria descendente anterior izquierda con reperfusión isquémica. *p < 0,05 HEP y ODS-HEP frente al control de DAI. La HEP o la ODS-HEP reducen la adherencia de PMN a la DAI con reperfusión isquémica en 51% y 42%, respectivamente, comparado con los controles sin tratar (FIGURA 25).

40 La HEP y la ODS-HEP también mantuvieron las respuestas vasodilatadoras mediadas por receptores del endotelio coronario después de isquemia y reperfusión. Para cuantificar la disfunción endotelial estimulada con agonistas en las arterias coronarias epicárdicas, se estudió la respuesta vascular a concentraciones crecientes de los vasodilatadores acetilcolina (dependiente del endotelio; dependiente de receptores), A23187 (dependiente del endotelio; independiente de receptores), y nitroprusida de sodio (dirigido a músculo liso) en preparaciones de anillos vasculares coronarios postisquémicos.

45 La FIGURA 26 ilustra las respuestas vasodilatadoras a la acetilcolina en anillos coronarios aislados procedentes de DAI con reperfusión isquémica, expresadas como porcentaje de precontracción inducida por U46619. En el grupo control, hay un desplazamiento estadísticamente significativo hacia la derecha en la curva de concentración-respuesta, lo que representa una menor relajación frente a la acetilcolina. Por contraste, el efecto relajante de los vasos coronarios frente a la acetilcolina fue conservado por un tratamiento con HEP u ODS-HEP. Se muestran curvas de respuesta a concentraciones crecientes de acetilcolina (Acl) en la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) con reperfusión isquémica precontraída con U46619. *p < 0,05 HEP y ODS-HEP frente al control, y *p < 0,05 HEP frente al control.

55 La concentración de acetilcolina requerida para lograr 50% de relajación (CE₅₀; -log[M]) fue significativamente mayor para el control (-6,98 ± 0,06) comparado con los grupos HEP (-7,30 ± 0,06) o ODS-HEP (-7,20 ± 0,05) (p < 0,05). No hubo diferencias en las preparaciones de anillos sin reperfusión isquémica procedentes de CxI. Además, no hubo diferencias en las respuestas vasodilatadoras entre DAI y CxI a concentraciones crecientes de A23187 (relajación máxima = 122 ± 4, y 120 ± 7%, y CE₅₀ log [M] = -7,18 ± 0,06 y -7,17 ± 0,09 para DAI y CxI, respectivamente) o de nitroprusida de sodio (relajación máxima 129 ± 5 y 121 ± 4%, y CE₅₀ log[M] = -7,31 ± 0,02 y -7,29 ± 0,04 para DAI y CxI, respectivamente), y las respuestas no se vieron afectadas por HEP ni ODS-HEP.

Ejemplo XII: La heparina 2-O, 3-O desulfatada evita la activación del factor nuclear- κ B

Este ejemplo demuestra que la heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante evita la activación del factor nuclear- κ B. Este factor de la transcripción, que regula la expresión de una multitud de citoquinas proinflamatorias, reside en el citoplasma en células no estimuladas, pero migra hacia el núcleo cuando se activa, y allí se une a su secuencia consenso reguladora y favorece la expresión de citoquinas. El NF- κ B es mantenido en el compartimento citosólico de las células por su inhibidor, I κ B, al cual está unido físicamente. El NF- κ B es citosólico cuando forma complejo con su inhibidor, I κ B, pero se activa mediante fosforilación, ubiquitinación y degradación proteolítica de I κ B. La liberación del I κ B expone la secuencia de localización nuclear (NLF) de NF- κ B, un dominio muy catiónico de ocho aminoácidos (VQRDRQKLM, código de una letra de aminoácidos) que dirige la translocación nuclear. El NF- κ B es activado en el corazón por isquemia o por isquemia y reperfusión (véase Li, C. *et al.*, *supra*). La translocación nuclear del NF- κ B es evitada por péptidos permeables a células sintéticos que contienen el NLF de NF- κ B, que compite por la captación nuclear (véase Lin, Y.-Z., Yao, S.Y., Veach, R.A., Torgerson, T.R., Hawiger, J., Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence, *J. Biol. Chem.*, 270:14255-14258, 1995). La heparina se une con facilidad y es internalizada en el compartimento citosólico por células mesangiales del músculo liso de vías respiratorias, vasculares y endoteliales, e incluso por miocitos cardíacos. Cuando se internaliza en el citoplasma, se postula que el polianión heparina puede unirse electrostáticamente a los aminoácidos con carga positiva del NLF y evita que dirija al NF- κ B hacia el poro nuclear.

El aumento en la adherencia de PMN tras una reperfusión isquémica se produce por la expresión potenciada de moléculas de adhesión de células endoteliales, cuya transcripción se ve fuertemente influida por la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B como consecuencia de una reperfusión isquémica miocárdica (véase Li, C. *et al.*, *supra*). Para estudiar si la heparina puede inhibir la activación del NF- κ B, se realizó una tinción inmunohistoquímica para NF- κ B en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), con y sin estimulación o pretratamiento con ODS-HEP. La FIGURA 28A demuestra que en el estado no estimulado, el factor nuclear- κ B (NF- κ B, teñido de marrón) normalmente sólo está presente en el citoplasma de HUVEC, pero no en los núcleos. En HUVEC estimuladas con el factor de necrosis tumoral α (TNF α) sin la adición de heparina, los núcleos muestran tinción positiva (marrón) para el componente p65 del NF- κ B (FIGURA 28A), que se corresponde con la translocación del NF- κ B desde el citoplasma hacia el núcleo. Sin embargo, en HUVEC pretratadas con heparina 2-O, 3-O desulfatada 200 μ g/ml, la estimulación con TNF α no produce la translocación del NF- κ B desde el citoplasma hacia el núcleo (FIGURA 28C).

La interrupción de la activación de NF- κ B endotelial por la heparina y la heparina 2-O, 3-O desulfatada se confirmó mediante ensayos de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA), tal como se muestra en la FIGURA 29. El factor de necrosis tumoral (TNF) estimula la unión al ADN endotelial de NF- κ B (FIGURA 20, carril 2) comparado con los controles no tratados (carril 1). Un pretratamiento con ODS-HEP 200 μ g/ml elimina la actividad de unión de NF- κ B (carril 3), lo cual indica que la ODS-HEP evita la activación de NF- κ B. Las HUVEC fueron estimuladas con TNF α 10 ng/ml durante una hora, y la proteína nuclear se recogió para los ensayos de desplazamiento de la movilidad electroforética para detectar la unión de NF- κ B, utilizando el oligonucleótido consenso AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC (SEQ ID NO:1), marcado en su extremo con [γ - 32 P]ATP. El tratamiento de monocapas con TNF estimula la unión a ADN del NF- κ B (carril 2) comparado con los controles no tratados (carril 1). El pretratamiento de células con ODS-HEP 200 μ g/ml prácticamente elimina la actividad de unión de NF- κ B en extractos de proteínas nucleares (carril 3), lo cual confirma que la heparina 2-O, 3-O desulfatada evita la translocación del NF- κ B desde el citoplasma hacia el núcleo.

La heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante también reduce la unión al ADN del NF- κ B en miocardio con reperfusión isquémica. La exposición de corazones de rata a 15 minutos de isquemia global caliente y 15 minutos de reperfusión aumenta la unión al ADN de proteínas nucleares miocárdicas a las secuencias oligonucleotídicas para NF- κ B (FIGURA 29A, carril 2). Se observaron tres bandas diferenciadas de mayor unión al ADN, todas las cuales fueron eliminadas mediante la adición de un exceso de sondas oligonucleotídicas de NF- κ B no marcadas. Los experimentos de superdesplazamiento identificaron al complejo I como la banda que contenía el componente p65 del NF- κ B (FIGURA 29, carril 5). Un tratamiento con ODS-HEP reduce la estimulación relacionada con reperfusión isquémica de la unión del NF- κ B al ADN en las tres bandas (FIGURA 29, carril 3). La unión al ADN del complejo I que contiene p65 fue casi eliminada por ODS-HEP, con una reducción del $54 \pm 6\%$ medida mediante densitometría en comparación con el complejo I de corazones de rata con reperfusión isquémica no tratados ($p < 0,05$, $n = 4$). Por tanto, además de atenuar directamente la adherencia vascular de PMN al endotelio coronario, de disminuir la acumulación de PMN en el área en riesgo, y de reducir la necrosis miocárdica, la HEP o la ODS-HEP también interrumpen la activación de NF- κ B y puede que la expresión de citoquinas miocárdicas y moléculas de adhesión.

Corazones de rata perfusionados con Langendorf se sometieron a 15 min de isquemia global caliente, seguida de 15 min de reperfusión. Entonces se recogieron las proteínas nucleares para EMSA para medir la unión al ADN de NF- κ B. Comparado con corazones control perfusionados simulados (FIGURA 29A, carril 1), la isquemia y la reperfusión generalmente aumentan la unión al ADN de proteínas nucleares miocárdicas a las secuencias oligonucleotídicas

para NF- κ B (carriles 2 y 4). Se identificaron tres complejos diferenciados. Los experimentos de superdesplazamiento realizados con un anticuerpo contra p65 (carril 5), un anticuerpo contra p50 (carril 6) o ambos anticuerpos (carril 7) demuestran que el complejo I se desplaza (flecha), identificándolo como la banda que contiene el componente p65 del NF- κ B. Un pretratamiento y una perfusión con ODS-HEP (6 mg/kg por vía intravenosa 2 horas antes de la perfusión del corazón; 100 μ g/ml en el perfusionado) evita la estimulación relacionada con la reperfusión isquémica de la unión al ADN de NF- κ B del complejo I que contiene p65 (carril 3). La unión al ADN del complejo I que contiene p65 fue casi eliminada por ODS-HEP, con una reducción del $54 \pm 6\%$ medida mediante densitometría en comparación con el complejo I de corazones de rata con reperfusión isquémica no tratados ($p < 0,05$, $n = 4$). A la derecha de la FIGURA 29B se muestra un experimento de competición en el que las proteínas nucleares se incubaron con 10 x NF- κ B no marcado (carril 2) u oligonucleótidos del elemento de respuesta al AMP-cíclico (CRE, AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG (SEQ ID NO:2), carril 3) durante 5 minutos antes de la adición de la sonda de NF- κ B marcada. Comparado con las reacciones de unión sin un exceso de sonda (carril 1), la adición de NF- κ B no marcado bloquea la unión al ADN en los tres complejos.

