

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 818**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2010 E 10715065 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 2419736**

54 Título: **Métodos para evaluar la actividad de una composición de polisacárido**

30 Prioridad:

**16.04.2009 US 170049 P**

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

**07.05.2014**

73 Titular/es:

**MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
675 West Kendall Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**ZHOU, HE;  
DUFFNER, JAY;  
GALCHEVA-GARGOVA, ZOYA;  
KISHIMOTO, TAKASHI KEI y  
SCHULTES, BIRGIT**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 458 818 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

Métodos para evaluar la actividad de una composición de polisacárido.

### Antecedentes

5 La heparina, un glucosaminoglucano de tipo heparina altamente sulfatado (HLGAG, por sus siglas en inglés) producido por mastocitos y aislado de fuentes naturales, es un anticoagulante clínico ampliamente usado. Sin embargo, los efectos de la heparina natural o no fraccionada, pueden ser difíciles de predecir y los pacientes deben ser vigilados estrechamente para evitar sobre- o infra-anticoagulación. Las heparinas de bajo peso molecular (las LMWH, por sus siglas en inglés) obtenidas por diversos métodos de fraccionamiento o despolimerización de heparina polimérica tienen acción farmacológica más previsible como anticoagulantes, efectos secundarios reducidos, actividad antitrombótica prolongada y mejor biodisponibilidad que la heparina no fraccionada (UFH, por sus siglas en inglés). Se homologan varias LMWH para el tratamiento de pacientes externos de estados tromboticos.

Hay un creciente interés en la función principal de los agentes antitrombóticos en la gestión de pacientes de cáncer.

### Sumario de la invención

15 Según la presente invención, se proporciona un método para vigilar el efecto de una preparación de polisacárido en un individuo que tiene cáncer, comprendiendo el método determinar los niveles estromales tumorales de células supresoras derivadas de mieloides (las MDSC, por sus siglas en inglés), células progenitoras endoteliales (las EPC, por sus siglas en inglés), expresión de la metalopeptidasa 9 de la matriz plasmática (MMP-9), expresión del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés), monocina inducida por la expresión de interferón gamma (MIG, por sus siglas en inglés) o asociaciones de los mismos en una muestra obtenida del individuo después de que se haya administrado al individuo la preparación de polisacárido, para determinar de ese modo el efecto de la preparación de polisacárido en el individuo;

en el que la preparación de polisacárido presenta las siguientes características:

un peso molecular de cadena promedio ponderal entre 3.500 y 8.000 Da;

actividad anti-Xa y actividad anti-IIa cada una menor que 50 UI/mg;

25 entre 5% y 50% de restos de ácido urónico separados de glicol y

una distribución de peso molecular de manera que el 10-50% de los oligosacáridos de la preparación presenta un peso molecular < 3.000 Da, 40-65% de los oligosacáridos presenta un peso molecular entre 3.000-8.000 Da y 5-30% de los oligosacáridos presenta un peso molecular > 8.000 Da

30 y en el que una disminución en el nivel de las MDSC, el nivel de las EPC, nivel de expresión de plasma MMP-9, nivel de expresión de G-CSF o combinaciones de los mismos en relación a un patrón de referencia indica que la preparación de polisacárido es eficaz en el tratamiento del cáncer en el individuo y un aumento o cambio no significativo en el nivel de las MDSC, el nivel de las EPC, nivel de expresión de plasma MMP-9, nivel de expresión de G-CSF o combinaciones de los mismos en relación a un patrón de referencia indica que la preparación de polisacárido no es eficaz en el tratamiento del cáncer en el individuo.

35 Más en general, la presente descripción caracteriza un método para vigilar el efecto de una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria en un individuo con un trastorno descrito en la presente memoria, por ej., cáncer, por ej., un cáncer descrito en la presente memoria, comprendiendo el método:

seleccionar un individuo al que se ha administrado una o más de las preparaciones de polisacárido descritas en la presente memoria y

40 determinar niveles de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), niveles de células progenitoras endoteliales (EPC), niveles de expresión de metalopeptidasa 9 de la matriz plasmática (MMP-9), niveles de expresión del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), niveles de expresión de monocina inducida por interferón gamma (MIG) o combinaciones de los mismos en el individuo, para determinar de ese modo el efecto de la preparación de polisacárido en el individuo.

45 En algunos casos, una disminución, por ej., una disminución estadísticamente significativa, en el nivel de las MDSC, el nivel de las EPC en la sangre, nivel de expresión de plasma MMP-9, nivel de expresión de G-CSF o combinaciones de los mismos en relación a un patrón de referencia indica que la preparación de polisacárido es eficaz en el tratamiento del trastorno en el individuo. En algunos casos, un aumento o cambio no significativo, por ej., cambio no estadísticamente significativo, en el nivel de las MDSC, el nivel de las EPC en la sangre, nivel de expresión de plasma MMP-9, nivel de expresión de G-CSF o combinaciones de los mismos en relación a un patrón de referencia indica que la preparación de polisacárido no es eficaz en el tratamiento del trastorno en el individuo. En algunos casos, un aumento en el nivel de expresión de MIG en relación a un patrón de referencia indica que la preparación de polisacárido es eficaz en el tratamiento del trastorno en el individuo. En algunos casos, una

disminución o cambio no significativo, por ej., cambio no estadísticamente significativo, en el nivel de expresión de MIG en relación a un patrón de referencia indica que la preparación de polisacárido no es eficaz en el tratamiento del trastorno en el individuo. En algunos casos, el patrón de referencia es el nivel de MDSC, el nivel de EPC, nivel de expresión de plasma MMP-9, nivel de expresión de G-CSF y/o nivel de expresión de MIG en el individuo  
 5 previamente a administración de la preparación de polisacárido. En algunos casos, se determina el nivel de MDSC, el nivel de EPC, nivel de expresión de plasma MMP-9, nivel de expresión de G-CSF y/o nivel de expresión de MIG de una muestra, por ej., una muestra de sangre o tejido, por ej., muestra de biopsia obtenida del individuo. En algunos casos, se determina el nivel de MDSC, el nivel de EPC, nivel de expresión de plasma MMP-9, nivel de expresión de G-CSF y/o nivel de expresión de MIG por un método seleccionado del grupo que consiste en (por sus siglas en inglés): inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo por el método  
 10 Western o un ensayo inmunohistoquímico (IHC). En algunos casos, al individuo no se le ha administrado previamente la preparación de polisacárido o la preparación de polisacárido se ha administrado previamente al individuo en una o más ocasiones.

También se desvela en la presente memoria un método para vigilar el efecto de una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria en un individuo con un trastorno descrito en la presente memoria, por ej., cáncer, por ej., un cáncer descrito en la presente memoria, comprendiendo el método:

determinar niveles de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), niveles de células progenitoras endoteliales (EPC), niveles de expresión de metalopeptidasa 9 de la matriz plasmática (MMP-9), niveles de expresión de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), niveles de expresión de monocina inducida por interferón gamma (MIG) o combinaciones de los mismos en el individuo,

administrar una o más preparaciones de polisacárido descritas en la presente memoria al individuo y

determinar niveles de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), niveles de células progenitoras endoteliales (EPC), niveles de expresión de metalopeptidasa 9 de la matriz plasmática (MMP-9), niveles de expresión de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), niveles de expresión de monocina inducida por interferón gamma (MIG) o combinaciones de los mismos en el individuo, para determinar de ese modo el efecto de la preparación de polisacárido en el individuo.

También se desvela en la presente memoria un método para medir carga tumoral en un individuo que tiene cáncer, por ej., cáncer de mama (por ej., cáncer de mama localmente avanzado o metastásico), melanoma (por ej., melanoma metastásico), cáncer colorrectal (por ej., cáncer colorrectal localmente avanzado o metastásico), cáncer pancreático (por ej., cáncer pancreático localmente avanzado o metastásico), comprendiendo el método:

determinar niveles de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), niveles de células progenitoras endoteliales (EPC), niveles de expresión de metalopeptidasa 9 de la matriz plasmática (MMP-9), niveles de expresión de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) o combinaciones de los mismos en el individuo, en el que una disminución, por ej., una disminución estadísticamente significativa, en los niveles de MDSC, niveles de EPC, niveles de expresión de MMP-9 o niveles de expresión de G-CSF en el individuo es indicativo de una mejora en carga tumoral, por ej., el número de células cancerígenas, el tamaño de un tumor y/o la cantidad de cáncer en el cuerpo ha permanecido invariable o ha disminuido, para determinar de ese modo la carga tumoral.

En algunos casos, una disminución, por ej., una disminución estadísticamente significativa, en el nivel de las MDSC, el nivel de las EPC, nivel de expresión de MMP-9 o nivel de expresión de G-CSF en relación a un patrón de referencia indica una mejora en carga tumoral, por ej., el número de células cancerígenas, el tamaño de un tumor y/o la cantidad de cáncer en el cuerpo ha permanecido invariable o ha disminuido, para determinar de ese modo la carga tumoral. En algunos casos, el patrón de referencia es niveles de MDSC, niveles de EPC, niveles de expresión de MMP-9 o niveles de expresión de G-CSF en el individuo previamente a administración de un tratamiento, por ej., en el que el tratamiento se selecciona del grupo que consiste en una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria, tratamiento quirúrgico, terapia de radiación, quimioterapia, terapia de anticuerpos y tratamiento hormonal. En algunos casos, se determinan los niveles de MDSC, niveles de expresión de EPC, niveles de expresión de MMP-9 o niveles de expresión de G-CSF de una muestra, por ej., una muestra de sangre o tejido, por ej., una muestra de biopsia obtenida del individuo. En algunos casos, se determinan niveles de MDSC, niveles de expresión de EPC, niveles de expresión de MMP-9 o niveles de expresión de G-CSF por un método seleccionado del grupo que consiste en inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo por el método Western o un ensayo inmunohistoquímico (IHC).

También se desvela en la presente memoria un método para medir carga tumoral en un individuo que tiene cáncer, por ej., cáncer de mama (por ej., cáncer de mama localmente avanzado o metastásico), melanoma (por ej., melanoma metastásico), cáncer colorrectal (por ej., cáncer colorrectal localmente avanzado o metastásico), cáncer pancreático (por ej., cáncer pancreático localmente avanzado o metastásico), comprendiendo el método:

determinar niveles de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), niveles de células progenitoras endoteliales (EPC), niveles de expresión de metalopeptidasa 9 de la matriz plasmática (MMP-9), niveles de expresión de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) o combinaciones de los mismos en el individuo,

proporcionar al individuo un tratamiento el tratamiento, por ej., un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria, tratamiento quirúrgico, terapia de radiación, quimioterapia, terapia de anticuerpos y tratamiento hormonal y

5 comparar los niveles de MDSC, niveles de EPC, niveles de expresión de MMP-9, niveles de expresión de G-CSF o combinaciones de los mismos en el individuo, después del tratamiento a niveles de MDSC, niveles de EPC, niveles de expresión de MMP-9, niveles de expresión de G-CSF o combinaciones de los mismos, previamente al tratamiento para determinar de ese modo el efecto del tratamiento sobre la carga tumoral.

10 También se desvela en la presente memoria un método para medir carga tumoral en un individuo que tiene cáncer, por ej., cáncer de mama (por ej., cáncer de mama localmente avanzado o metastásico), melanoma (por ej., melanoma metastásico), cáncer colorrectal (por ej., cáncer colorrectal localmente avanzado o metastásico), cáncer pancreático (por ej., cáncer pancreático localmente avanzado o metastásico), comprendiendo el método:

15 determinar niveles de expresión de monocina inducida por interferón gamma (MIG) en el individuo, en el que un aumento, por ej., un aumento estadísticamente significativo, en los niveles de expresión de MIG en el individuo es indicativo de una mejora en carga tumoral, por ej., el número de células cancerígenas, el tamaño de un tumor y/o la cantidad de cáncer en el cuerpo ha permanecido invariable o ha disminuido, para determinar de ese modo la carga tumoral.

20 En algunos casos, un aumento, por ej., un aumento estadísticamente significativo, en el nivel de expresión de MIG en relación a un patrón de referencia indica una mejora en carga tumoral, por ej., el número de células cancerígenas, el tamaño de un tumor y/o la cantidad de cáncer en el cuerpo ha permanecido invariable o ha disminuido, para determinar de ese modo la carga tumoral. En algunos casos, el patrón de referencia es niveles de expresión de MIG en el individuo previamente a administración de un tratamiento, por ej., en el que el tratamiento se selecciona del grupo que consiste en una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria, tratamiento quirúrgico, terapia de radiación, quimioterapia, terapia de anticuerpos y tratamiento hormonal. En algunos casos, los niveles de expresión de MIG se determinan de una muestra, por ej., una muestra de sangre o tejido, por ej., una muestra de biopsia, obtenida del individuo. En algunos casos, los niveles de expresión de MIG se determinan por un método seleccionado del grupo que consiste en: inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo por el método Western o un ensayo inmunohistoquímico (IHC).

30 También se desvela en la presente memoria un método para medir carga tumoral en un individuo que tiene cáncer, por ej., cáncer de mama (por ej., cáncer de mama localmente avanzado o metastásico), melanoma (por ej., melanoma metastásico), cáncer colorrectal (por ej., cáncer colorrectal localmente avanzado o metastásico), cáncer pancreático (por ej., cáncer pancreático localmente avanzado o metastásico), comprendiendo el método:

determinar niveles de expresión de monocina inducida por interferón gamma (MIG) en el individuo,

proporcionar al individuo un tratamiento, por ej., un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria y

35 comparar los niveles de expresión de MIG en el individuo, después del tratamiento para niveles de expresión de MIG previamente al tratamiento para determinar de ese modo el efecto del tratamiento sobre la carga tumoral.