15 Ejemplo XIII: Reducción de la disfunción contráctil tras isquemia y reperfusión de corazones de rata aislados por la heparina 2-O, 3-O desulfatada

Este ejemplo demuestra que la heparina 2-O, 3-O desulfatada reduce la disfunción contráctil tras la isquemia y reperfusión de corazones de rata aislados. Después de 15 minutos de isquemia y reperfusión, los corazones recuperaron una alta función contráctil (95% de la línea de base, isquemia-reperfusión; y 93% de la línea de base, ODS-HEP, isquemia-reperfusión). Por tanto, en otros estudios, el periodo de isquemia aumentó hasta 30 minutos. Tanto los corazones no tratados como los corazones tratados con ODS-HEP tenían menores funciones contráctiles después de 30 minutos de isquemia y 15 minutos de reperfusión (producto del cambio de presión = 36.780 ± 2.589 para la simulación frente a 4.575 ± 1.856 para los corazones con reperfusión isquémica, y 10.965 ± 2.908 mmHg/min para los corazones con reperfusión isquémica tratados con ODS-HEP, $n = 4$ cada uno), pero los corazones tratados con ODS-HEP mostraron una recuperación significativamente mejorada de la función contráctil, que fue 2,4 veces mejor que la observada en corazones que no recibieron ODS-HEP ($p < 0,05$). Por tanto, en este modelo severo, la ODS-HEP reduce las consecuencias moleculares y fisiológicas de la isquemia y reperfusión.

La heparina modificada como se indica en la presente para que sea una heparina 2-O, 3-O desulfatada puede proporcionar muchos beneficios antiinflamatorios con la ventaja de no provocar el síndrome de trombocitopenia inducido por heparina HIT-2 que a menudo viene acompañado de una enfermedad trombótica que pone en peligro la vida del paciente.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <100> Paringenix, Inc.
Kennedy, Thomas P.
Walenga, Jeanine, M.
- 5 <120> MÉTODO Y MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO CON POLISACÁRIDOS SULFATADOS DEL SÍNDROME DE LA TROMBOCITOPENIA INDUCIDA POR HEPARINA (HIT)
- <130> 046107/297490
- <150> 10/974.566
- <151> 27-10-2004
- 10 <160> 2
- <170> FastSEQ para Windows, versión 4.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> ADN
- 15 <213> *Mus musculus*
- <400> 1
- agttgagggg acttcccag gc
- 22
- <210> 2
- 20 <211> 27
- <212> ADN
- <213> *Rattus* sp.
- <400> 2
- 25 agagattgcc tgacgtcaga gagctag
- 27

REIVINDICACIONES

- 1.- Un medicamento que comprende una heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante, en el que dicha heparina desulfatada no induce la activación plaquetaria en presencia de anticuerpos dirigidos contra el complejo de heparina-factor plaquetario 4, para su uso para tratar el síndrome de trombocitopenia inducida por heparina en un paciente.
- 5 2.- El medicamento para su uso según la reivindicación 1, en el que dicha heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante tiene un grado medio de sulfatación de aproximadamente 0,6 grupos sulfato por monosacárido o mayor, y un peso molecular medio de 2,4 kD o mayor.
- 3.- El medicamento para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho medicamento es para la administración mediante un método seleccionado del grupo que consiste en la vía intravenosa, subcutánea, por inhalación, oral y rectal.
- 10 4.- El medicamento para su uso según la reivindicación 1, en el que la heparina 2-O, 3-O desulfatada se prepara mediante el proceso que comprende alcalinizar una disolución que contiene heparina hasta un pH 13 o mayor.
- 5.- El medicamento para su uso según la reivindicación 1, que comprende la administración de 3 mg/kg a 100 mg/kg de la heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante.
- 15 6.- Un medicamento que comprende una heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante, en el que dicha heparina desulfatada no induce la activación plaquetaria en presencia de anticuerpos dirigidos contra el complejo de heparina-factor plaquetario 4, para su uso para mejorar el síndrome de trombocitopenia inducida por heparina.
- 7.- El medicamento para su uso según la reivindicación 6, en el que dicha heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante tiene un grado medio de sulfatación de aproximadamente 0,6 grupos sulfato por monosacárido o mayor, y un peso molecular medio de 2,4 kD o mayor.
- 20 8.- El medicamento para su uso según la reivindicación 6, en el que dicho medicamento es para la administración mediante un método seleccionado del grupo que consiste en la vía intravenosa, subcutánea, por inhalación, oral y rectal.
- 9.- El medicamento para su uso según la reivindicación 6, en el que la heparina 2-O, 3-O desulfatada se prepara mediante el proceso que comprende alcalinizar una disolución que contiene heparina hasta un pH 13 o mayor.
- 25 10.- El medicamento para su uso según la reivindicación 6, que comprende la administración de 3 mg/kg a 100 mg/kg de la heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante.
- 11.- Un medicamento que comprende una heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante, en el que dicha heparina desulfatada no induce la activación plaquetaria en presencia de anticuerpos dirigidos contra el complejo de heparina-factor plaquetario 4, para su uso para prevenir el síndrome de trombocitopenia inducida por heparina.
- 30 12.- El medicamento para su uso según la reivindicación 11, en el que dicha heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante tiene un grado medio de sulfatación de aproximadamente 0,6 grupos sulfato por monosacárido o mayor, y un peso molecular medio de 2,4 kD o mayor.
- 13.- El medicamento para su uso según la reivindicación 11, en el que dicho medicamento es para la administración mediante un método seleccionado del grupo que consiste en la vía intravenosa, subcutánea, por inhalación, oral y rectal.
- 35 14.- El medicamento para su uso según la reivindicación 11, en el que la heparina 2-O, 3-O desulfatada se prepara mediante el proceso que comprende alcalinizar una disolución que contiene heparina hasta un pH 13 o mayor.
- 15.- El medicamento para su uso según la reivindicación 11, que comprende la administración de 3 mg/kg a 100 mg/kg de la heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante.
- 40 16.- Un medicamento que comprende una heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante, en el que dicha heparina desulfatada no induce la activación plaquetaria en presencia de anticuerpos dirigidos contra el complejo de heparina-factor plaquetario 4, y un fármaco seleccionado del grupo que consiste en fármacos anti-trombina, fármacos antiplaquetas y fármacos antiinflamatorios, para su uso en combinación para tratar el síndrome de trombocitopenia inducida por heparina en un paciente.
- 45 17.- El medicamento y el fármaco para su uso según la reivindicación 16, en el que dicha heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante tiene un grado medio de sulfatación de aproximadamente 0,6 grupos sulfato por monosacárido o mayor, y un peso molecular medio de 2,4 kD o mayor.
- 18.- El medicamento y el fármaco para su uso según la reivindicación 16, en el que dicho medicamento y fármaco son para la administración mediante un método seleccionado del grupo que consiste en la vía intravenosa, subcutánea, por inhalación, oral y rectal.
- 50

19.- El medicamento y el fármaco para su uso según la reivindicación 16, en el que la heparina 2-O, 3-O desulfatada se prepara mediante el proceso que comprende alcalinizar una disolución que contiene heparina hasta un pH 13 o mayor.

5 20.- El medicamento y el fármaco para su uso según la reivindicación 16, que comprende la administración de 3 mg/kg a 100 mg/kg de la heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante.

21.- El uso de una heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante, en el que la heparina no induce la activación plaquetaria en presencia de anticuerpos dirigidos contra el complejo de heparina-factor plaquetario 4, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el síndrome de trombocitopenia inducida por heparina en un paciente.

10 22.- El uso según la reivindicación 21, en el que la heparina 2-O, 3-O desulfatada se prepara mediante el proceso que comprende alcalinizar una disolución que contiene heparina hasta un pH 13 o mayor.

23.- El uso según la reivindicación 22, en el que dicha heparina 2-O, 3-O desulfatada no anticoagulante tiene un grado medio de sulfatación de 0,6 grupos sulfato por monosacárido o mayor, y un peso molecular medio de 2,4 kD o mayor, y un vehículo fisiológicamente aceptable.