40 También se desvela en la presente memoria un método para determinar si un individuo que tiene cáncer, por ej., cáncer de mama (por ej., cáncer de mama localmente avanzado o metastásico), melanoma (por ej., melanoma metastásico), cáncer colorrectal (por ej., cáncer colorrectal localmente avanzado o metastásico), cáncer pancreático (por ej., cáncer pancreático localmente avanzado o metastásico) está en riesgo de recaída o llega a ser resistente al tratamiento o resistente a una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria, comprendiendo el método:

45 determinar niveles de expresión de monocina inducida por interferón gamma (MIG) en el individuo, en el que un aumento, por ej., un aumento estadísticamente significativo, en los niveles de expresión de MIG en el individuo indica un riesgo disminuido de recaída y/o desarrollo de resistencia o llega a ser resistente al tratamiento para una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria, para determinar de ese modo el riesgo.

50 En algunos casos, un aumento, por ej., un aumento estadísticamente significativo, en el nivel de expresión de MIG en relación a un patrón de referencia indica un riesgo disminuido de recaída y/o desarrollo de resistencia o llega a ser resistente al tratamiento para una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria, para determinar de ese modo el riesgo. En algunos casos, el patrón de referencia es niveles de expresión de MIG en el individuo previamente a administración de una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria. En algunos casos, los niveles de expresión de MIG se determinan de una muestra, por ej., una muestra de sangre o tejido, por ej., una muestra de biopsia, obtenida del individuo. En algunos casos, los niveles de expresión de MIG se determinan por un método seleccionado del grupo que consiste en inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo por el método Western o un ensayo inmunohistoquímico (IHC).

55 También se desvela en la presente memoria un método para determinar si un individuo que tiene cáncer, por ej.,

cáncer de mama (por ej., cáncer de mama localmente avanzado o metastásico), melanoma (por ej., melanoma metastásico), cáncer colorrectal (por ej., cáncer colorrectal localmente avanzado o metastásico), cáncer pancreático (por ej., cáncer pancreático localmente avanzado o metastásico) está en riesgo de recaída o llega a ser resistente al tratamiento o resistente a una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria, comprendiendo el método:

5 determinar niveles de expresión de monocina inducida por interferón gamma (MIG) en el individuo, en el que una disminución, por ej., una disminución estadísticamente significativa o cambio no significativo, por ej., cambio no estadísticamente significativo, en los niveles de expresión de MIG en el individuo indica un riesgo aumentado de recaída y/o desarrollo de resistencia o llega a ser resistente al tratamiento para una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria, para determinar de ese modo el riesgo.

10 En algunos casos, una disminución, por ej., una disminución estadísticamente significativa o cambio no significativo, por ej., cambio no estadísticamente significativo, en el nivel de expresión de MIG en relación a un patrón de referencia indica un riesgo aumentado de recaída y/o desarrollo de resistencia o llega a ser resistente al tratamiento para una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria, para determinar de ese modo el riesgo. En algunos casos, el patrón de referencia es niveles de expresión de MIG en el individuo previamente a administración de una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria. En algunos casos, los niveles de expresión de MIG se determinan de una muestra, por ej., una muestra de sangre o tejido, por ej., una muestra de biopsia, obtenida del individuo. En algunos casos, los niveles de expresión de MIG se determinan por un método seleccionado del grupo que consiste en inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo por el método Western o un ensayo inmunohistoquímico (IHC).

25 En un ejemplo, las preparaciones de polisacárido son preparaciones de polisacáridos derivadas de la heparina, que carecen de actividad anticoagulante sustancial (por ej., preparaciones de polisacáridos que no presentan sustancialmente actividad anticoagulante o niveles anticoagulantes residuales) pero retienen actividad en otros procedimientos biológicos no mediados por coagulación y métodos para producirlos. Estos compuestos pueden presentar una o más de las siguientes características: 1) una actividad anti-Xa y una actividad anti-IIa cada una menor que 50 UI/mg (por ej., una actividad anti-Xa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg y/o una actividad anti-IIa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg) y 2) actividad anti-metastásica, anti-angiogénica, anti-fibrótica y/o antiinflamatoria. Los polisacáridos desvelados en la presente memoria también pueden presentar características estructurales que los distinguen de otros polisacáridos, (por ej., de heparinas comercialmente disponibles). Por ejemplo, una preparación de polisacárido proporcionada en la presente memoria puede presentar una o más de las siguientes características: la preparación presenta menos de 50%, 40%, 30% o 20% restos de ácido urónico separados de glicol; la preparación no presenta más de 3 restos de ácido urónico separados de glicol ( $U_G$ ) por cadena de polisacárido (por ej., 3, 2 ó 1  $U_G$  por cadena de polisacárido); la preparación tiene más de 40% de  $U_{2S}H_{NS,6S}$  (por ej., más de 50%, 60%, 70% u 80%) restos disacárido; el grado de desulfatación de la preparación es menor que 40% (por ej., menor que 30%, 20%, 10%); una o más cadenas de polisacárido en la preparación presentan una insaturación-4,5 de un resto de ácido urónico terminal no reductor; una o más cadenas de polisacárido en la preparación presentan un resto 2,5-anhidromanitol en el extremo reductor (por ej., aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%), 80%, 90% o más o las cadenas de polisacárido en la preparación presentan un resto 2,5-anhidromanitol en el extremo reductor); el peso molecular promedio ponderal de la preparación está entre 3.500 y 7.000 Da (por ej., 4.300 a 7.000 Da; 4.500 a 7.000 Da, 5.000 a 7.000 Da) y una distribución de peso molecular descrita en la presente memoria. Esta descripción incluye preparaciones que tienen una o más de estas propiedades y características así como métodos para preparar y usar dichas preparaciones. La descripción también caracteriza métodos para usar dichas preparaciones.

45 De acuerdo con esto, la preparación de polisacárido (por ej., una preparación derivada de heparina) presenta las siguientes características: (a) un peso molecular de cadena promedio ponderal entre 3.500 y 7.000 Da (por ej., 4.300 a 7.000 Da; 4.500 a 7.000 Da, 5.000 a 7.000 Da); (b) una actividad anti-Xa y una actividad anti-IIa cada una menor que 50 UI/mg (por ej., una actividad anti-Xa menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg y una actividad anti-IIa menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg) y (c) menos de 50% de restos de ácido urónico separados de glicol (por ej., menos de 40%, 30%, 25% o 20% de restos de ácido urónico separados de glicol) en la preparación. En algunos casos, la preparación contiene entre 5% y 50% de restos de ácido urónico separados de glicol (por ej., entre 5% y 40%, 5% y 30%, 10% y 50%, 10% y 40% o 10% y 30% de restos de ácido urónico separados de glicol). En algunos casos, la preparación presenta una actividad anti-Xa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg y/o una actividad anti-IIa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg). En algunos casos, la preparación presenta una distribución de peso molecular descrita en la presente memoria.

60 En otro ejemplo, la preparación de polisacárido (por ej., una preparación derivada de heparina) presenta las siguientes características: (a) un peso molecular de cadena promedio ponderal entre 3.500 y 7.000 Da (por ej., 4.300 a 7.000 Da; 4.500 a 7.000 Da, 5.000 a 7.000 Da); (b) una actividad anti-Xa y una actividad anti-IIa cada una menor que 50 UI/mg (por ej., una actividad anti-Xa menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg y una actividad anti-IIa menor que aproximadamente 40

5 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg); (c) al menos una cadena de polisacárido con un resto de ácido urónico separado de glicol ( $U_G$ ) y (d) las cadenas de polisacárido de la preparación no presentan más de 3 restos de ácido urónico separados de glicol ( $U_G$ ) por cadena de polisacárido (por ej., cada cadena de polisacárido no presenta más de 2 o más de 1 resto de ácido urónico separado de glicol ( $U_G$ ) por cadena de polisacárido). La preparación incluye una o más cadenas con un resto de ácido urónico separado de glicol ( $U_G$ ). En algunos casos, la preparación presenta una actividad anti-Xa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg y/o una actividad anti-IIa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg). En algunos casos, la preparación presenta una distribución de peso molecular descrita en la presente memoria.

10 En otro ejemplo, la preparación de polisacárido (por ej., una preparación derivada de heparina) presenta las siguientes características: (a) un peso molecular de cadena promedio ponderal entre 3.500 y 7.000 Da (por ej., 4.300 a 7.000 Da; 4.500 a 7.000 Da, 5.000 a 7.000 Da); (b) una actividad anti-Xa y una actividad anti-IIa cada una menor que 50 UI/mg (por ej., una actividad anti-Xa menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg y una actividad anti-IIa menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg) y (c) las cadenas de polisacárido de la preparación presentan de promedio no más de 3 restos de ácido urónico separados de glicol ( $U_G$ ) por cadena de polisacárido (por ej., de promedio más de 2,5, no más de 2, no más de 1,5 o no más de 1 resto de ácido urónico separado de glicol ( $U_G$ ) por cadena de polisacárido. En algunos casos, la preparación presenta una actividad anti-Xa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg y/o una actividad anti-IIa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg). En algunos casos, la preparación presenta una distribución de peso molecular descrita en la presente memoria.

25 En otro ejemplo, la preparación de polisacárido (por ej., una preparación derivada de heparina) presenta las siguientes características: (a) un peso molecular de cadena promedio ponderal entre 3.500 y 7.000 Da (por ej., 4.300 a 7.000 Da; 4.500 a 7.000 Da, 5.000 a 7.000 Da); (b) una actividad anti-Xa y una actividad anti-IIa cada una menor que 50 UI/mg (por ej., una actividad anti-Xa menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg y una actividad anti-IIa menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg) y (c) la preparación tiene más de 40% de restos disacárido  $U_{2S}H_{NS,6S}$  (por ej., más de 50%, 60%, 70% u 80% de restos disacárido  $U_{2S}H_{NS,6S}$ ). En algunos casos, la preparación presenta un grado de desulfatación menor que 40% (por ej., menor que 30%, 20% o 10%). En algunos casos, la preparación presenta una actividad anti-Xa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg y/o una actividad anti-IIa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg). En algunos casos, la preparación presenta una distribución de peso molecular descrita en la presente memoria.

35 En otro ejemplo, la preparación de polisacárido (por ej., una preparación derivada de heparina) carece de actividad anticoagulante sustancial (por ej., presenta sustancialmente actividad no anticoagulante o actividad anticoagulante residual), en la que la preparación incluye polisacáridos que incluyen la Fórmula I:



en la que U indica un resto de ácido urónico y H indica un resto hexosamina;

40 m y n son números enteros tales que:

m = 4-16 (por ej., 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13, 4-14 ó 4-15) y

n = 1-4 (por ej., 1-2 ó 1-3);

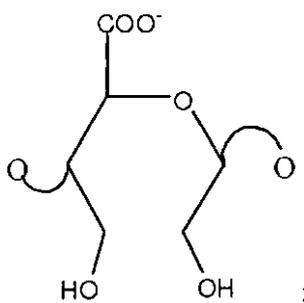
w = -2OS o -2OH;

x = -NS o -NAc;

45 y = -3OS o -3OH;

z = -6OS o -6OH;

y  $U_G =$



en el que el símbolo ~ indica que las unidades marcadas m y n se distribuyen a lo largo de la cadena de polisacárido y no están necesariamente en secuencia. Por ejemplo, la siguiente cadena de polisacárido está incluida por la fórmula anterior:

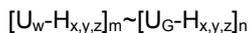


Además, cada una de w, x, y y z pueden ser iguales o diferentes para cada caso de  $[U_W-H_{x,y,z}]$  y cada una de x, y y z pueden ser iguales o diferentes para cada caso de  $[U_G-H_{x,y,z}]$ . Cada caso de U puede ser independientemente un ácido (I) idurónico o un ácido (G) glucurónico. En algunos casos, la preparación presenta una actividad anti-Xa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg y/o una actividad anti-IIa, menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg). En algunos casos, la preparación presenta una distribución de peso molecular descrita en la presente memoria.

10

En otro ejemplo, la preparación de polisacárido (por ej., una preparación derivada de heparina) presenta un peso molecular de cadena promedio ponderal entre 3.500 y 7.000 Da (por ej., 4.300 a 7.000 Da; 4.500 a 7.000 Da, 5.000 a 7.000 Da) y actividad anticoagulante reducida, en la que la preparación incluye polisacáridos que incluyen la

15



en la que U indica un resto de ácido urónico y H indica un resto hexosamina;

m y n son números enteros de manera que

m = 4-16 (por ej., 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13, 4-14 ó 4-15) y

20 n = 1-4 (por ej., 1-2 ó 1-3);

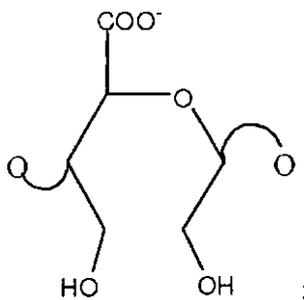
w = -2OS o -2OH;

x = -NS o -NAc;

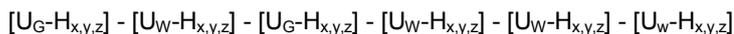
y = -3OS o -3OH;

z = -6OS o -6OH;

25 y  $U_G =$

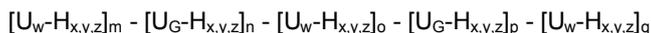


30 en la que el símbolo ~ indica que las unidades marcadas m y n se distribuyen a lo largo de la cadena de polisacárido y no están necesariamente en secuencia. Por ejemplo, la siguiente cadena de polisacárido está incluida por la fórmula anterior:



Además, cada una de w, x, y y z pueden ser iguales o diferentes para cada caso de  $[U_W-H_{x,y,z}]$  y cada una de x, y y z pueden ser iguales o diferentes para cada caso de  $[U_G-H_{x,y,z}]$ . Cada caso de U puede ser independientemente un ácido (I) idurónico o un ácido (G) glucurónico. En algunos casos, la preparación presenta una actividad anti-Xa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg y/o una actividad anti-IIa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg). En algunos casos, la preparación presenta una distribución de peso molecular descrita en la presente memoria.

En otro ejemplo, la preparación de polisacárido (por ej., una preparación derivada de heparina) carece de actividad anticoagulante sustancial (por ej., que tiene sustancialmente actividad no anticoagulante o actividad anticoagulante residual) y presenta actividad antimetastásica, en la que la preparación incluye polisacáridos que incluyen la Fórmula II:



en la que U indica un resto de ácido urónico y H indica un resto hexosamina;

en la que m-r son números enteros tales que:

15 m = 0-10;

n = 0- 3;

o = 0-10;

P = 0-3;

q = 0-10;

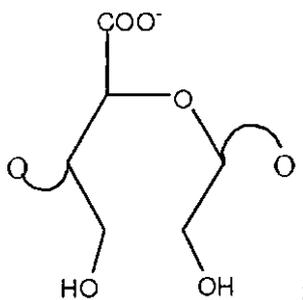
20 w = -2OS o -2OH;

x = -NS o -NAc;

y = -3OS o -3OH;

z = -6OS o -6OH;

y  $U_G =$



25 en la que w, x, y y z are cada una iguales o diferentes en cada unidad marcada m, n, o, p o q. En algunos casos, la suma de n + p es menor que o igual a 4 (por ej., menor que o igual a 3, 2, 1 ó 0). En algunos casos, la suma de n y p es 4, 3, 2 ó 1. En algunos casos, la suma de m, o y q es entre 4 y 18, por ej., 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13, 4-14, 4-15, 4-16 ó 4-17.

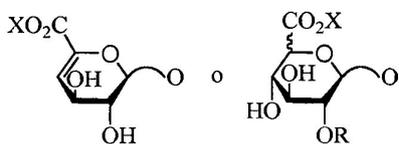
30 Además, cada una de w, x, y y z pueden ser iguales o diferentes para cada caso de  $[U_W-H_{x,y,z}]$  y cada una de x, y y z pueden ser iguales o diferentes para cada caso de  $[U_G-H_{x,y,z}]$ . Cada caso de U puede ser independientemente un ácido (I) idurónico o un ácido (G) glucurónico.

35 En algunos casos, la preparación presenta un peso molecular de cadena promedio ponderal entre 3.500 y 8.000 Da, por ej., 4.300 y 7000 Da, 4.500 y 7.000 Da, 4.700 y 7.000 Da y 5.000 y 7.000 Da. En algunos casos, la preparación presenta una actividad anti-Xa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg y/o una actividad anti-IIa menor que 50 UI/mg, 40 UI/mg, 30 UI/mg o 20 UI/mg pero mayor que 0,5 UI/mg, 1 UI/mg o 2 UI/mg). En algunos casos, la preparación presenta una distribución de peso molecular descrita en la presente memoria.

40 En algunos casos, la preparación presenta un peso molecular de cadena promedio ponderal entre 3.500 y 8.000 Da, por ej., 4.300 y 7000 Da, 4.500 y 7.000 Da, 4.700 y 7.000 Da y 5.000 y 7.000 Da.

Cualquiera de las preparaciones descritas en la presente memoria, por ej., descritas anteriormente, puede presentar otras propiedades. Por ej., una de las preparaciones o composiciones farmacéuticas descritas anteriormente puede presentar además una o más de las propiedades funcionales o estructurales señaladas a continuación.

- 5 En un ejemplo, al menos una de las cadenas de polisacárido en la preparación presenta una de las siguientes estructuras en el extremo no reductor:



en las que X es H o Me y R es H o SO<sub>3</sub>. Por ejemplo, aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o sustancialmente todos los extremos no reductores de la preparación o composición farmacéutica presentan la estructura.

- 10 En un ejemplo, al menos una de las cadenas de polisacárido en la preparación o composición farmacéutica incluye un resto 2,5-anhidromanitol en el extremo reductor. Por ejemplo, aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o sustancialmente todas las cadenas de polisacárido en la preparación o composición farmacéutica incluyen un resto 2,5-anhidromanitol en el extremo reductor.

- 15 En un ejemplo, la preparación o composición farmacéutica presenta una distribución de peso molecular de manera que 10-50% (por ej., 10-40%, 10-30%, 15-30% o 15-25%) de los oligosacáridos de la preparación presentan un peso molecular < 3.000 Da; 40-65% (por ej., 45-65%, 50-65% o 55-65%) de los oligosacáridos presentan un peso molecular entre 3.000-8.000 Da y 5-30% (por ej., 10-30%, 15-30%, 10-25% o 15-25%) de los oligosacáridos presentan un peso molecular > 8.000 Da.

- 20 En un ejemplo, la preparación presenta una polidispersidad de aproximadamente 1,2 a 1,7 (por ej., aproximadamente 1,3 a 1,7; 1,2 a 1,6 ó 1,3 a 1,6).

En un ejemplo, la preparación o composición presenta actividad anti-metastásica.

En un ejemplo, la preparación o composición se une específicamente a o inhibe una actividad de una o más de: VEGF, FGF, HGF, HB-EGF, SDF-1- $\alpha$  o P-selectina.

- 25 En un ejemplo, la preparación o composición presenta un contenido en sodio menor que 30%, 25%, 20%, 15%, 10%. En un ejemplo, la preparación o composición comprende: menos de 20 ppm, 15 ppm, 10 ppm, 5 ppm de yodo; menos de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% de azufre; menos de 50, 40, 30, 20, 15 ppm de boro.

- 30 Los métodos para preparar una preparación descrita en la presente memoria incluyen: combinar UFH y ácido nitroso (HONO) para producir una preparación de polisacárido y, después de tratamiento con ácido nitroso, llevar a cabo reacciones para producir una separación de glicol de al menos una porción de los restos de ácido urónico en la preparación.

Los métodos para preparar una preparación incluyen: despolimerización una UFH (por ej., por hidrólisis química o despolimerización enzimática) y, después de despolimerización, llevar a cabo reacciones para producir una separación de glicol de al menos una porción de los restos de ácido urónico en la preparación.

- 35 En un ejemplo, las reacciones para producir una separación de glicol de al menos una porción de los restos de urónico en la preparación incluyen oxidar la preparación de polisacárido con peryodato y reducir la preparación oxidada de polisacárido con borohidruro sódico. Por ejemplo, los métodos incluyen oxidar la preparación de polisacárido con peryodato durante aproximadamente 10-20 horas a una temperatura de aproximadamente 0-10°C y después de oxidación, reducir la muestra con borohidruro sódico durante aproximadamente 1 hora a un pH de aproximadamente 5,0-8,0 a una temperatura de aproximadamente 0-10°C.

- 40 Algunos métodos para fabricar una preparación descrita en la presente memoria incluyen: (1) despolimerización una heparina no fraccionada (UFH, por sus siglas en inglés) (por ej., por despolimerización de ácido nitroso, despolimerización hidrolítica o despolimerización enzimática) para proporcionar una preparación de polisacárido; (2) oxidar la preparación de polisacárido con peryodato; (3) reducir la preparación oxidada de polisacárido con borohidruro sódico y (4) aislar la preparación de polisacárido (por ej., por precipitación con una sal y un disolvente orgánico polar o someténdola a una separación cromatográfica o purificación), para preparar de ese modo una preparación.

En un ejemplo, la etapa de despolimerización incluye tratar la UFH con ácido nitroso aproximadamente 0,01 a 0,05 M (por ej., aproximadamente 0,02 a 0,04 M) a un pH de aproximadamente 2 a 4 durante aproximadamente 1 a 5 horas a una temperatura de aproximadamente 10 a 30°C.

En un ejemplo, la etapa de oxidación incluye tratar la preparación de polisacárido con peryodato aproximadamente 0,05 a 0,2 M durante aproximadamente 10 a 20 horas a una temperatura de aproximadamente 0 a 10°C.

5 En un ejemplo, la etapa de reducción comprende tratar la preparación oxidada de polisacárido con borohidruro sódico aproximadamente 0,5 a 2,0% (p/v) durante aproximadamente 0,5 a 3 horas a un pH de aproximadamente 6,0 a 7,0 y una temperatura de aproximadamente 0 a 10°C.

En un ejemplo, un método para preparar o fabricar una preparación de polisacárido incluye reducir la cantidad de boro en la preparación.

10 En un ejemplo, se evalúa la actividad biológica en la preparación, por ej., actividad anti-metastásica; unión a cualquiera de VEGF, FGF, HGF, HB-EGF, SDF-1 $\alpha$  y P-selectina o inhibición de una actividad de cualquiera de VEGF, FGF, HGF, HB-EGF, SDF-1 $\alpha$  y P-selectina.

15 Una preparación de polisacárido que carece de actividad anticoagulante sustancial, como se usa en la presente memoria, es una que presenta actividad anti-Xa y anti-IIa cada una menor que 100 UI/mg (por ej., menor que 80 UI/mg, 70 UI/mg o 60 UI/mg). En algunos casos, la preparación de polisacárido no presenta sustancialmente actividad anticoagulante, es decir, actividad anti-Xa y anti-IIa cada una menor que 50 UI/mg. En algunos casos, la preparación de polisacárido presenta actividad anti-Xa y anti-IIa cada una menor que 40, 30, 20, 25, 20, 15, 10, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg, 1 UI/mg o 0,5 UI/mg.

El grado de desulfatación, como se usa en la presente memoria, se define como el porcentaje de reducción en moles de sulfato por moles de unidad disacárida cuando se compara con heparina no fraccionada.

20 El grado de sulfatación, como se usa en la presente memoria, se define como el número promedio de moles de sulfato por moles de unidad disacárida.

25 También se desvela en la presente memoria un método para tratar a un individuo que incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de polisacárido desvelada en la presente memoria al individuo y evaluar la actividad de la preparación de polisacárido como se describe en la presente memoria. Los términos "tratar", "tratamiento" y similares, significan administrar la preparación a un individuo o una célula o tejido de un individuo para obtener un efecto farmacológico, fisiológico o clínico deseado. El tratamiento con una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria puede disminuir, reducir, mitigar, aliviar, retardar o evitar un estado no deseado existente o el comienzo o un síntoma del mismo. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el efecto farmacológico, fisiológico o clínico deseado en el individuo.

30 Los métodos para tratar a un individuo incluyen métodos para tratar a un individuo que tiene, o con riesgo de que tenga, enfermedad mediada por VEGF-, FGF-, SDF-1 $\alpha$ - y/o selectina; una enfermedad infecciosa o una enfermedad que implique angiogénesis.

35 En un ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria son útiles en los métodos para tratar a un individuo que tiene, o con riesgo de que tenga, un trastorno metastásico (por ej., un cáncer, por ej., un carcinoma u otro cáncer sólido y hematológico). En esos individuos, el tratamiento puede incluir, pero no se limita a, crecimiento de tumores inhibido, reducción en masa tumoral, reducción en tamaño o número de lesiones metastásicas, desarrollo inhibido de nuevas lesiones metastásicas, supervivencia prolongada, supervivencia sin progresión prolongada, tiempo prolongado para progresión y/o calidad de vida mejorada. En otro ejemplo, el individuo puede tener un trastorno o afección seleccionada del grupo que consiste en: un trastorno inflamatorio, una enfermedad autoinmunitaria, un trastorno fibrótico o fibroproliferativo o un trastorno atópico. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen pero no se limitan a enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, artritis reumatoide, enfermedad del intestino inflamado (incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), esclerosis múltiple, soriasis, revascularizaciones por isquemias, choque septicémico, degeneración macular relacionada con la edad, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad cardiovascular, vasculitis, diabetes de tipo I y II, síndrome metabólico, retinopatía diabética, reestenosis. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen pero no se limitan a: asma, artritis reumatoide, enfermedad del intestino inflamado, esclerosis múltiple, soriasis, diabetes de tipo I, lupus eritematoso sistémico (SLE, por sus siglas en inglés), síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, Síndrome de Guillain-Barré, hepatitis autoinmunitaria, Miastenia gravis. Los ejemplos de enfermedades fibróticas incluyen pero no se limitan a: esclerodermia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, nefropatía diabética, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis, fibrosis quística, neurofibromatosis, endometriosis, fibroides post-operatorios, reestenosis. Los ejemplos de enfermedad atópica incluyen pero no se limitan a: dermatitis atópica, asma atópica y rinitis alérgica. Las composiciones de la presente descripción se administran a un individuo que tiene o con riesgo de desarrollar una o más de las enfermedades en una cantidad eficaz para tratar el trastorno o afección.

55 En un ejemplo preferido, el individuo presenta o está con riesgo de tener, un cáncer o trastorno metastásico (por ej., un carcinoma). Por ejemplo, el individuo presenta un tumor primario y presenta o está en riesgo de tener, una metástasis de ese tumor primario.

En un ejemplo, la preparación de polisacárido se administra por vía intravenosa o por vía subcutánea o se inhala.

En un ejemplo, la preparación de polisacárido se administra junto con otro tratamiento, por ej. otro agente terapéutico, por ej., un agente citotóxico o citostático y combinaciones de los mismos. En un ejemplo, la preparación de polisacárido se administra junto con cirugía, radioterapia, un agente de quimioterapia, un anticuerpo o un inhibidor de tirosina cinasa. En un ejemplo, la preparación de polisacárido se administra a un individuo a una dosis de 5-50 mg/kg.

En un ejemplo, la preparación de polisacárido se administra de manera crónica, por ej., al menos dos veces sobre un periodo de tiempo específico, por ej., al menos dos veces durante un periodo de seis meses. En un ejemplo, una preparación de polisacárido se administra dos veces durante un periodo de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, seis meses, un año o incluso más tiempo. La preparación de polisacárido se puede administrar a diario (por ej. una vez, dos veces o tres o cuatro veces diarias), una sola vez cada dos días, semanalmente (por ej. una vez, dos veces o tres veces a la semana), una sola vez cada dos semanas, mensualmente o cualquier otro plan de administración crónica.

Para cualquiera de los intervalos descritos en la presente memoria, por ej., para una estructura o actividad determinada, los intervalos pueden ser los intervalos desvelados así como otros intervalos. Por ejemplo, un intervalo construido desde un extremo inferior de un intervalo, por ej., para un determinado bloque de construcción o actividad, se puede combinar con el extremo superior de otro intervalo, por ej., para el determinado bloque de construcción o actividad, para proporcionar un intervalo.