15

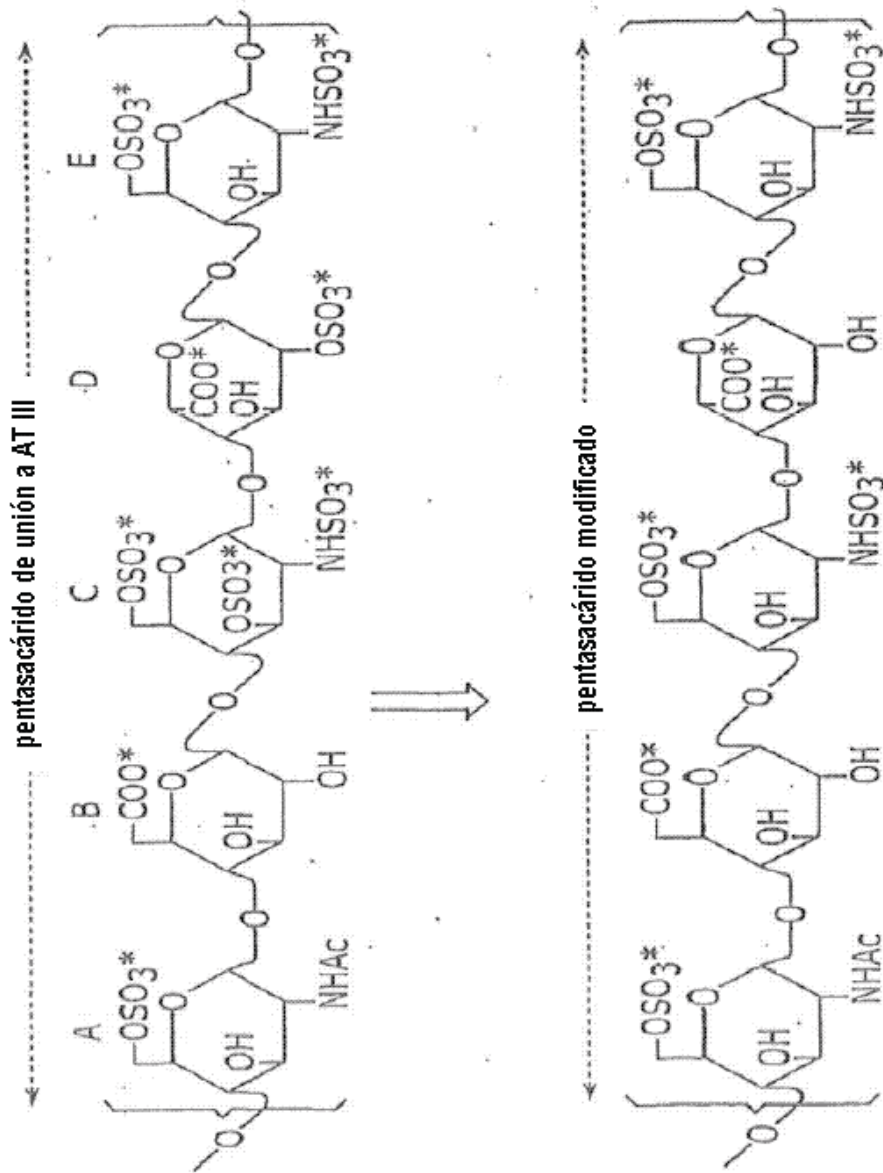


FIG. 1

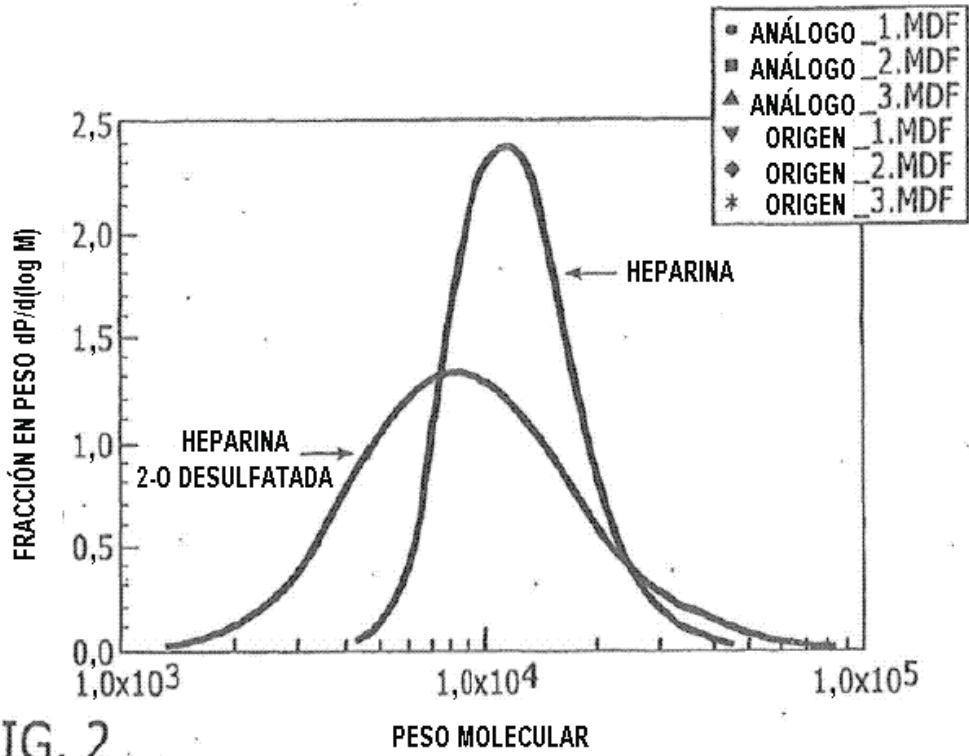


FIG. 2

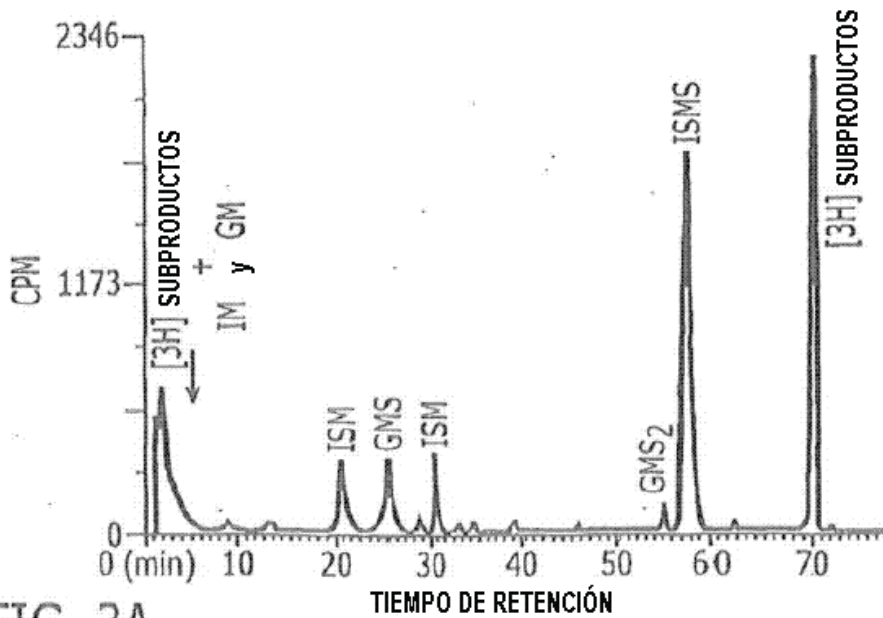


FIG. 3A

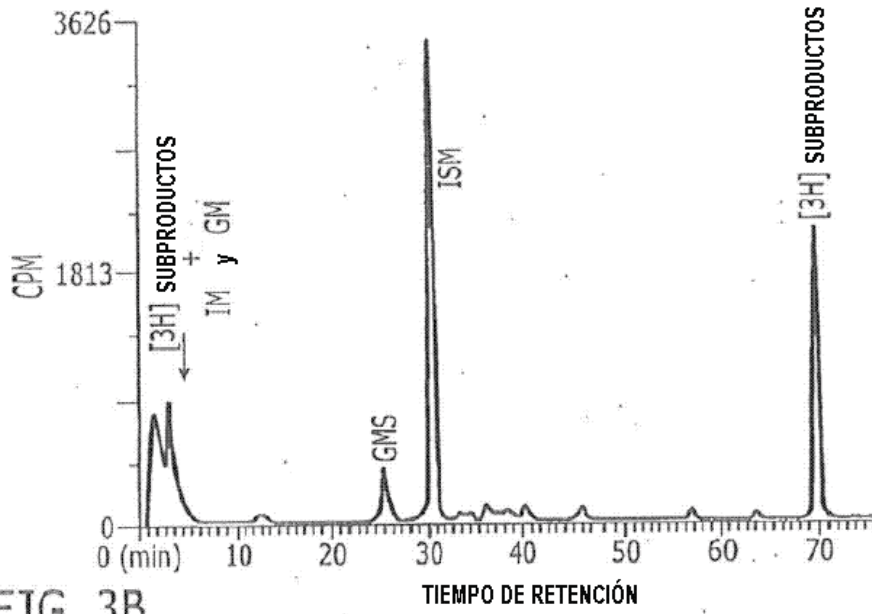


FIG. 3B

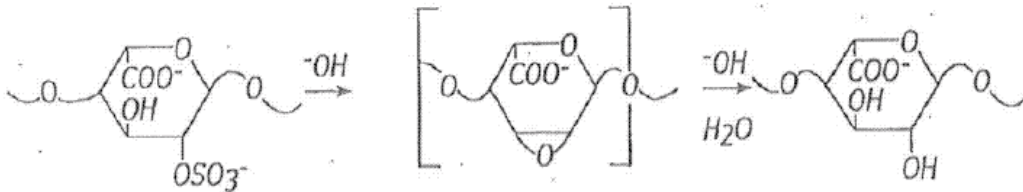


FIG. 4

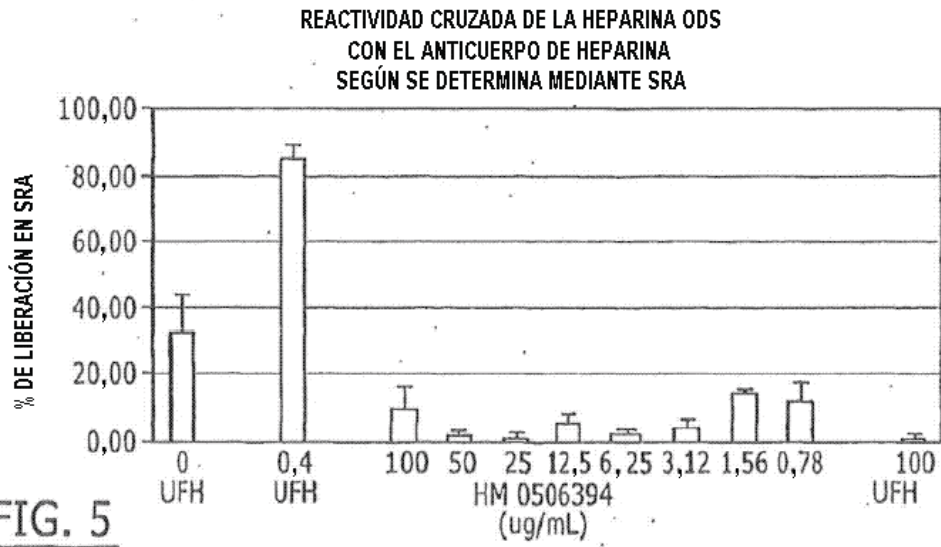


FIG. 5

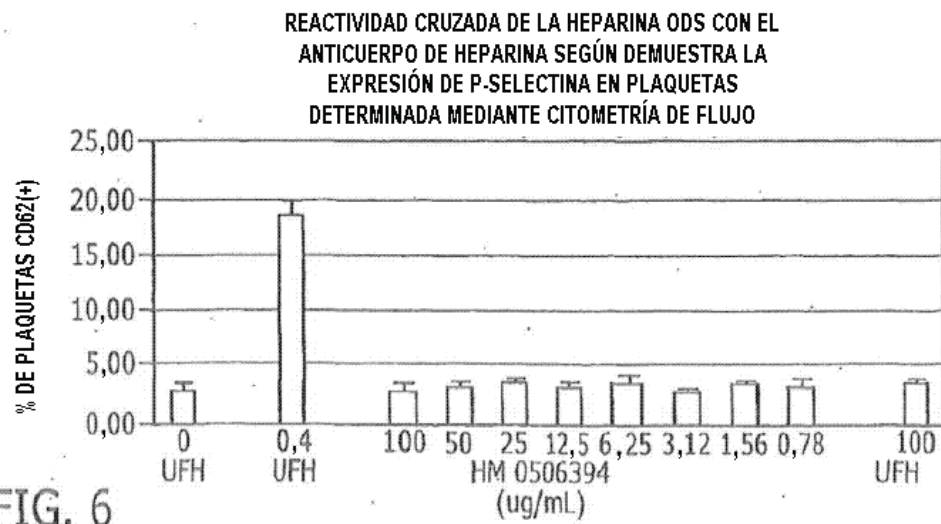


FIG. 6

MEJORÍA DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA INDUCIDA POR ANTICUERPO HIT/HEPARINA SEGÚN SE DEMUESTRA MEDIANTE SRA: SUERO HIT-1; DONANTE D

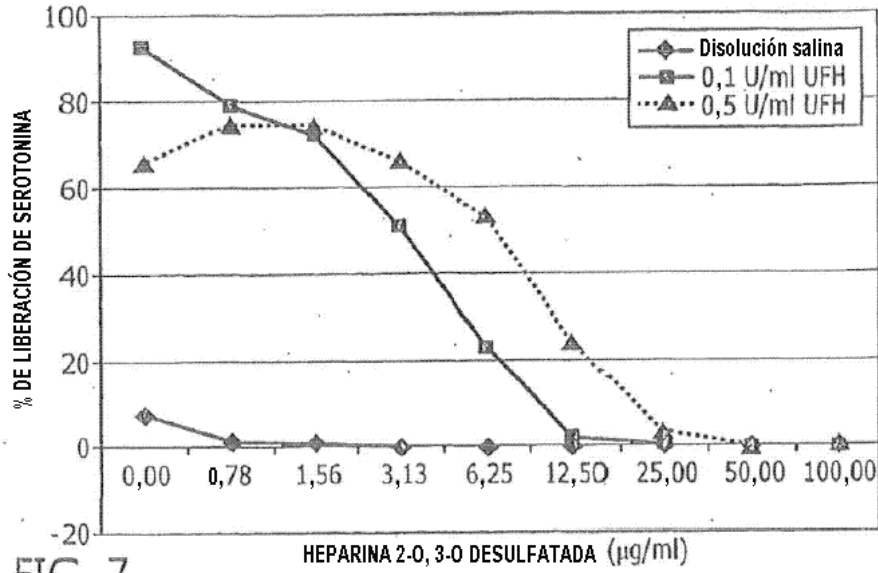


FIG. 7

MEJORÍA DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA INDUCIDA POR ANTICUERPO HIT/HEPARINA (0.1 U/ml UFH) SEGÚN SE DEMUESTRA MEDIANTE SRA