Una preparación "aislada" o "purificada" de polisacárido está sustancialmente exenta de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de células o tejido del que procede el polisacárido o sustancialmente exenta de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan de manera química. "Sustancialmente exenta" significa que una preparación es al menos 50% pura (p/p). En un ejemplo preferido, la preparación presenta menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% y más preferiblemente 5% (en peso seco), de polisacáridos no derivados de heparina, proteínas o precursores químicos u otros productos químicos, por ej., de fabricación. Estos también se refieren en la presente memoria como "contaminantes." Los ejemplos de contaminantes que pueden estar presentes en una preparación de polisacárido proporcionada en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, sodio, azufre, boro, enzima (por ej., una enzima heparinasa), metanol, etanol, yodo y cloruro.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una serie de gráficas que muestra las afinidades de unión de M402, M-ONC 202 y Dalteparina a diferentes proteínas de unión a heparina cuando se determina por Resonancia de Plasmones Superficiales.

La Figura 2 es un diagrama de barras que muestra el efecto de una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria en un modelo de metástasis experimental de melanoma de murina (B16F10 i. v.). Se determinó la carga tumoral pulmonar (peso de pulmón - peso de pulmón normal) para ratones hembra C57BL/6 (9-10 semanas) estimulados con inyección i. v. de  $2 \times 10^5$  células B16F10 y pretratados con una sola dosis (10 mg/kg) de M402 (lote R-1-5), dalteparina (Fragmin®) o M-ONC 202 (control negativo, polisacárido N-desulfatado) inmediatamente antes de inyección. "Normal" designa ratones no estimulados y no tratados.

La Figura 3 es un diagrama de barras que muestra la respuesta a la dosis en grupos de ratones C57BL/6 (n=12 por grupo) tratados con diferentes dosis de M402 (2 mg/kg, 6 mg/kg, 20 mg/kg y 60 mg/kg) seguido por inyección i v de  $2 \times 10^5$  células B16F10 en 5 min. El experimento terminó el Día 21 y la colonización tumoral para el pulmón se cuantificó por peso de pulmón. M402 inhibió la colonización tumoral de B16F10 para el pulmón de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 4 es un diagrama de barras que muestra el efecto de una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria en un modelo terapéutico 4T1 de metástasis de cáncer de mama en el pulmón. La carga tumoral pulmonar (peso de pulmón - peso de pulmón normal) se determinó el día 32 para ratones BALB/c hembra (8 semanas) estimulados con inyección en la almohadilla grasa intra-mamaria de  $8 \times 10^4$  células 4T1 y se trataron como se indica empezando el día 5.

La Figura 5 es una serie de gráficas que muestra el efecto de una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria en: A) células supresoras derivadas de mieloides (MDSC); B) plasma MMP-9 y C) niveles de G-CSF, en ratones que soportan tumores 4T1.

La Figura 6 es una serie de gráficas que muestra el efecto de una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria en movilización y reclutamiento de células estromales. A) M402 inhibió la migración de células Jurka inducida por SDF-1 $\alpha$  de una manera dependiente de la dosis. B) Citometría de flujo de muestras sanguíneas de ratones inyectados con disolución salina o G-CSF en presencia o ausencia de M402. C) El tratamiento de M402 redujo significativamente MDSC en la circulación en ratones que soportan tumores 4T1. \*, P<0,05, \*\*, P<0,01 por

ANOVA.

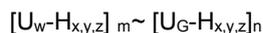
La Figura 7 es una gráfica que muestra el efecto de una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria sobre los niveles de expresión de MIG en ratones BALB/c a los que se inyectó disolución salina o la preparación de polisacárido a 20 mg/kg dos veces diarias durante 7 días.

5 **Descripción detallada**

Polisacáridos optimizados

10 En muchos marcos clínicos, se prefieren preparaciones de LMWH comercialmente disponibles sobre preparaciones de UFH como anticoagulantes debido a que las LMWH presentan farmacocinética más previsible y se pueden administrar por vía subcutánea. Sin embargo, debido al potencial para complicaciones de hemorragias debido a sus efectos anticoagulantes, las preparaciones de LMWH disponibles en la actualidad son menos adecuadas para el tratamiento de trastornos mediados sin coagulación y/o para trastornos que pueden requerir puede ores dosis o pautas posológicas crónicas. La presente descripción caracteriza preparaciones de polisacárido designadas para que carezcan de actividad anticoagulante sustancial mientras mantienen propiedades clínicamente ventajosas. Las propiedades de las preparaciones de polisacárido incluyen, por ej., que carecen de actividad anticoagulante sustancial, por ej., que tienen actividad sustancialmente no anticoagulante (por ej., actividad anti-IIa menor que 50 UI/mg, actividad anti-Xa menor que 50 UI/mg) y con actividad anti-metastásica, anti-angiogénica y/o anti-inflamatoria.

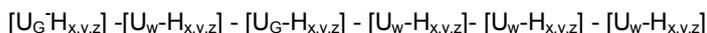
Ejemplos de dichas preparaciones de polisacárido incluyen cadenas que incluyen lo siguiente:



20 en la que U indica un resto de ácido urónico y H indica un resto hexosamina, en la que m y n son números enteros de manera que m = 6-18 y n = 1 -4, w = -2OS o -2OH, x = -NS o -NAC y = -3OS o -3OH, z = -6OS o -6OH,

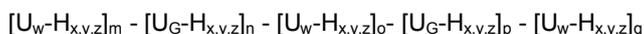


30 en la que el símbolo ~ indica que las unidades marcadas m y n se distribuyen a lo largo de la cadena de polisacárido y no están necesariamente en secuencia. Por ejemplo, la siguiente cadena de polisacárido está incluida por la fórmula anterior:

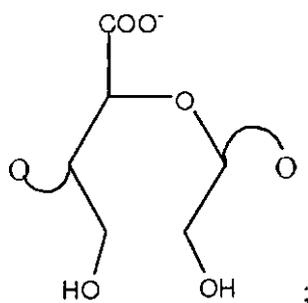


35 Además, cada una de w, x, y y z puede ser igual o diferente para cada caso de [U<sub>w</sub>-H<sub>x,y,z</sub>] y cada una de x, y y z puede ser igual o diferente para cada caso de [U<sub>G</sub>-H<sub>x,y,z</sub>]. Cada caso de U puede ser independientemente un ácido (I) idurónico o un ácido (G) glucurónico.

La preparación de polisacárido puede presentar una actividad anti-Xa y una actividad anti-IIa cada una menor que 50 UI/mg (por ej., una actividad anti-Xa menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg o de aproximadamente 0 a 50 UI/mg, aproximadamente 0 a 40 UI/mg, aproximadamente 0 a 30 UI/mg, aproximadamente 0 a 25 UI/mg, aproximadamente 0 a 20 UI/mg, aproximadamente 0 a 10 UI/mg, aproximadamente 0 a 5 UI/mg, aproximadamente 5 a 10 UI/mg, aproximadamente 5 a 15 UI/mg o aproximadamente 5 a 20 UI/mg y una actividad anti-IIa menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg o de aproximadamente 0 a 50 UI/mg, aproximadamente 0 a 40 UI/mg, aproximadamente 0 a 30 UI/mg, aproximadamente 0 a 25 UI/mg, aproximadamente 0 a 20 UI/mg, aproximadamente 0 a 10 UI/mg, aproximadamente 0 a 5 UI/mg, aproximadamente 5 a 10 UI/mg, aproximadamente 5 a 15 UI/mg o aproximadamente 5 a 20 UI/mg) y



en la que U indica un resto de ácido urónico y H indica un resto hexosamina, en la que m-r son números enteros de manera que m = 0-10, n = 0 -3, o = 0-10, p = 0-3; q = 0-10, w = -2OS o -2OH, x = -NS o -NAC, y = -3OS o -3OH, z = -6OS o -6OH,



5  
y  $U_G =$

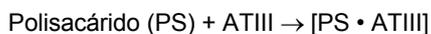
10 en la que w, x, y y z son cada una igual o diferente en cada unidad marcada m, n, o, p o q. En algunos casos, la suma de n + p es menor que o igual a 4 (por ej., menor que o igual a 3, 2, 1 ó 0). En algunos casos, la suma de n y p es 4, 3, 2 ó 1. En algunos casos, la suma de m, o y q está entre 4 y 18, por ej., 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13, 4-14, 4-15, 4-16 ó 4-17.

Además, cada una de w, x, y y z puede ser igual o diferente para cada caso de  $[U_w-H_{x,y,z}]$  y cada una de x, y y z puede ser igual o diferente para cada caso de  $[U_G-H_{x,y,z}]$ . Cada caso de U puede ser independientemente un ácido (I) idurónico o un ácido (G) glucurónico.

15 En algunos casos, la preparación presenta un peso molecular de cadena promedio ponderal entre 3.500 y 7.000 Da, por ej., 4.300 y 7.000 Da, 4.500 y 7.000 Da, 4.700 y 7.000 Da y 5.000 y 7.000 Da. La preparación de polisacárido puede presentar una actividad anti-Xa y una actividad anti-IIa cada una menor que 50 UI/mg (por ej., una actividad anti-Xa menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg o de aproximadamente 0 a 50 UI/mg, aproximadamente 0 a 40 UI/mg, aproximadamente 0 a 30 UI/mg, aproximadamente 0 a 25 UI/mg, aproximadamente 0 a 20 UI/mg, aproximadamente 0 a 10 UI/mg, aproximadamente 0 a 5 UI/mg, aproximadamente 5 a 10 UI/mg, aproximadamente 5 a 15 UI/mg o aproximadamente 5 a 20 UI/mg y una actividad anti-IIa menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg o de aproximadamente 0 a 50 UI/mg, aproximadamente 0 a 40 UI/mg, aproximadamente 0 a 30 UI/mg, aproximadamente 0 a 25 UI/mg, aproximadamente 0 a 20 UI/mg, aproximadamente 0 a 10 UI/mg, aproximadamente 0 a 5 UI/mg, aproximadamente 5 a 10 UI/mg, aproximadamente 5 a 15 UI/mg o aproximadamente 5 a 20 UI/mg).

#### Actividad anti-IIa

30 Se desvelan preparaciones de polisacárido en la presente memoria que proporcionan actividad anti-IIa sustancialmente reducida, por ej., actividad anti-IIa de aproximadamente, por ej., actividad anti-Xa de aproximadamente menor que aproximadamente 50 UI/mg, menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg o de aproximadamente 0 a 50 UI/mg, aproximadamente 0 a 40 UI/mg, aproximadamente 0 a 30 UI/mg, aproximadamente 0 a 25 UI/mg, aproximadamente 0 a 20 UI/mg, aproximadamente 0 a 10 UI/mg, aproximadamente 0 a 5 UI/mg, aproximadamente 5 a 10 UI/mg, aproximadamente 5 a 15 UI/mg o aproximadamente 5 a 20 UI/mg). La actividad anti-IIa se calcula en Unidades Internacionales de actividad anti-IIa por miligramo usando métodos estadísticos para ensayos de líneas paralelas. Los niveles de actividad anti-IIa descritos en la presente memoria se miden usando el siguiente principio.



IIa



45 La actividad anti-factor IIa se determina por la muestra potenciando el efecto sobre la antitrombina (ATIII) en la inhibición de trombina. El exceso de trombina se puede medir de manera espectrofotométrica indirectamente. La actividad anti-factor IIa se puede medir, por ej. En un analizador Diagnostica Stago o en un sistema de Coagulación ACL Futura3, con reactivos de Chromogenix (sustratos S-2238, Trombina (53 nkat/vial) y Antitrombina) o en cualquier sistema equivalente. Se calibra la respuesta del analizador usando el 2º Patrón Internacional para Heparina de Bajo Peso Molecular.

#### Actividad anti-Xa

50 Preferiblemente, una preparación de polisacárido proporcionada en la presente memoria presenta una actividad anti-Xa de aproximadamente 0 a 50 UI/mg, por ej., actividad anti-Xa de aproximadamente menor que aproximadamente 50 UI/mg, menor que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg, 5 UI/mg, 4 UI/mg, 3 UI/mg, 2 UI/mg o 1 UI/mg o de aproximadamente 0 a 50 UI/mg, aproximadamente 0 a 40 UI/mg, aproximadamente 0

a 30 UI/mg, aproximadamente 0 a 25 UI/mg, aproximadamente 0 a 20 UI/mg, aproximadamente 0 a 10 UI/mg, aproximadamente 0 a 5 UI/mg, aproximadamente 5 a 10 UI/mg, aproximadamente 5 a 15 UI/mg o aproximadamente 5 a 20 UI/mg). La actividad anti-Xa de una preparación se calcula en Unidades Internacionales de actividad anti-factor Xa por miligramo usando métodos estadísticos para ensayos de líneas paralelas. La actividad anti-factor Xa de preparaciones descritas en la presente memoria se mide usando el siguiente principio:



- 10 La actividad anti-factor Xa se determina por la muestra potenciando el efecto sobre la antitrombina (ATIII) en la inhibición de Factor Xa (FXa) activado. El exceso de Factor Xa se puede medir de manera espectrofotométrica indirectamente. La actividad anti-factor Xa se puede medir, por ej. en un analizador Diagnostica Stago con el estuche de Ensayo de Heparina Stachrom®, en un sistema de Coagulación ACL Futura3 con el Estuche de Heparina Coatest® de Chromogenix o en cualquier sistema equivalente. La respuesta del analizador se puede calibrar usando el Patrón Internacional NIBSC para Heparina de Bajo Peso Molecular.

Peso molecular y longitud de la cadena

- 20 Cuando se determina el peso molecular promedio ponderal de una preparación, un peso molecular promedio ponderal de aproximadamente 3.500 a 8.000 Da, aproximadamente 3.500 a 6.300 Da, preferiblemente aproximadamente 4.000 a 6.000 Da, aproximadamente 4.200 a 5.900 o aproximadamente 4.300 a 5.800 Da, indica que un número significativo de cadenas en la preparación de polisacárido es de longitud de cadena suficiente.