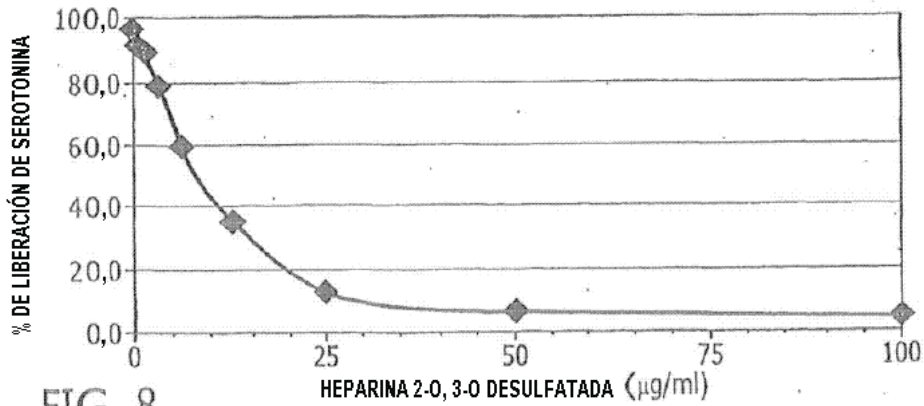


FIG. 8

MEJORÍA DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA INDUCIDA POR ANTICUERPOS HIT/HEPARINA (0,5 U/ml UFH) SEGÚN SE DEMUESTRA MEDIANTE SRA

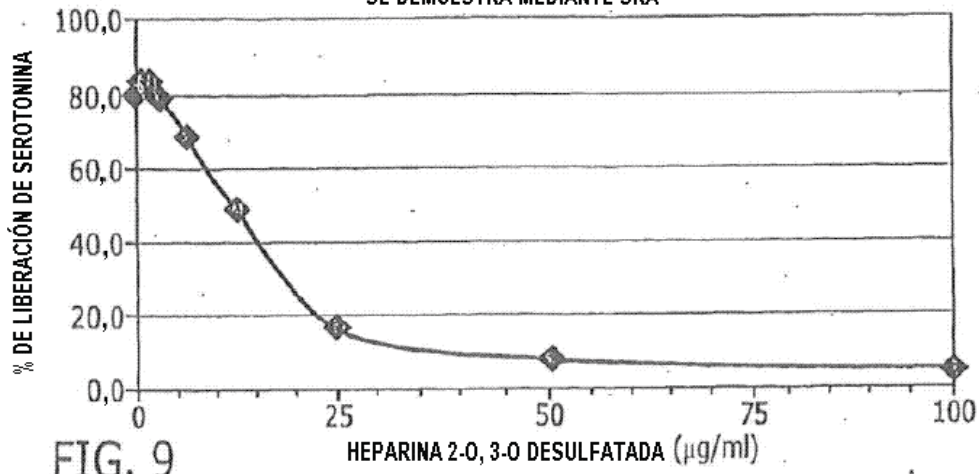


FIG. 9

MEJORÍA DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA INDUCIDA POR ANTICUERPOS HIT/HEPARINA SEGÚN SE DEMUESTRA MEDIANTE EL ANÁLISIS CITOMÉTRICO DE FLUJO DE LA FORMACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE PLAQUETAS

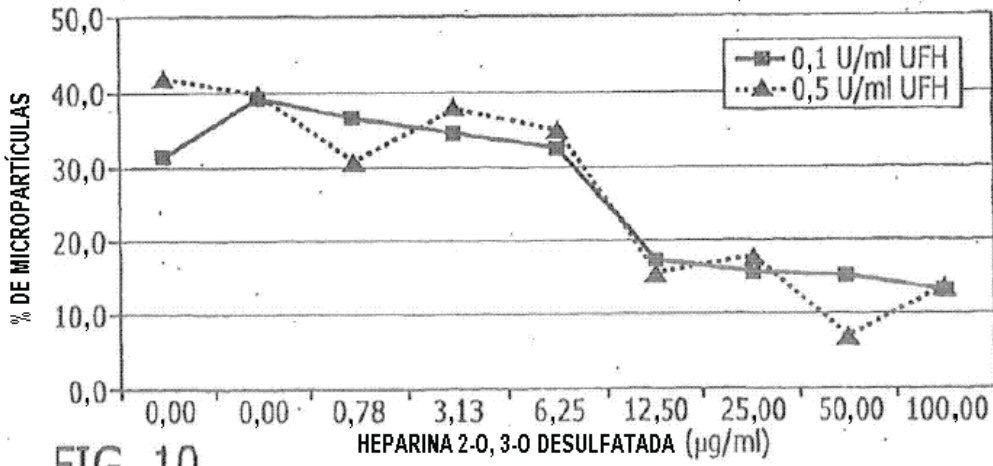


FIG. 10

MEJORÍA DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA INDUCIDA POR ANTICUERPOS HIT/HEPARINA (0,1 u/ml) SEGÚN SE DEMUESTRA MEDIANTE LA FORMACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE PLAQUETAS

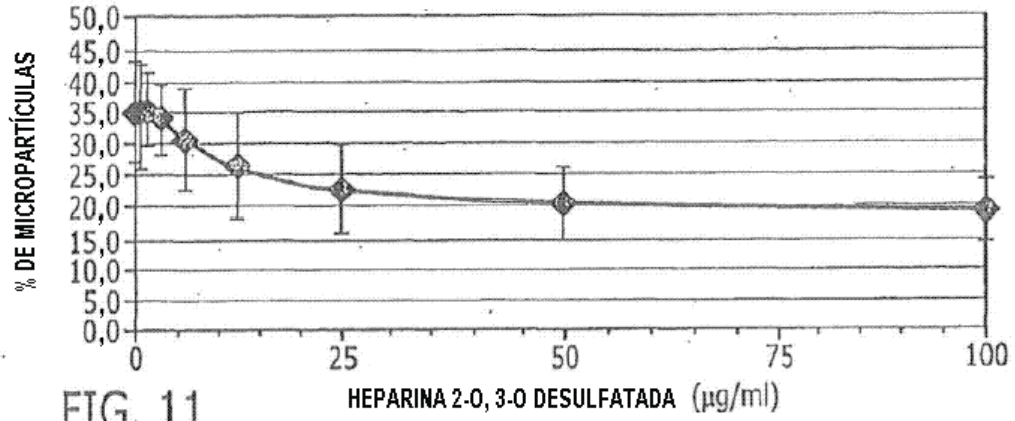


FIG. 11

MEJORÍA DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA INDUCIDA POR ANTICUERPOS HIT/HEPARINA (0,5 U/ml UFH) SEGÚN SE DEMUESTRA MEDIANTE LA FORMACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE PLAQUETAS

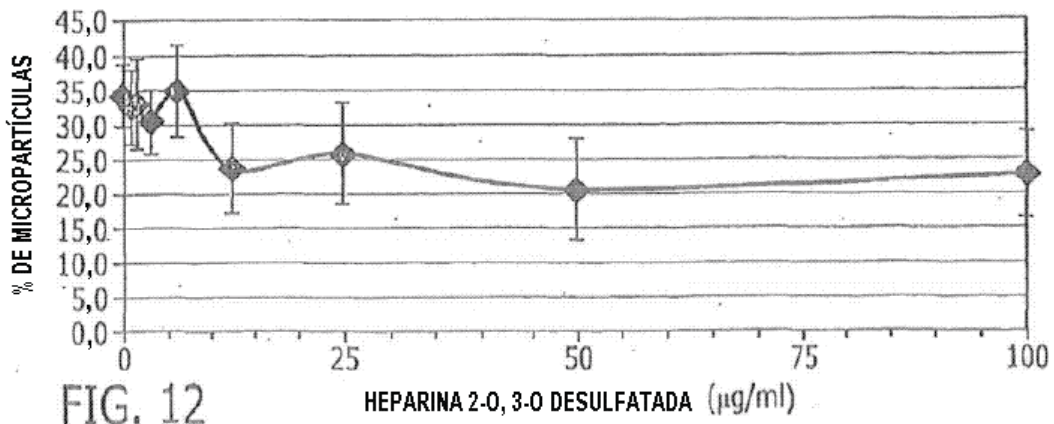


FIG. 12

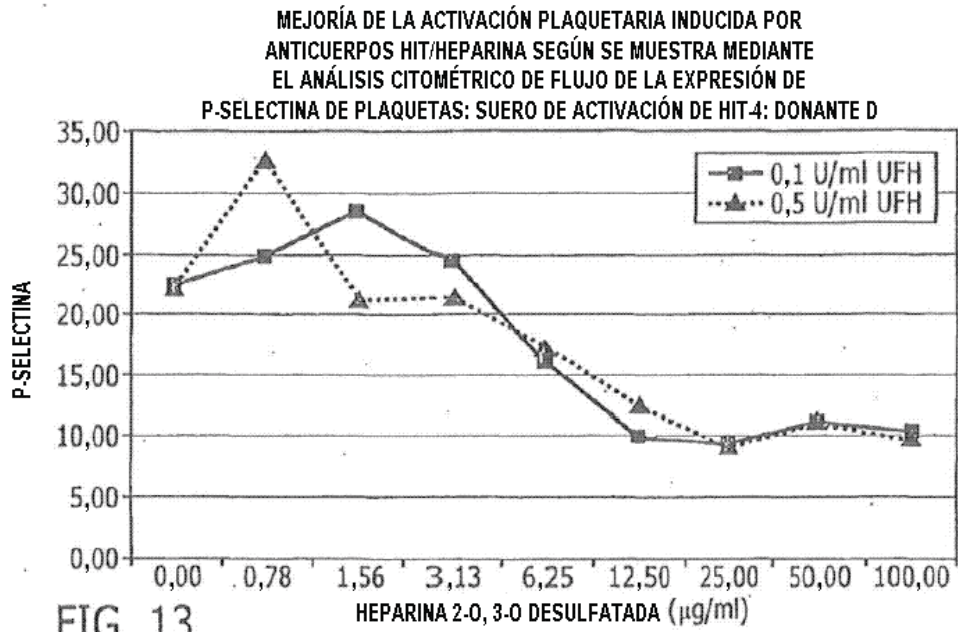


FIG. 13

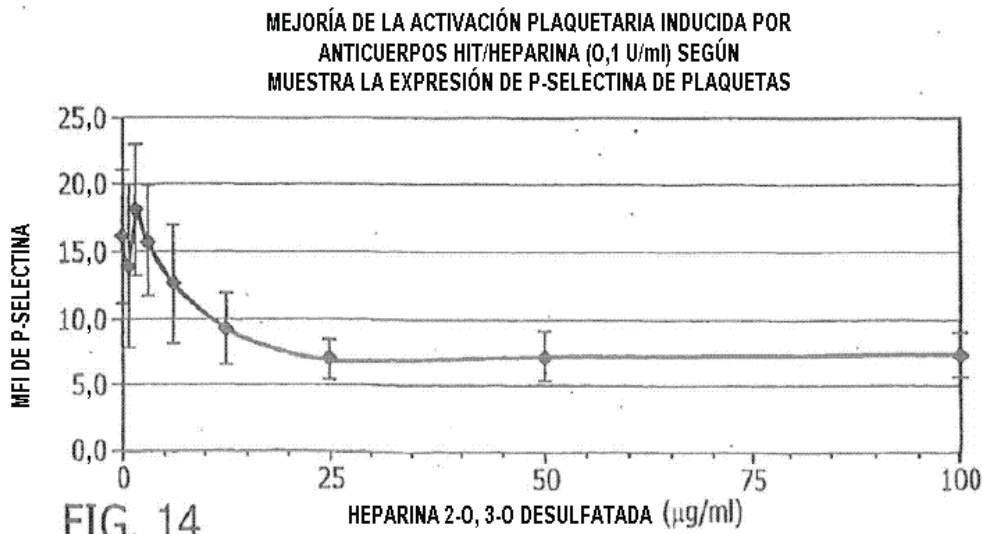


FIG. 14

MEJORÍA DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA INDUCIDA POR ANTICUERPOS HIT/HEPARINA (0,5 U/ml UFH) SEGÚN SE MUESTRA MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE P-SELECTINA DE PLAQUETAS