- "Peso molecular promedio ponderal " como se usa en la presente memoria se refiere al promedio en peso en daltons de cadenas de repeticiones de disacárido de ácido urónico/hexosamina. La presencia de bloques de construcción sin ácido urónico y/o sin hexosamina no se incluye en la determinación del peso molecular promedio ponderal. Así, el peso molecular de bloques de construcción sin ácido urónico y/o sin hexosamina en una cadena o cadenas en la preparación no se debería incluir en la determinación del peso molecular promedio ponderal. El peso molecular promedio ponderal ( $M_p$ ) se calcula a partir de la siguiente ecuación:  $M_p = \sum(c_i m_i) / \sum c_i$ . La variable  $c_i$  es la concentración del polímero en el fragmento  $i$  y  $m_i$  es el peso molecular del polímero en el fragmento  $i$ . Las sumas totales se toman por un pico cromatográfico, que contiene muchos fragmentos de datos. Se puede describir un fragmento de datos como una línea vertical en una representación gráfica de pico cromatográfico en función del tiempo. El pico de elución se puede dividir por lo tanto en muchos fragmentos. El cálculo del peso molecular promedio ponderal es promedio que depende de la suma total de todos los fragmentos de la concentración y el peso molecular. El peso molar promedio ponderal se puede medir, por ej., usando el programa informático Wyatt Astra o cualquier programa informático apropiado. Los pesos moleculares promedio ponderales descritos en la presente memoria se determinan por cromatografía líquida de alta resolución con dos columnas en serie, por ejemplo un TSK G3000 SWXL y un G2000 SWXL, acoplado a un detector de dispersión de la luz multi-ángulo (MALS, por sus siglas en inglés) y un detector refractométrico en serie. El eluyente usado es un sulfato de sodio 0,2 M, pH 5,0 y un caudal de 0,5 ml/min.

- 40 Se puede hacer una determinación de si una preparación de polisacárido incluye cadenas de suficiente longitud de la cadena, por ejemplo, por determinación de la longitud promedio de cadena de las cadenas en la preparación y/o por determinación del peso molecular promedio ponderal de cadenas en la preparación. Cuando se determina la longitud de la cadena promedio, una longitud de cadena promedio de aproximadamente 5 a 22, por ej., aproximadamente 7 a 18, típicamente aproximadamente 7 a 14 u 8 a 13 unidades de disacárido, indica que un número significativo de cadenas en la preparación es de longitud de cadena suficiente.

- 45 "Longitud de cadena promedio" como se usa en la presente memoria se refiere a la longitud de cadena promedio de repeticiones de disacárido de ácido urónico/hexosamina que se produce en una cadena. La presencia de bloques de construcción sin ácido urónico y/o sin hexosamina (por ej., restos PEG unidos) no se incluye en la determinación de la longitud de cadena promedio. La longitud de cadena promedio se determina dividiendo el peso molecular promedio numérico ( $M_n$ ) por el peso molecular promedio numérico para un disacárido (500 Da). Se describen métodos para determinar el peso molecular promedio numérico a continuación usando SEC MALS.

- 50 Ácidos urónicos separados de glicol.

- 55 Una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria puede incluir una abertura del anillo de glicósido, convencionalmente denominado derivados de reducción-oxidación (RO). En estas preparaciones, uno o más anillos de glicósidos con vicinil dioles que están abiertos, por ej., en el enlace entre C2 y C3, por medio de una acción de oxidación, seguido por una reducción. Los compuestos referidos en la presente memoria también se denominarán derivados "Separados de Glicol".

En un ejemplo más, los restos separados de glicol se prestan a funcionalización posterior. Por lo tanto, los compuestos también pueden soportar grupos iguales o diferentes, en vez de los grupos hidroxilo primarios que proceden de separación de glicol, por ejemplo, grupos aldehído, grupos metoxi o grupos oligosacárido o péptido, que oscilan de un solo sacárido o aminoácido a más de una unidad de longitud, por ej., 2 ó 3 unidades.

- 5 En algunos casos, menos de 50% de los restos de ácido urónico son restos de ácido urónico separados de glicol (por ej., menos de 40%, 30%, 25% o 20% de los restos de ácido urónico son restos de ácido urónico separados de glicol).

Estructuras de extremos reductores.

- 10 En algunos casos, al menos aproximadamente 50% de las cadenas en una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria presenta una estructura de extremo reductor modificada tal como un resto de 2,5-anhidromanosa o una 2,5-anhidromanosa que se ha reducido para formar un alcohol. En algunos casos, al menos aproximadamente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de las cadenas en la preparación presenta una estructura de extremo reductor modificada, de manera que el extremo reductor incluya un resto de 2,5-anhidromanosa o una 2,5-anhidromanosa que se ha reducido para formar un alcohol.

#### 15 Polidispersidad

La polidispersidad de preparaciones de polisacárido proporcionadas en la presente memoria es aproximadamente 2 o menor, por ej., 1,7 o menor, por ej., aproximadamente 1,7 ó 1,6 a 1,2, aproximadamente 1,4-1,5 y los números en medio.

- 20 El término "polidisperso" o "polidispersidad" se refiere al peso molecular promedio ponderal de una composición (Mp) dividido por el peso molecular promedio numérico (Mn). El peso molecular promedio numérico (Mn) se calcula a partir de la siguiente ecuación:  $Mn = \frac{\sum ci}{\sum ci/mi}$ . La variable ci es la concentración del polisacárido en el fragmento i y Mi es el peso molecular del polisacárido en el fragmento i. Las sumas totales se toman por un pico cromatográfico, que contiene muchos fragmentos de datos. Se puede describir un fragmento de datos como una línea vertical en una representación gráfica de pico cromatográfico en función del tiempo. El pico de elución se puede dividir por lo tanto en muchos fragmentos. El peso molecular promedio numérico es un cálculo que depende del peso molecular y la concentración a cada fragmento de datos. Se describieron métodos de determinación del peso molecular promedio ponderal anteriormente y se usaron para determinar polidispersidad también.

Métodos para preparar preparaciones de polisacárido.

- 30 También se consideran diversos métodos para preparar preparaciones de polisacárido, por ej., una preparación descrita en la presente memoria. Un método incluye proporcionar una preparación de heparina precursora con un peso molecular promedio ponderal mayor que 7.000 Da o una longitud de la cadena mayor que 7 a 18 disacáridos y tratar la preparación de heparina precursora (por ej., por despolimerización enzimática o química, por ej., por despolimerización de ácido nítrico) para obtener una preparación de polisacárido con un peso molecular promedio ponderal de aproximadamente 3.000 a 7.000 Da o una longitud de cadena promedio de aproximadamente 7 a 18 disacáridos. Por ejemplo, la preparación de heparina precursora puede ser heparina no fraccionada.

- 40 La preparación de heparina precursora se puede tratar por un método que comprende despolimerización (por ej., por tratamiento de ácido nítrico, hidrólisis o despolimerización enzimática) seguido por una reacción de separación de glicol. La despolimerización de ácido nítrico se puede llevar a cabo, por ej., por tratamiento de la preparación de heparina precursora (por ej., UFH) con ácido nítrico (por ej., ácido nítrico aproximadamente 0,02 a 0,04 M) a un pH de aproximadamente 2 a 4 durante un periodo de tiempo especificado (por ej., aproximadamente 1 a 5 horas) a una temperatura de aproximadamente 10 a 30°C. La reacción de separación de glicol implica oxidación de peryodato usando peryodato (por ej., peryodato de sodio aproximadamente 0,05 M a 0,2 M) durante aproximadamente 10 a 20 horas a una temperatura de aproximadamente 0 a 10°C. En algunos casos, las impurezas residuales tales como sales o dietilenglicol (DEG) se pueden retirar con posterioridad por un método cromatográfico, por ej., cromatografía de filtración en gel. Opcionalmente, la preparación oxidada se reduce después por tratamiento con un agente reductor (por ej., borohidruro sódico de aproximadamente 0,5 a 2,0% (p/v)) durante aproximadamente 0,5 a 3 horas a un pH de aproximadamente 6,0 a 7,0 y una temperatura de aproximadamente 0 a 10°C.

- 50 Se puede tratar una preparación de heparina precursora usando digestión enzimática, digestión química o combinaciones de las mismas. Los ejemplos de digestión química incluyen despolimerización oxidativa, por ej., con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o Cu<sup>+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, escisión desaminativa, por ej., con nitrito de isoamilo o ácido nítrico, escisión β-eliminativa, por ej., con éster bencílico y/o por tratamiento alcalino. La digestión enzimática puede incluir el uso de una o más enzimas de degradación de heparina. Por ejemplo, la enzima o las enzimas de degradación de heparina pueden ser, por ej., una o más heparinasa, heparina liasa, sulfato de heparina - glucoaminoglucano (HSGAG, por sus siglas en inglés) liasa, una liasa descrita como una glucoaminoglucano (GAG) liasa que puede degradar también la heparina.
- 55 Preferiblemente, la enzima escinde a uno o más enlaces glucosídicos de ácidos urónicos no sulfatados.

Actividades biológicas

Las preparaciones descritas en la presente memoria presentan actividad anti-metastásica como se determina en un modelo animal de metástasis en que células de melanoma B16F10 inyectadas en las venas de la cola de ratones C57/BL se detienen en los pulmones y proliferan como focos pulmonares discretos. Este ensayo se describe en general en Gabri et al, 2.006, Clin. Cancer Res., 12: 7.092-98. Una preparación puede presentar adicionalmente actividad en otros modelos experimentales de metástasis, incluyendo el ensayo C170HM2, en que se inyectaron Estirpes celulares de cáncer colorrectal humanas C170HM2 en la cavidad peritoneal, en el caso de que el sitio principal de metástasis sea al hígado. Las preparaciones descritas en la presente memoria también pueden mostrar actividad anti-metastásica en modelos espontáneos de metástasis, tales como el modelo AP5LV, en que se implantan células de cáncer colorrectal humanas de AP5LV en la pared peritoneal y presentan metástasis espontánea al pulmón o el modelo 4T1, en que células de carcinoma de mama murino 4T1 implantadas en la almohadilla grasa mamaria presentan metástasis espontánea al pulmón y otros órganos.

Las preparaciones descritas en la presente memoria se pueden unir a y/o modular (por ej., inhibir) una actividad de uno o más de VEGF, FGF, HGF, HB-EGF, SDF-1 $\alpha$  y P-selectina. En algunos casos, se puede ensayar la interacción de la preparación con (por ej., unión a) una proteína diana (por ej., VEGF, FGF, HGF, HB-EGF, SDF-1 $\alpha$  y P-selectina), por ej., in vitro, por ej., usando métodos conocidos en la técnica. Son conocidos numerosos métodos y técnicas para detectar unión o modulación (por ej., inhibición) de actividad, por ej., ensayos de competición de receptores clásicos, transferencia de energía de fluorescencia (FET, por sus siglas en inglés), transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés) (véanse, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.631.169; la Patente de EE.UU. N° 4.868.103) y polarización de fluorescencia (FP, por sus siglas en inglés). En algunos casos, evaluar la unión de una preparación de polisacárido a una proteína diana puede incluir un seguimiento en tiempo real de la interacción de la unión, por ej., usando Biomolecular Interaction Analysis (BIA) (véase, por ej., Sjolander y Urbaniczky (1.991) Anal. Chem., 63: 2.338-2.345 y Szabo et al. (1.995) Curr. Opin. Struct. Biol., 5: 699-705). La resonancia de plasmones superficiales o "BIA" detecta interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin etiquetar a ninguno de los que interactúan (por ej., BIAcore).

Las actividades de VEGF, FGF, HGF, HB-EGF, SDF-1 $\alpha$  y P-selectina en células in vitro e in vivo son conocidas en la técnica. La capacidad de una preparación de polisacárido para modular (por ej., inhibir) una actividad de VEGF, FGF, HGF, HB-EGF, SDF-1 $\alpha$  y P-selectina se puede ensayar in vitro o en un ensayo a base de células o in vivo en un organismo. Por ejemplo, se puede ensayar la capacidad de una preparación de polisacárido para modular (por ej., inhibir) la actividad de VEGF, FGF, HGF, HB-EGF, SDF-1 $\alpha$  y P-selectina para modular (por ej., estimular) la proliferación de células endoteliales, por ej., células epiteliales de la vena umbilical humana. Se pueden encontrar métodos ejemplares para determinar la modulación de actividad FGF en la Patente de EE.UU. N° 5.733.893. Se puede realizar un ensayo a base de células usando una sola célula o una colección de al menos dos o más células. La célula puede ser una célula de levadura (por ej., *Saccharomyces cerevisiae*) o una célula de mamífero, por ej., una estirpe celular.

#### 35 Composiciones farmacéuticas

Se proporcionan composiciones, por ej., composiciones farmacéuticamente aceptables, que incluyen una preparación descrita en la presente memoria, formuladas junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier o a todos los disolventes, medios de dispersión, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles con administración parenteral. El portador puede ser adecuados para cualquier administración parenteral, por ej., administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, rectal, inhalada o espinal (por ej., por inyección o infusión intravenosa).

Las composiciones de esta descripción pueden ser de una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas líquidas, semi-sólidas y sólidas, tales como disoluciones líquidas (por ej., disoluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones y liposomas. La forma preferida depende del modo deseado de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en la forma de disoluciones inyectables e infusibles. El modo preferido de administración es parenteral (por ej., intravenosa, subcutánea, intraocular, intraperitoneal, intramuscular). En un ejemplo preferido, la preparación se administra por infusión intravenosa o inyección. En otro ejemplo preferido, la preparación se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usa en la presente memoria significa modos de administración distintos de administración entérica y tópica, normalmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intravítrea, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, inhalada, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intrasternal.

Las composiciones terapéuticas deberían ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenaje. La composición se puede formular como una disolución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura solicitada adecuada a alta concentración. Se pueden preparar disoluciones inyectables estériles por incorporación del compuesto activo (es decir, preparación de polisacárido) en la cantidad requerida en un disolvente

apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, cuando se requiera, seguido por esterilización filtrada. En general, se preparan dispersiones por incorporación del compuesto activo en un vehículo inerte que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado a vacío y liofilización que proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una disolución filtrada estéril previamente del mismo. La fluidez apropiada de una disolución se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede producir incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, diversos polímeros, sales de monoestearato y gelatina.

Para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/el modo de administración preferido es inyección intravenosa o infusión intravenosa. Como apreciará el experto, la ruta y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma farmacéutica unitaria, por ej., en ampollas, jeringas, plumas inyectoras o en envases multi-dosis, por ej., con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

Para administración por inhalación, la preparación se puede suministrar convenientemente en la forma de una presentación en aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ej., gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Además, las formulaciones en polvo secas para tratamiento por inhalación están dentro del alcance de la invención. Dichas formulaciones en polvo secas se pueden preparar como se desvela, por ej., en la patente internacional WO 02/32406.

Además de las composiciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de medicamento de liberación lenta. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender portadores o excipientes en fase sólida o de gel adecuados. Las composiciones se pueden incluir en un envase, paquete o dispensador junto con instrucciones para administración.

La preparación también se puede administrar con dispositivos de implantación a corto o largo plazo, por ej., un stent. La preparación se puede implantar por vía subcutánea, se puede implantar en tejidos u órganos (por ej., la arteria coronaria, la arteria carótida, la arteria renal y otras arterias periféricas, venas, riñón, corazón córnea, cuerpo vítreo, cerebro, etc.) o se puede implantar en espacios fisiológicos alrededor de tejidos y órganos (por ej., cápsula renal, pericardio, espacio torácico o peritoneal).

La preparación también se puede usar para revestir diversos dispositivos médicos. Por ejemplo, la preparación se puede usar para revestir un stent o circuito extracorpóreo. Dichas formulaciones de las preparaciones pueden incluir usar, por ej., perlas de liberación controlada, geles o microesferas así como diversos polímeros tales como PLGA, celulosa, alginato u otros polisacáridos.

Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede ser reducida o aumentada de manera proporcional como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso para formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de unidad de dosificación como se usa en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los individuos que se tienen que tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se tenga que conseguir y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de mezcla de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Se tiene que observar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la importancia de la afección que se tiene que aliviar. También se tiene que entender además que para cualquier individuo particular, las pautas posológicas específicas se deberían ajustar con el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o que supervisa la administración de las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden incluir una cantidad terapéuticamente eficaz de

una preparación. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la preparación puede variar según factores tales como la condición patológica, edad, sexo y peso del individuo y pueden incluir más de una dosis unitaria. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la preparación está sobrepasado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede inhibir un parámetro medible, por ej., actividad de VEGF, actividad de FGF, actividad de HGF, actividad de HB-EGF, actividad de SDF-1 $\alpha$ , actividad de P-selectina o tamaño o velocidad de crecimiento de lesiones metastásicas, por ej., por al menos aproximadamente 20%, más preferiblemente por al menos aproximadamente 25%, 30%, 40%, incluso más preferiblemente por al menos aproximadamente 50%, 60% y aún más preferiblemente por al menos aproximadamente 70%, 80% en relación a individuos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir un parámetro medible, por ej., metástasis o angiogénesis, se puede evaluar en un sistema modelo animal o en un ser humano (por ej., en un modelo pre-clínico o un estudio clínico). Alternativamente, se puede evaluar una propiedad de una composición por examen de la actividad del compuesto en un ensayo *in vitro*. Las dosis ejemplares para administración intravenosa o subcutánea de la preparación de polisacárido son aproximadamente 0,03 mg/kg a 0,45 mg/kg, por ej., 0,03 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,22 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,27 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,37 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,44 mg/kg, preferiblemente aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,44 mg/kg, 0,47 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,60 mg/kg, 0,7 mg/kg, preferiblemente aproximadamente 0,30 a 0,50 mg/kg, por ej., 0,30 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,42 mg/kg, 0,44 mg/kg, 0,47 mg/kg o 0,50 mg/kg. En algunos casos, la preparación de polisacárido se puede administrar a una dosis entre 1-80 mg/kg, entre 1-40 mg/kg, entre 1-30 mg/kg, por ej., entre 5-50 mg/kg/día.

## 20 Detección de biomarcadores

Las preparaciones de polisacárido descritas en la presente memoria se pueden evaluar por medida del nivel de uno o más biomarcadores, por ej., después de administración de una preparación de polisacárido a un individuo. Los biomarcadores (también denominados "marcadores biológicos") son características biológicas que se pueden medir objetivamente y evaluar como indicadores de procedimientos biológicos, por ej., como indicadores de un procedimiento patógeno y/o de una respuesta a una intervención terapéutica.

Un biomarcador es virtualmente cualquier compuesto biológico, tal como un tipo específico de célula, una proteína o un fragmento de la misma, un péptido, un polipéptido, un proteoglicano, una glucoproteína, una lipoproteína, un carbohidrato, un lípido, un ácido nucleico, un compuesto químico orgánico o inorgánico, un polímero natural o una molécula pequeña, que esté presente en la muestra biológica y que se puede aislar de o medir en, la muestra. Los marcadores biológicos pueden reflejar una variedad de características de la enfermedad, incluyendo el nivel de exposición a un desencadenante medioambiental o genético, un elemento del propio proceso de la enfermedad, una fase intermedia entre exposición y comienzo de la enfermedad, un factor independiente asociado a la condición patológica pero no causante de patogénesis. Como tal, un biomarcador puede ser indicativo de la actividad (por ej., de la eficacia) de una intervención terapéutica.

Se puede usar una variedad de métodos para determinar el nivel de un biomarcador de interés, por ej., un biomarcador descrito en la presente memoria. En general, estos métodos incluyen poner en contacto una muestra (in vitro o in vivo) con una sonda para el biomarcador. En algunos casos, la sonda es un detector, tal como un detector para un tipo de célula (por ej., análisis FACS). En algunos casos, la sonda es un agente que se une selectivamente al biomarcador, tal como un anticuerpo, con una muestra para evaluar el nivel de biomarcador en la muestra. En un ejemplo, el anticuerpo incluye una etiqueta detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Se puede usar un anticuerpo intacto o un fragmento del mismo (por ej., Fab o F(ab')<sub>2</sub>). El término "etiquetado," con respecto a la sonda o anticuerpo, se destina que incluya etiquetamiento directo de la sonda o anticuerpo por acoplamiento (es decir, unión de manera física) a una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como etiquetamiento indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con una sustancia detectable.

Los métodos de detección se pueden usar para detectar un biomarcador en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Las técnicas in vitro para detección de biomarcadores incluyen inmunoanálisis ligados a enzimas (los ELISA), inmunoprecipitaciones, inmunofluorescencia, inmunoensayos enzimáticos (EIA), radioinmunoensayos (RIA), análisis por el método Western y citometría de flujo. Las técnicas *in vivo* para detección de biomarcadores incluyen introducir en un individuo un anticuerpo etiquetado que es específico para el biomarcador de interés. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser etiquetado con un marcador radioactivo, por ej., un radioisótopo, cuya presencia y posición en un individuo se puede detectar por técnicas de formación de imágenes clásicas.

En algunos casos, se pueden medir los niveles estromales tumorales de un biomarcador de interés, por ej., por medición de un lisato tumoral o un cultivo tumoral.

## Usos

Las preparaciones de polisacárido se pueden usar para tratar a un individuo. Como se usa en la presente memoria, un individuo es un mamífero, por ej., un mamífero experimental no humano, un mamífero veterinario o un ser humano. Los mamíferos no humanos incluyen un primate, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o roedor.

Las preparaciones proporcionadas en la presente memoria se pueden usar, por ejemplo, para tratar o evitar un

trastorno metastásico (por ej., un cáncer, por ej., un carcinoma u otro cáncer sólido o hematológico). Como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" significa que incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células transformadas de manera maligna, tejidos u órganos, con independencia de tipo histologicopatológico o fase de invasividad. Los métodos y composiciones desvelados en la presente memoria son útiles en particular para tratar o reducir el tamaño, números o velocidad de crecimiento de, lesiones metastásicas asociadas a cáncer.

Ejemplos de tumores cancerígenos incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos, tumores de tejido blando, tumores hematopoyéticos y lesiones metastásicas. Ejemplos de tumores sólidos incluyen tumores malignos, por ej., sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas, de los diversos sistemas de órganos, tales como los que afectan a la cabeza y cuello (incluyendo faringe), tiroides, pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas o de células no pequeñas), mama, linfoide, gastrointestinal (por ej., oral, esofágico, estómago, hígado, páncreas, intestino delgado, colon y recto, canal anal), genitales y tracto genitourinario (por ej., renal, urotelial, vejiga, ovario, útero, cervical, endometrial, próstata, testicular), SNC (por ej., células neurales o gliales, por ej., neuroblastoma o glioma), piel (por ej., melanoma). Ejemplos de tumores cancerígenos hematopoyéticos que se pueden tratar incluyen mieloma múltiple, linfomas y leucemias y mielodisplasia. Métodos y composiciones desvelados en la presente memoria son en particular útiles para tratar, por ej., reducir o retardar, las lesiones metastásicas asociadas a los tumores cancerígenos mencionados. En algunos casos, el paciente habrá experimentado una o más eliminaciones quirúrgicas de un tejido, quimioterapia u otro tratamiento anti-cáncer y la diana primaria o única serán lesiones metastásicas, por ej., metástasis en el hueso o ganglios linfáticos o pulmón o hígado o cavidad peritoneal o el SNC u otros órganos.

Los métodos de la presente descripción, por ej., métodos de tratamiento, pueden incluir además la etapa para vigilar al individuo, por ej., para un cambio (por ej., un aumento o disminución) en uno o más de: tamaño del tumor; niveles de un marcador de cáncer, para un paciente con cáncer; el tamaño o evaluación del aspecto de nuevas lesiones, por ej., en un explorador con escáner; el aspecto de nuevos síntomas relacionados con la enfermedad; el tamaño de masa de tejido blando, por ej., una disminución o estabilización; calidad de vida, por ej., cantidad de dolor asociado a enfermedad, por ej., dolor óseo o cualquier otro parámetro relacionado con resultado clínico. El individuo puede ser vigilado en uno o más de los siguientes periodos: previamente a comienzo de tratamiento; durante el tratamiento o después de que se haya administrado uno o más elementos del tratamiento. Se puede usar vigilancia para evaluar la necesidad de tratamiento adicional con la misma preparación o para tratamiento adicional con agentes adicionales. En general, una disminución en uno o más de los parámetros descritos anteriormente es indicativa de la afección mejorada del individuo.

Las preparaciones descritas en la presente memoria se pueden administrar a un individuo en dosis únicas o múltiples para tratar o evitar un trastorno metastásico o canceroso, por ej., un trastorno canceroso descrito en la presente memoria.

Las preparaciones descritas en la presente memoria también se pueden usar para tratar trastornos inflamatorios, autoinmunitarios, fibróticos, fibroproliferativos, atópicos o angiogénicos. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, artritis reumatoide, enfermedad del intestino inflamado (incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), esclerosis múltiple, soriasis, revascularizaciones por isquemias, choque septicémico, degeneración macular relacionada con la edad, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad cardiovascular, vasculitis, diabetes de tipo I y II, síndrome metabólico, retinopatía diabética, reestenosis. Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, asma, artritis reumatoide, enfermedad del intestino inflamado, esclerosis múltiple, soriasis, diabetes de tipo I, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, hepatitis autoinmunitaria, Miastenia gravis. Ejemplos de enfermedades fibróticas incluyen, pero no se limitan a, esclerodermia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, nefropatía diabética, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis, fibrosis quística, neurofibromatosis, endometriosis, fibroides post-operatorios, reestenosis. Ejemplos de enfermedad atópica incluyen, pero no se limitan a, dermatitis atópica, asma atópica y rinitis alérgica.

Ejemplos de trastornos fibroproliferativos incluyen esclerodermia sistémica y local, queloides y cicatrices hipertróficas, aterosclerosis, reestenosis, fibrosarcoma, neurofibromatosis y artritis reumatoide. Ejemplos de cicatrización asociada a trauma incluyen cicatrización debido a cirugía, fibrosis inducida quimioterapéutica, fibrosis inducida por radiación, cicatrización asociada a lesión o quemaduras.

En un ejemplo, las preparaciones de polisacárido se usan para inhibir angiogénesis, por ej., para tratar trastornos angiogénicos. Angiogénesis como se usa en la presente memoria es la formación inapropiada de nuevos vasos sanguíneos. Los trastornos angiogénicos incluyen, pero no se limitan a, tumores, trastornos neovasculares del ojo, endometriosis, degeneración macular, osteoporosis, soriasis, artritis, cáncer y trastornos cardiovasculares. Se entiende que algunos trastornos estarán dentro de más de una categoría de enfermedad descrita en la presente memoria.

Las preparaciones descritas en la presente memoria también se pueden usar para tratar o evitar trastornos infecciosos tales como, por ej., malaria.

### Tratamiento asociado

Los métodos y las composiciones de la presente descripción se pueden usar en asociación con otras modalidades terapéuticas. Administrado "en asociación", como se usa en la presente memoria, significa que se suministran dos (o más) tratamientos diferentes al individuo durante el transcurso de la afección del individuo con el trastorno, de manera que los efectos de los tratamientos en el paciente se solapan en un instante del tiempo. En algunos casos, el suministro de un tratamiento aún tiene lugar cuando el suministro del segundo empieza, a fin de que haya solapamiento en términos de administración. Esto a veces se refiere en la presente memoria como "suministro simultáneo" o "concurrente." En otros casos, el suministro de un tratamiento termina antes de que empiece el suministro del otro tratamiento. En algunos casos de cualquier caso, el tratamiento es más eficaz debido a administración asociada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más eficaz, por ej., se observa un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento o el segundo tratamiento reduce los síntomas en una mayor extensión, que se observaría si se administrara el segundo tratamiento en ausencia del primer tratamiento o se observa la situación análoga con el primer tratamiento. En algunos casos, el suministro es de manera que la reducción en un síntoma u otro parámetro relacionado con el trastorno es mayor que lo que se observaría con un tratamiento suministrado en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, completamente aditivo o mayor que aditivo. El suministro puede ser de manera que un efecto del primer tratamiento suministrado sea aún detectable cuando se suministra el segundo.