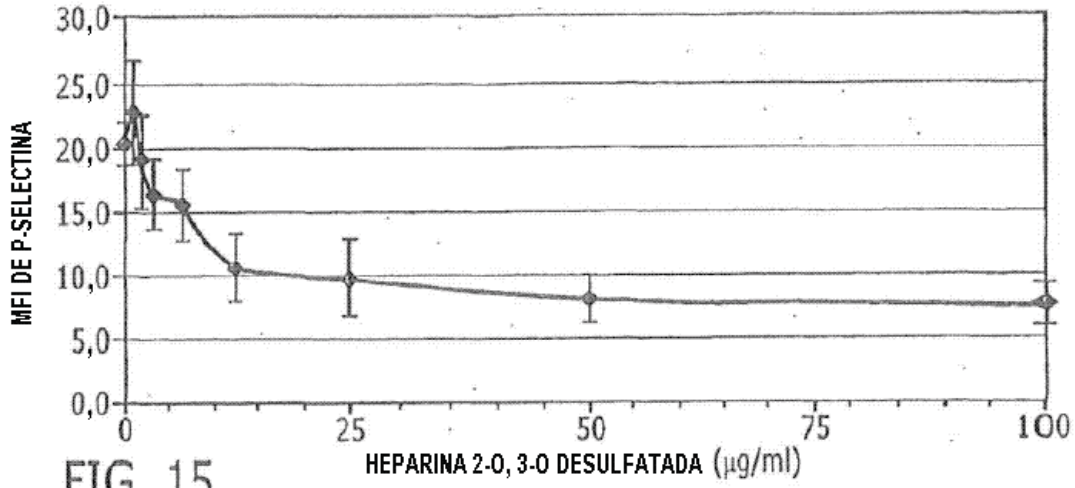


FIG. 15

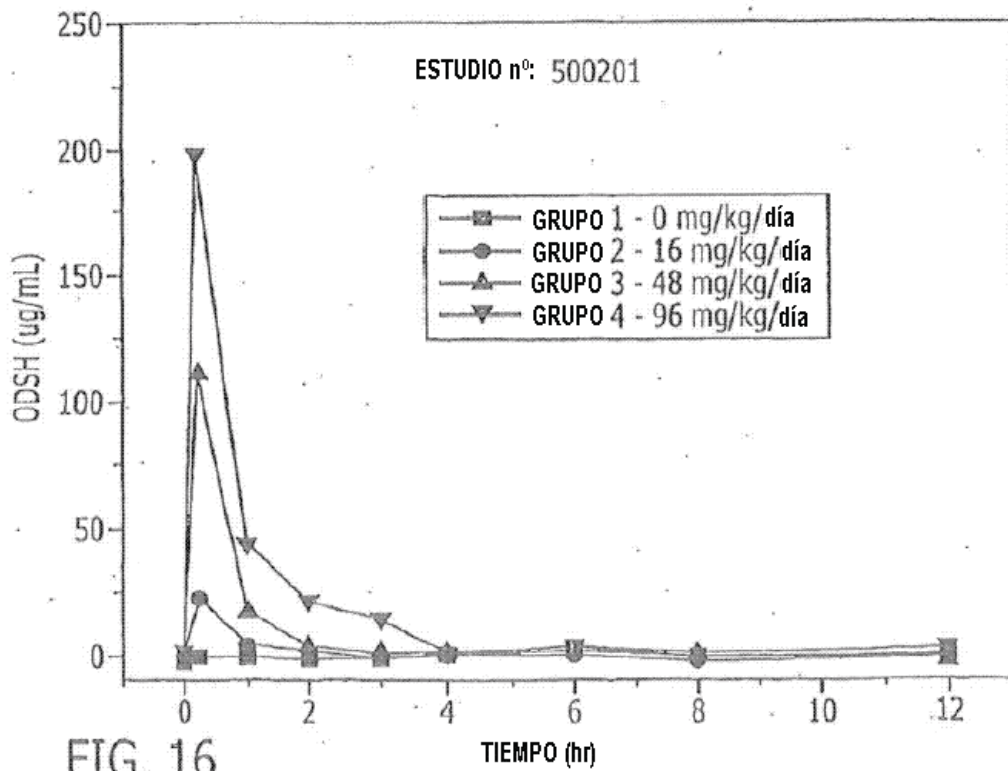
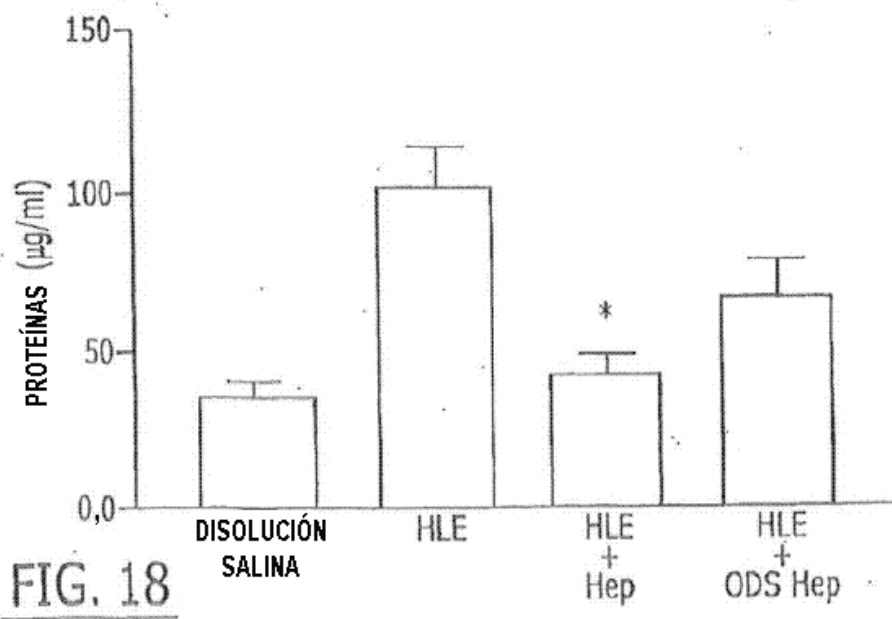
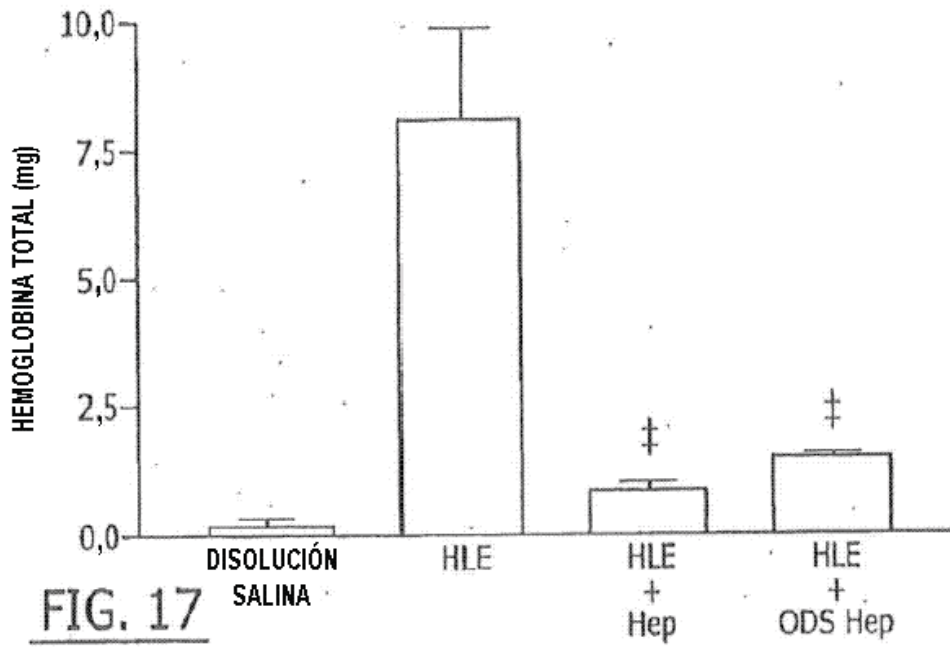