En un ejemplo, los métodos incluyen administrar al individuo una preparación descrita en la presente memoria, junto con uno o más tratamientos adicionales, por ej., cirugía, terapia de radiación o administración de otra preparación terapéutica. En un ejemplo, el tratamiento adicional puede incluir quimioterapia, por ej., un agente citotóxico. En un ejemplo, el tratamiento adicional puede incluir un tratamiento diana, por ej., un inhibidor de tirosina cinasa, un inhibidor de proteasoma, un inhibidor de proteasa. En un ejemplo, el tratamiento adicional puede incluir un compuesto anti-inflamatorio, anti-angiogénico, anti-fibrótico o anti-proliferativo, por ej., un esteroide, un inmunomodulador biológico, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un aptámero, un ARNsi, una molécula antisentido, una proteína de fusión, una citocina, un receptor de citocina, un broncodilatador, una estatina, un agente anti-inflamatorio (por ej., metotrexato), un AINE. En otro ejemplo, el tratamiento adicional podría incluir combinar terapéutica de diferentes clases. La preparación de polisacárido y el tratamiento adicional se pueden administrar de manera simultánea o de manera secuencial.

Agentes citotóxicos ejemplares que se pueden administrar junto con la preparación de polisacárido incluyen agentes antimicrotúbulos, inhibidores de topoisomerasa, antimetabolitos, síntesis de proteínas e inhibidores de la degradación, inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, agentes platinados, inhibidores de la síntesis de ácido nucleico, histona deacetilasa e inhibidores de ADN metiltransferasa, mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, etileniminas, sulfonatos de alquilo, triazenos, análogos de folato, análogos de nucleósidos, inhibidores de la ribonucleótido reductasa, alcaloides de la vinca, taxanos, epotilonos, agentes de intercalación, agentes capaces de interferir con una ruta de transducción de la señal, agentes que fomentan la muerte celular programada y radiación, conjugados de anticuerpos que unen proteínas superficiales para suministrar un agente tóxico. En un ejemplo, el agente tóxico que se puede administrar con una preparación descrita en la presente memoria es platino, ciclofosfamida, dacarbazina, metotrexato, fluorouracilo, gemcitabina, capecitabina, hidroxiaurea, topotecán, irinotecán, azacitidina, vorinostat, ixabepilona, bortezomib, taxanos (paclitaxel, docetaxel), citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, vinorelbina, colchicina, antraciclinas (doxorubicina y epirubicina) daunorubicina, dihidroxiantracinaodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, adriamicina, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, ricina y maytansinoides.

El tratamiento asociado también puede incluir una composición de la presente descripción coformulada con, y/o coadministrada con, uno o más agente terapéuticos adicionales, por ej., uno o más agentes anti-cáncer, agentes citotóxicos o citostáticos, tratamiento con hormonas, inhibidores de moléculas pequeñas de receptores tirosina cinasas y otras tirosina cinasas incluyendo HER-2, EGFR, VEGFR, BCR-ABL, c-KIT (tal como Gefitinib, Erlotinib, Lapatinib, Sorafenib, Sunitinib, Imatinib, Dasatinib, Nilotinib) o mTOR (tales como temsirolimus, everolimus, rapamicina) o citocinas o quimocinas, vacunas, anticuerpos contra rutas de receptores de membrana celular incluyendo EGF-EGFR, VEGF-VEGFR, CD19, CD20, CD3, CTLA-4 (tal como Trastuzumab, Cetuximab, Panitumumab, Bevacizumab, Rituximab, Tositumomab) y/u otros inmunotratamientos.

### Otras realizaciones

Esta invención se ilustra además por los siguientes ejemplos que no se deberían interpretar como limitantes.

### Ejemplos

55 Ejemplo 1: Preparación de una preparación de polisacárido.

Este ejemplo describe la producción de una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria.

Visión general: Se generó alcohol de heparina de bajo peso molecular Separado de Glicol (GS-LMWH-CH<sub>2</sub>-OH) de heparina no fraccionada (UFH) por despolimerización controlada de ácido nitroso seguido por separación de glicol

oxidativa y posterior reducción a un alcohol. En la primera etapa, se despolimerizó UFH para obtener heparina despolimerizada (DPH-CHO) con un resto de anhidromanosa en el extremo reductor del polisacárido. Esto fue seguido por escisión oxidativa de la Etapa II de los 2, 3-dioles presentes en la heparina despolimerizada con peryodato de sodio para generar restos separados de glicol de anillo abierto junto con la cadena de heparina (GS-DPH-CHO). La Etapa III implicó una etapa de reducción, en la que los restos aldehídicos se convierten en alcoholes usando borohidruro sódico para generar alcohol de heparina de bajo peso molecular Separado de Glicol.

Visión general del método:

Los siguientes párrafos describen la preparación y las propiedades de una preparación de polisacárido descrita en la presente memoria.

#### 10 1. Despolimerización:

Se disolvió Heparina no fraccionada (10 g) en 100 ml de agua desionizada equilibrada a temperatura ambiente. El pH de esta disolución se disminuyó con posterioridad a pH 3,1, después de que se añadió nitrito de sodio (0,03 M). Se dejó con agitación la disolución de la reacción durante 3 horas después de que se neutralizara el pH previamente a adición de cloruro de sodio (10 g). Después de disolución completa de sal, se añadió metanol (200 ml) a esta disolución con agitación constante. Se envejeció después el precipitado obtenido a 6°C durante 2 horas. Después se filtró y se secó este precipitado para obtener DPH en rendimiento del 80-85% y que poseía las siguientes características:

Mp: 5.300-6.100

Distribución de Mp: (i) <3.000 Daltons: 23-30%  
 20 (ii) 3.000-8.000 Daltons: 50-55%  
 (iii) >8.000 Daltons: 15-22%

Actividad Anti-Xa : 80-120 UI/mg

Actividad Anti-IIa : 40-70 UI/mg

#### 2. Oxidación de peryodato

25 El aldehído (5 g) obtenido en la Etapa I se disolvió en 50 ml de agua equilibrada a 5°C. A esta disolución se añadió disolución de NaIO<sub>4</sub> enfriada (0,1 M, 50 ml) y se dejó con agitación la mezcla de reacción en ausencia de luz durante 16 horas. A la terminación, se enfrió rápidamente la reacción por la adición de dietilenglicol (10 ml), después de lo que la temperatura se elevó de vuelta a temperatura ambiente. Se añadieron después cinco gramos de cloruro de sodio a esta disolución, seguido por adición de 150 ml de metanol para precipitar la heparina. Se dejó envejecer el precipitado a 6°C durante 2 horas antes de filtración y secado para proporcionar un polisacárido separado de glicol (rendimiento del 95-98%) con las siguientes características:

Mp: 5.000-5.800

Distribución de Mp: (i) <3.000 Daltons: 25-30%  
 35 (ii) 3.000-8.000 Daltons: 55-60%  
 (iii) >8.000 Daltons: 15-20%

#### 3. Reducción

40 El polisacárido separado de glicol (4 g) obtenido anteriormente en la Etapa II se disolvió en 40 ml de agua mantenida a 5°C. A esta disolución se añadió borohidruro sódico (0,4 g) y se agitó la mezcla de reacción con posterioridad durante 1 hora. Después de 1 hora, se llevó la mezcla de reacción a temperatura ambiente, seguido por la adición de cloruro de sodio (4 g). Después de disolución de la sal, se añadió metanol (80 ml) a esta disolución acompañado de agitación constante. El precipitado así obtenido se dejó envejecer a 6°C durante 2 horas antes de filtración y secado para proporcionar el producto deseado. Se obtuvo así una preparación de polisacárido con las siguientes características con el rendimiento de 55-60%:

Mp: 5.500-6.200

45 Distribución de Mp: (i) <3.000 Daltons: 17-23%  
 (ii) 3.000-8.000 Daltons: 56-62%  
 (iii) >8.000 Daltons: 17-22%

Actividad Anti-Xa : 5-20 UI/mg

Actividad Anti-IIa : 1-10 UI/mg

Ejemplo 2: Propiedades anti-metastásicas de preparaciones de polisacárido.

5 Este ejemplo muestra que las preparaciones de polisacárido presentan actividad anti-cáncer y anti-metastásica en múltiples modelos de metástasis.

Modelo A: Modelo de metástasis experimental de melanoma de murina (B16F10 iv)

Una preparación de polisacárido producida como se describe en el Ejemplo 1 (referida en la presente memoria como "M402") mostró actividad anti-metástasis en un modelo de metástasis experimental de melanoma de murina.

10 Se trataron ratones C57BL/6 hembra (9-10 semanas) una sola vez con una sola dosis (10 mg/kg) de M402, dalteparina/Fragmin® (una LMWH que se ha indicado que disminuye metástasis) o M-ONC 202 (control negativo, polisacárido N-desulfatado) inmediatamente antes de inyección i. v. de  $2 \times 10^5$  células B16F10. Se sacrificaron los ratones el día 21 y se calculó la carga tumoral como peso de pulmón - peso de pulmón normal. Como se muestra en la Figura 1, M402 inhibió significativamente la colonización de B16F10 del pulmón en relación a un control mezclado (no tratado).

15 Modelo B: Metástasis de cáncer de colon al hígado

M402 mostró actividad anti-metástasis profiláctica en un modelo de metástasis de hígado ortotópico.

Se inició metástasis de hígado por inyección intraperitoneal de células de tumor colorrectal humanas C170HM2 en ratones atímicos desnudos MF1 (nu/nu). Se usó 5FU/leucovorina como un control positivo.

20 Se mantuvieron células C170HM2 in vitro en medio de cultivo RPMI (Sigma) que contenía suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (v/v) y L-glutamina 2 mM a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% y condiciones humidificadas. Se recogieron células de monocapas sub-confluentes con AEDT al 0,025%, se lavó en medio de cultivo y se re-suspendió en disolución salina tamponada con fosfato estéril, pH 7,4 (PBS) durante administración in vivo. Se inyectaron de manera intraperitoneal  $1,5 \times 10^6$  células en un volumen de 1 ml en 65 ratones y se repartieron los ratones en grupos de tratamiento como a continuación.

Grupo 1: n = 10 Control de vehículo

Grupo 2: n = 10 25 mg/kg de 5FU/leucovorina i. v. ciclada los días 1, 3, 5, 7

Grupo 3: n = 10 5 mg/kg de compuesto 1 (Dalteparina) s.c. una sola vez al día

Grupo 4: n = 10 5 mg/kg de compuesto 2 (M402) s.c. una sola vez al día

Grupo 5: n = 10 15 mg/kg de compuesto 2 s.c. una sola vez al día

Grupo 6: n = 10 30 mg/kg de compuesto 2 s.c. una sola vez al día

Grupo 7: n = 5 No tratado

25 Se inició el tratamiento el día 1 después de inyección de células y continuó hasta el día 35 o hasta que el estado clínico del animal requirió la terminación. Los grupos 5 y 6 carecieron de una dosis el día 5. No se observaron efectos adversos de los compuestos de ensayo en ratones que soportaban los tumores.

30 Se terminó el estudio el día 35 y se tomaron escisiones de los tumores en el hígado y se pesaron. También se contaron los números de nódulos del pulmón. Los pesos de tumores de hígado medios y las áreas transversales se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Modelo C170HM2 : sumario de peso de tumores de hígado medios y análisis estadístico.

Grupo	Tratamiento	Peso de tumores medios			Área de tumores medios		
		(g)	(% de vehículo)	ANOVA de una cola	(mm <sup>2</sup> )	(% de vehículo)	ANOVA de una cola
1	Vehículo	0,097	100,00	-	34,18	100,00	-

(continuación)

Grupo	Tratamiento	Peso de tumores medios			Área de tumores medios		
		(g)	(% de vehículo)	ANOVA de una cola	(mm <sup>2</sup> )	(g)	ANOVA de una cola
2	5FU/Leu	0,037	11,94	p = 0,006	13,12	15,7	p = 0,011
3	5 mg/kg de Dalteparina	0,018	18,56	p = 0,017	8,09	23/67	p = 0,031
4	5 mg/kg de M402	0,057	58,76	NS	18,34	53,66	NS
5	15 mg/kg de M402	0,010	10,31	p = 0,007	6,95	20,33	p = 0,016
6	30 mg/kg de M402	0,003	3,09	p = 0,004	0,96	2,80	p = 0,004
7	Control no tratado	0,31	-	p = 0,035	83,58	244,53	p = 0,084

NS = no significativo

M402 tuvo influencia significativa en la reducción del índice de crecimiento tumoral. Tanto 15 mg/kg como 30 mg/kg de M402 redujo significativamente el tamaño del tumor hepático por 90% (p = 0,007) y 97% (p = 0,004) respectivamente y también fue significativamente más eficaz que 5FU/leucovorina (p = 0,041 y p = 0,011, respectivamente). La dalteparina (grupo 3) redujo el peso del tumor hepático por aproximadamente 81% (p = 0,017) cuando se compara con el grupo de control de vehículo. De manera similar, el área transversal de los tumores también mostró reducción significativa con dalteparina (p = 0,027) y 15 y 30 mg/kg de M402 (p = 0,016 y p = 0,004, respectivamente).

Se vigilaron los pesos del ratón durante la duración del estudio. Los pesos del ratón para cada grupo permanecieron dentro de un intervalo aceptable para todos los grupos durante todo el estudio.

Modelo C: Metástasis de cáncer de mama al pulmón

M402 también mostró actividad anti-metástasis en un modelo ortotópico singeneico de metástasis de cáncer de mama (4T1).