FIG. 16



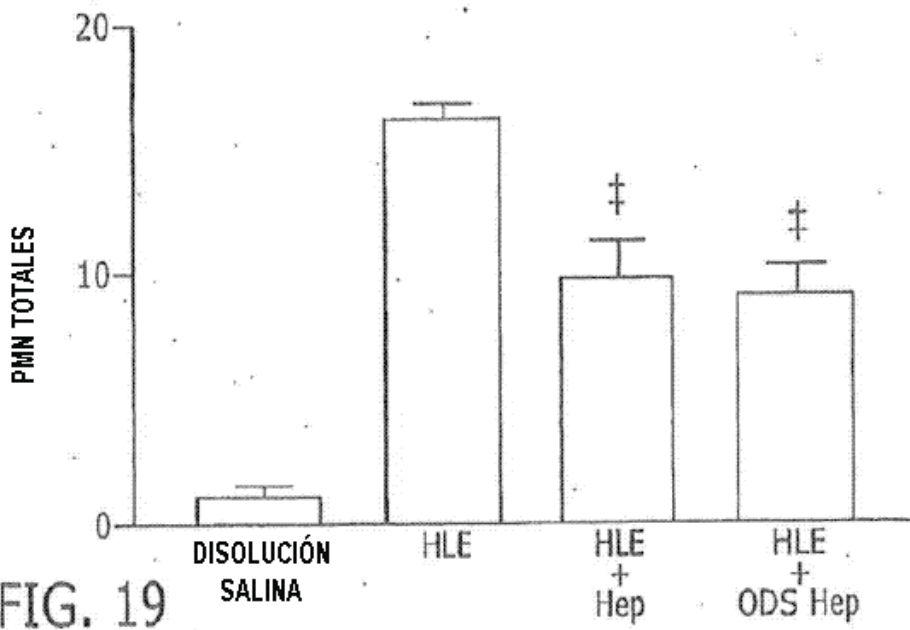


FIG. 19

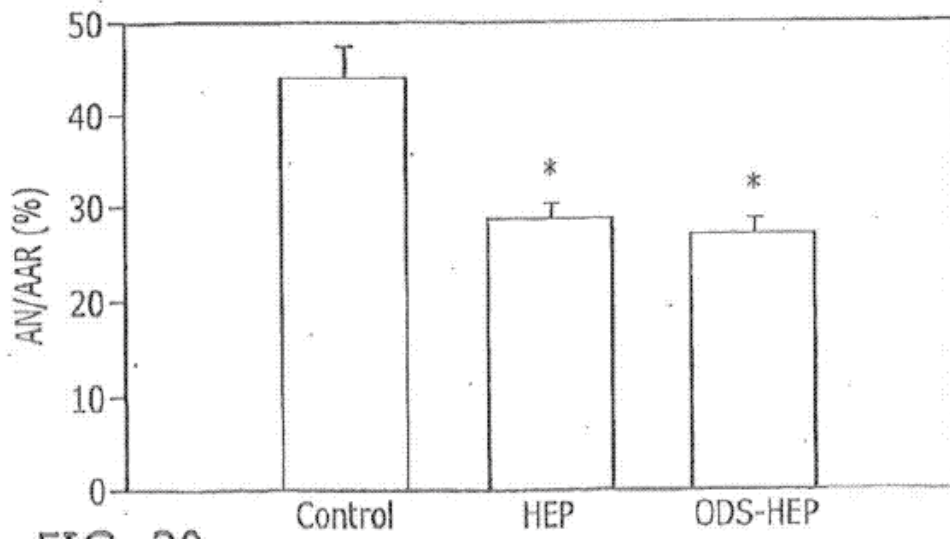


FIG. 20

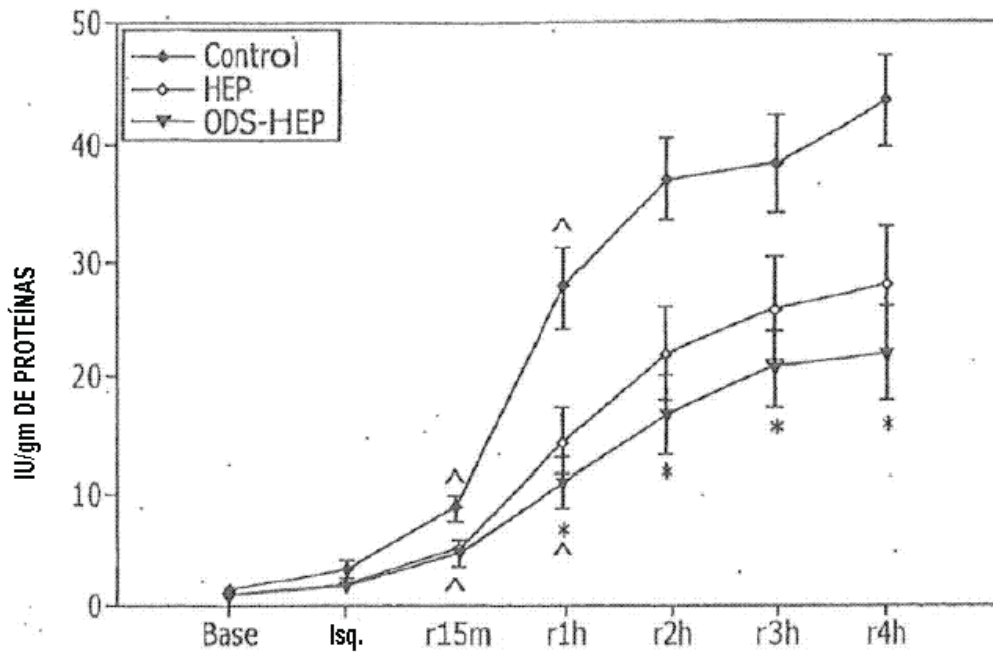


FIG. 21

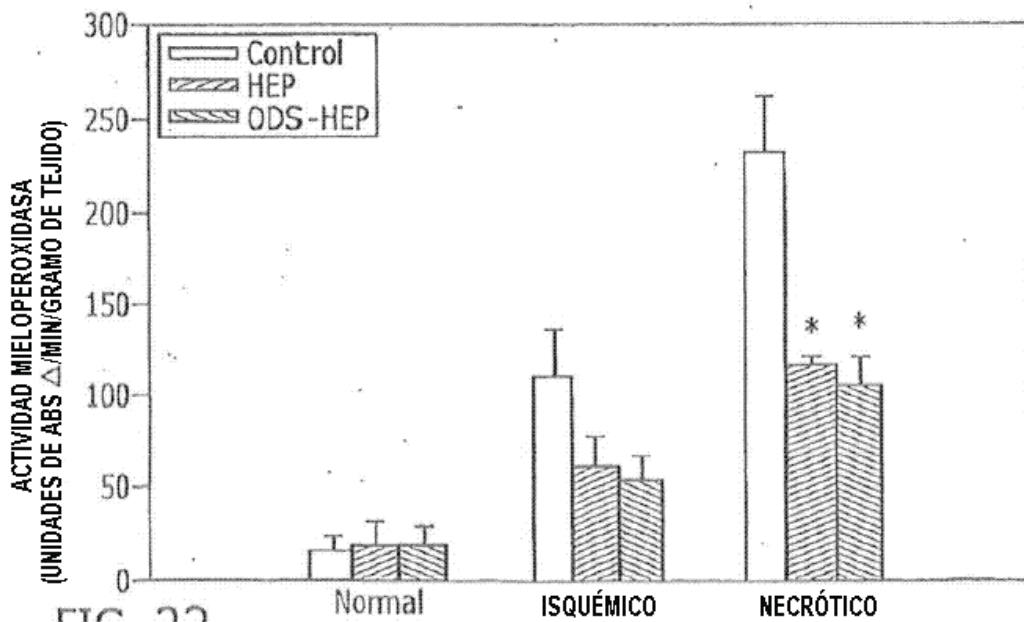


FIG. 22

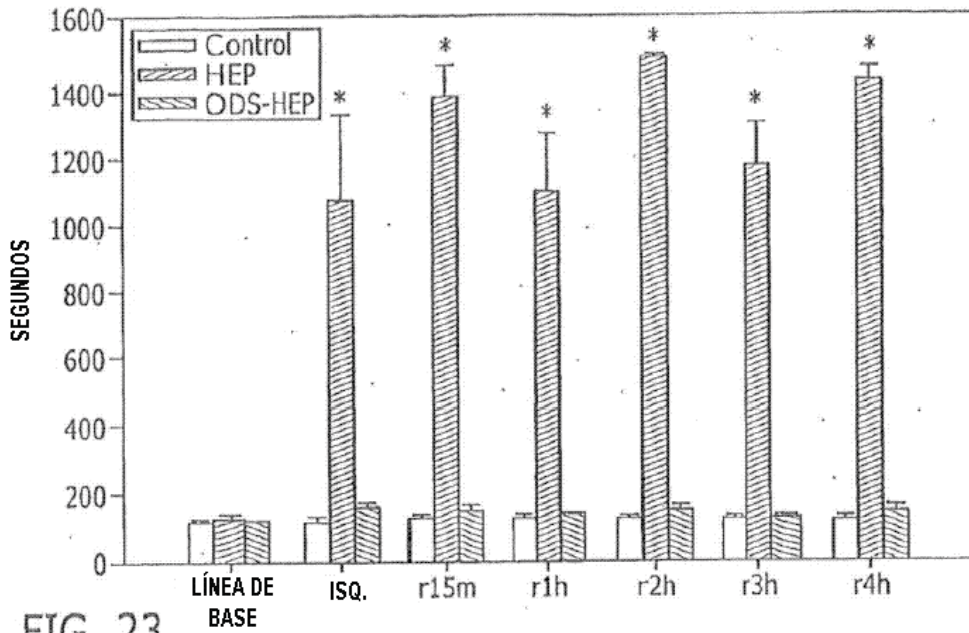


FIG. 23

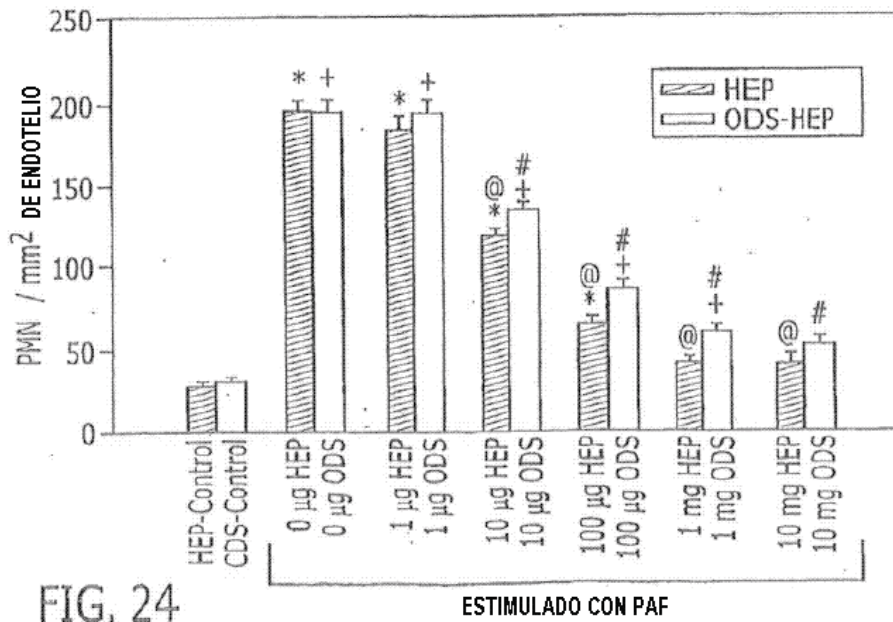


FIG. 24

ESTIMULADO CON PAF

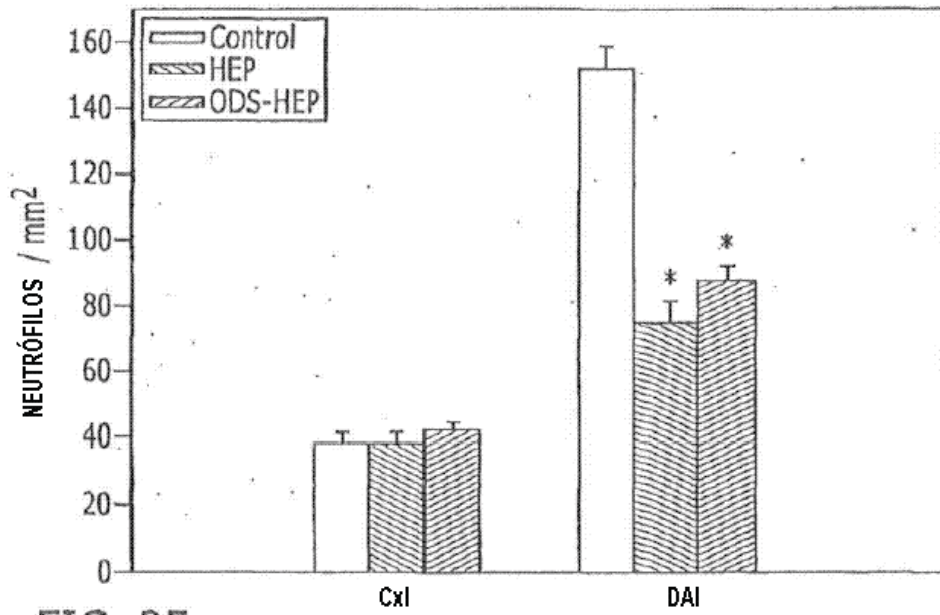


FIG. 25

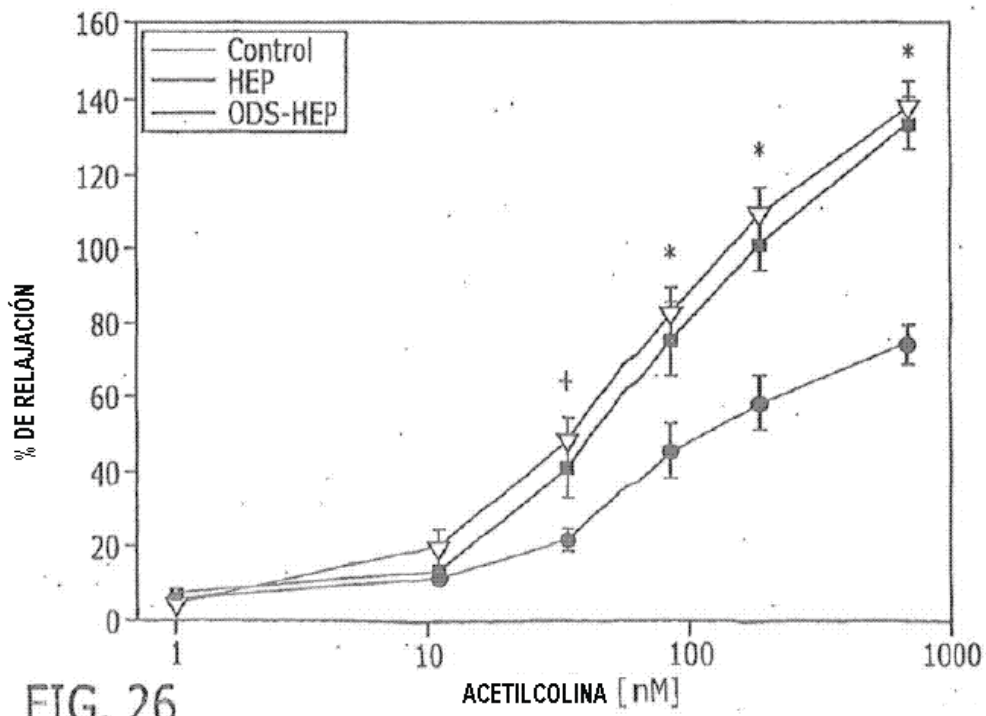


FIG. 26

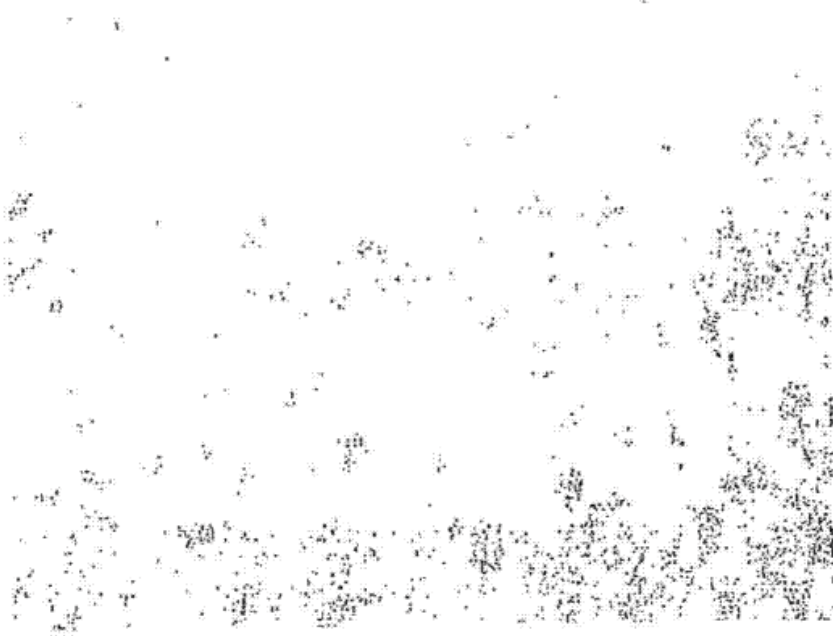


FIG. 27A

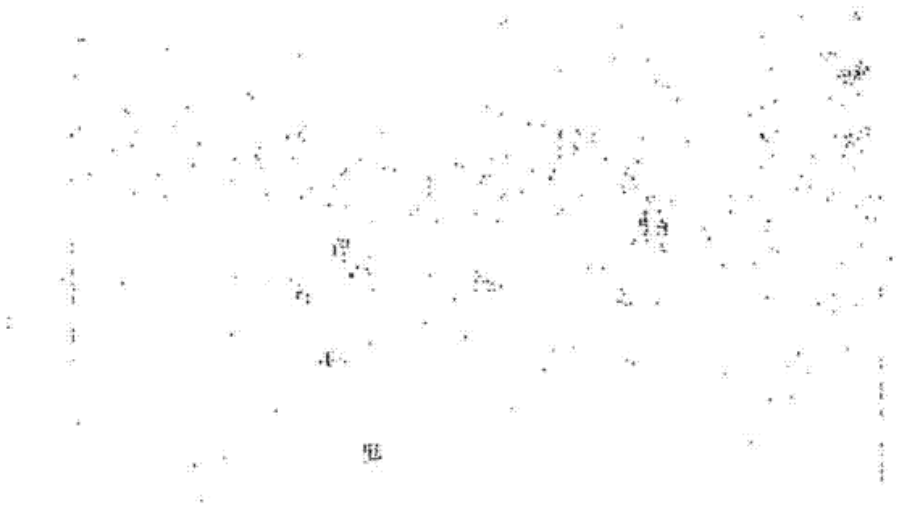


FIG. 27B

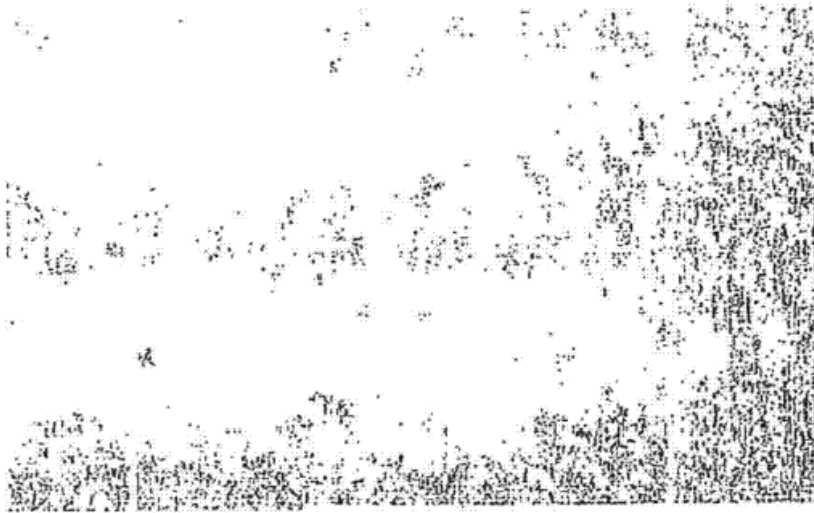


FIG. 27C

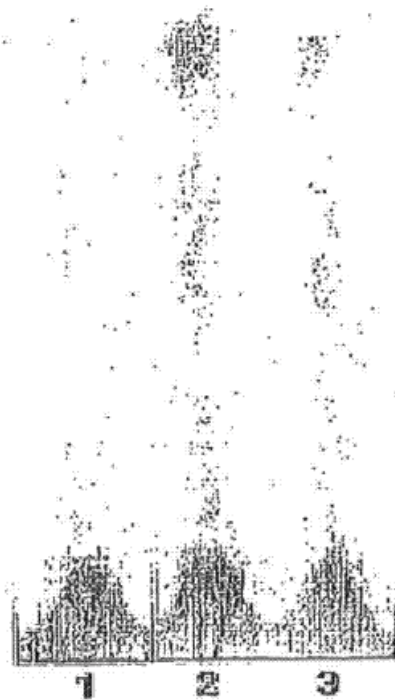


FIG. 28

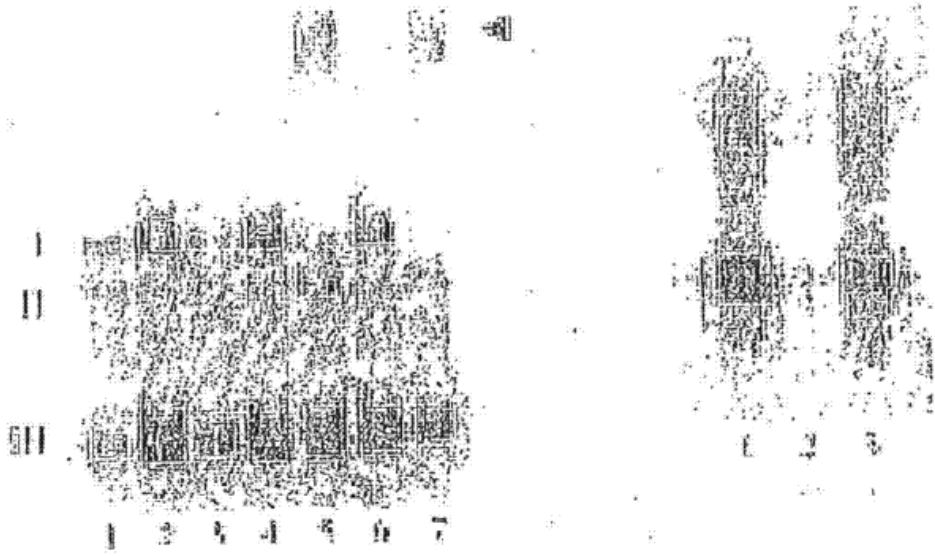


FIG. 29