Se inyectó a ratones BALB/c hembra de 8 semanas (WOA)  $8 \times 10^4$  células 4T1 almohadilla grasa intra-mamaria. Un tratamiento diario con disolución salina o M402 con o sin tratamiento semanalmente de cisplatino empezó el día 5. Se retiraron los tumores primarios el día 9 y se pesaron.

Como se muestra en la Tabla 2, cisplatino combinado con M402 (10, 20, 30 mg/kg) mostró una disminución estadísticamente significativa en metástasis de pulmón comparado con grupo de control con disolución salina cuando se determina por peso de pulmón y recuento de nódulos tumorales (p < 0,05, ANOVA de una cola). Los grupos de tratamiento asociado (Cisplatino + M402 10/20/30 mg/kg) también tuvieron menor incidencia de crecimiento de nuevo del tumor mamario, metástasis tumoral de la cavidad torácica y pérdida de peso (> 2 g) en los últimos 3 días antes de la terminación del experimento. Los grupos de tratamiento asociado tuvieron mayor incidencia de pérdida de peso transitoria (> 2 g) la semana después de cirugía pero se recuperó en una semana.

Tabla 2. Modelo 4T1 : recuentos de metástasis tumorales macroscópicas

grupos	# de ratones	Nódulo tumor de pulmón # /animal	tamaño tumor de pulmón promedio	Nódulo tumor total	Tamaño tumor promedio	Volumen tumor total
Disolución salina	15	6,0±4,7	1,4	90	2,0	122,10
Cisplatino	16	5,6±4,4	1,41	89	1,36	134,13
M402 30 mg/kg	16	8,4±7,0	1,19	135	1,11	140,98

(continuación)

grupos	# de ratones	Nódulo tumor de pulmón # /animal	tamaño tumor de pulmón promedio	Nódulo tumor total	Tamaño tumor promedio	Volumen tumor total	
Cisplatino+M402 mg/kg	30	16	3,1±3,7	0,88	49	0,85	28,78
Cisplatino+M402 mg/kg	20	15	2,3±2,9	0,8	34	1,0	18,66
Cisplatino+M402 mg/kg	10	16	2,3±2,5	1,41	37	1,41	57,39
no tratado	7	12,9±14,0	0,98	90	1,3	65,06	

5 En un segundo experimento 4T1, se inyectaron a ratones BALB/c hembra de 8 WOA almohadilla grasa intramamaria de  $8 \times 10^4$  células 4T1. El suministro con bomba osmótica continua de disolución salina o M402 con tratamiento semanalmente de disolución salina o Cisplatino empezó el día 4. Se retiraron los tumores primarios el día 9. No hubo diferencias significativas entre los grupos en peso tumoral primario. Sin embargo, los análisis inmunohistológicos mostraron disminución significativa en la densidad de los microvasos en tumores de ratones tratados con la asociación de Cisplatino y M402. El experimento terminó el día 32 y se tomaron diferentes muestras. Se encontraron muertos 6 ratones o se prescindió temprano de ellos debido al estado general empeorado.

10 Se determinaron metástasis de pulmón de 4T1 por peso de pulmón, cuantificación de nódulos de tumor de pulmón incluyendo número de nódulos, tamaño y volumen de tumor calculado, así como cuantificación histológica. Los resultados se muestran en la Figura 2. Los grupos de monoterapia de M402 (20 mg/kg/día) no inhibieron significativamente la metástasis de pulmón de 4T1. El monoterapia con cisplatino (1,25 mg/kg) mostró eficacia anti-tumor significativa ( $p < 0,05$ ). La asociación de Cisplatino (1,25 mg/kg) con M402 (20 mg/kg/día) mostró eficacia en la reducción de metástasis de pulmón ( $p < 0,0005$ ) y reducción de la densidad de los microvasos. En gran medida, el grupo de tratamiento asociado también mostró mejor eficacia anti-tumor cuando se compara con el grupo de monoterapia con cisplatino determinado por peso de pulmón ( $p < 0,02$ ), número de nódulos tumorales, extensión de tumor de pulmón por histología y densidad de microvasos de tumor de pulmón ( $p < 0,05$ , prueba t), que demuestra que M402 mejoró la eficacia anti-tumor de cisplatino.

Modelo D: Modelo PC-3M de carcinoma de próstata humana: tratamiento asociado

20 Se inyectaron a ratones SCID/Beige macho de 8 WOA con  $5 \times 10^5$  células de carcinoma de próstata de PC-3M-luciferasa intra próstata. El tratamiento diario con disolución salina o M402 con o sin tratamiento semanalmente de cisplatino empezó el día 3. Se vigilan los ratones semanalmente con sistema de formación de imágenes Xenogen. El experimento terminó el día 32. Se aislaron los diferentes órganos y se evaluó la metástasis tumoral por peso y formación de imágenes de Xenogen.

25 El monoterapia de M402 (30 mg/kg) inhibió la metástasis de PC-3M en el peritoneo. Cisplatino asociado con M402 (30 mg/kg) disminuyó el crecimiento tumoral comparado con disolución salina y grupos de monoterapia de M402 cuando se determina por formación de imágenes in vivo. No hubo diferencia significativa entre tratamiento asociado (Cisplatino + M402 30 mg/kg) y monoterapia con Cisplatino en peso tumoral primario y metástasis en las condiciones experimentales específicas.

30 Ejemplo 3: El tratamiento de M402 normaliza células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), MMP-9 en plasma y nivel de G-CSF en ratones que soportan tumores 4T1.

35 Se inocularon grupos de ratones BALB/c hembra de manera ortotópica con  $5 \times 10^4$  células 4T1 en la 4ª almohadilla grasa mamaria el día 0. Semanalmente inyección ip de disolución salina o Cisplatino (1,25 mg/kg) y tratamiento con disolución salina o M402 (20 mg/kg) por bombas osmóticas implantadas sc empezó el día 5. Se retiraron los tumores primarios el día 9 por cirugía. El experimento terminó el día 32 y se recogieron muestras sanguíneas por punción cardíaca. Se trataron 100 ml de muestras sanguíneas mezcladas tratadas con citrato de sodio (por las jaulas) con tampón de lisis RBC, se lavaron y se tiñeron con diferentes anticuerpos antes de que se analizaran con citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 5. (A) Se definió MDSC por representación gráfica de dispersión delantera y lateral que muestra la expansión de estas células (más de 90% de estas células son CD1 1b+GR-1+) en ratones que soportaban tumores 4T1. La cuantificación de estas células MDSC como % de células totales. \*,  $P < 0,05$ , \*\*,  $P < 0,01$  cuando se compara con grupo de control con disolución salina. (B) Se analizaron muestras de plasma para concentración de MMP-9 por sistema Luminex. \*,  $P < 0,05$  comparado con grupo de control con disolución salina. (C) En un experimento separado pero similar, se determinaron niveles en plasma de G-CSF por ensayo ELISA. \*\*,  $P < 0,01$  comparado con grupo de control con disolución salina. Como se puede observar, el tratamiento con M402 normalizó las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), MMP-9 en plasma y nivel

de G-CSF en ratones que soportaban tumores 4T1.

Ejemplo 4: Tratamiento con M402 aumenta los niveles de monocina inducida por interferón gamma (MIG) en ratones que soportaban tumores 4T1.

- 5 Se inyectó a ratones BALB/c disolución salina o M402 a 20 mg/kg dos veces al día durante 7 días. Se sacrificaron los animales en diferentes instantes de tiempo después de la última dosis y se recogieron muestras sanguíneas por punción cardíaca con citrato de sodio como anticoagulante. Se recogió plasma y se almacenó en -80°C hasta que se determinó el nivel MIG usando Luminex. Como se muestra en la Figura 7, M402 indujo rápido aumento en el nivel de MIG en plasma y el nivel volvió gradualmente al nivel de la línea de referencia.

Ejemplo 5: M402 inhibe movilización y reclutamiento de células tumorales.

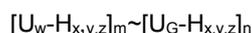
- 10 Los resultados se muestran en la Figura 6. (A) Se añadieron células Jurka a las cámaras superiores de las placas de quimiotaxis de 3 µm. las diferentes concentraciones de LMWH se combinaron con 3 ng/ml de SDF-1α y se añadieron a la cámara inferior por triplicado y se incubaron durante 1 h a 37°C después de que se cuantificaran las células migradas. M402 inhibió la migración de células Jurka inducida por SDF-1α de una manera dependiente de la dosis. (B) A los ratones BALB/c se inyectó disolución salina o G-CSF en presencia o ausencia de M402 durante 3 días. El 4º día, se analizó en la sangre el recuento sanguíneo por vetscan HM2. (C) Los grupos de ratones BALB/c hembra se inocularon de manera ortotópica con 5x10<sup>4</sup> células 4T1-luc-1A4 en la 4ª almohadilla grasa mamaria. El tratamiento con disolución salina o M402 (40 mg/kg/día) por bombas osmóticas implantadas sc empezó el día 1. Se retiraron los tumores primarios el día 10 por cirugía. Se recogió sangre el Día 30, de una vez los ratones presentaron carga tumoral metastásica significativa en el pulmón. Se lisaron RBC, se tiñó sangre para MDSC (CD11b, Gr-1, CD45) antes de análisis por citometría de flujo. El tratamiento con M402 redujo significativamente MDSC en la circulación. \*, P<0,05, \*\*, P<0,01 por ANOVA.
- 15
- 20

Como se puede ver en la Figura 6, M402 inhibió la movilización y reclutamiento de células tumorales.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para vigilar el efecto de una preparación de polisacárido en un individuo que tiene cáncer, comprendiendo el método determinar niveles estromales tumorales de células supresoras derivadas de mieloides (las MDSC), células progenitoras endoteliales (las EPC), expresión de metalopeptidasa 9 de la matriz plasmática (MMP-9), expresión de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), expresión de monocina inducida por interferón gamma (MIG) o asociaciones de los mismos en una muestra obtenida del individuo después de que se haya administrado al individuo la preparación de polisacárido, para determinar de ese modo el efecto de la preparación de polisacárido en el individuo;
- 5
- 10 en el que la preparación de polisacárido presenta las siguientes características:
- un peso molecular de cadena promedio ponderal entre 3.500 y 8.000 Da;
- actividad anti-Xa y actividad anti-IIa cada una menor que 50 UI/mg;
- entre 5% y 50% de restos de ácido urónico separados de glicol y
- 15 una distribución de peso molecular de manera que 10-50% de los oligosacáridos de la preparación presenta un peso molecular < 3.000 Da, 40-65% de los oligosacáridos presenta un peso molecular entre 3.000-8.000 Da y 5-30% de los oligosacáridos presentan un peso molecular > 8.000 Da
- y en el que una disminución en el nivel de las MDSC, el nivel de las EPC, nivel de expresión de plasma MMP-9, nivel de expresión de G-CSF o asociaciones de los mismos en relación a un patrón de referencia indica que la preparación de polisacárido es eficaz en el tratamiento del cáncer en el individuo y un aumento o cambio no significativo en el nivel de las MDSC, el nivel de las EPC, nivel de expresión de plasma MMP-9, nivel de expresión de G-CSF o asociaciones de los mismos en relación a un patrón de referencia indica que la preparación de polisacárido no es eficaz en el tratamiento del cáncer en el individuo.
- 20
2. El método según la reivindicación 1, en el que un aumento en el nivel de expresión de MIG en relación a un patrón de referencia indica que la preparación de polisacárido es eficaz en el tratamiento del cáncer en el individuo.
- 25
3. El método según la reivindicación 1, en el que una disminución o cambio no significativo en el nivel de expresión de MIG en relación a un patrón de referencia indica que la preparación de polisacárido no es eficaz en el tratamiento del cáncer en el individuo.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el patrón de referencia es niveles de MDSC, niveles de EPC, niveles de expresión en plasma de MMP-9, niveles de expresión de G-CSF y/o niveles de expresión de MIG en el individuo previamente a administración de la preparación de polisacárido.
- 30
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra es una muestra de sangre o tejido.
6. El método según la reivindicación 5, en el que la muestra es una muestra de biopsia.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los niveles de MDSC, niveles de EPC, niveles de expresión en plasma de MMP-9, niveles de expresión de G-CSF y/o niveles de expresión de MIG se determinan por un método seleccionado del grupo que consiste en: inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo por el método Western y un ensayo inmunohistoquímico (IHC).
- 35
8. El método según la reivindicación 1, en el que la preparación de polisacárido se ha administrado previamente al individuo en una o más ocasiones.
9. El método según la reivindicación 1, en el que la preparación de polisacárido presenta entre 5% y 30% de restos de ácido urónico separados de glicol.
- 40
10. El método según la reivindicación 1, en el que la preparación de polisacárido presenta entre 10% y 30% de restos de ácido urónico separados de glicol.
11. El método según la reivindicación 1, en el que las cadenas de polisacárido de la preparación de polisacárido presentan no más de 3 restos de ácido urónico separados de glicol (U<sub>G</sub>) por cadena de polisacárido.
- 45
12. El método según la reivindicación 11, en el que cada cadena de polisacárido no presenta más de 2 o no más de 1 resto de ácido urónico separado de glicol (U<sub>G</sub>) por cadena de polisacárido.
13. El método según la reivindicación 11, en el que las cadenas de polisacárido de la preparación de polisacárido presentan de promedio no más de 3 restos de ácido urónico separados de glicol (U<sub>G</sub>) por cadena de polisacárido.

14. El método según la reivindicación 13, en el que las cadenas de polisacárido de la preparación de polisacárido presentan de promedio no más de 2 o no más de 1 restos de ácido urónico separados de glicol (U<sub>G</sub>) por cadena de polisacárido.
- 5 15. El método según la reivindicación 1, en el que la preparación de polisacárido presenta cadenas de polisacárido que tienen más de 40% de restos disacárido U<sub>2S</sub>H<sub>NS,6S</sub>.
16. El método según la reivindicación 15, en el que la preparación de polisacárido tiene más de 70% de restos disacárido U<sub>2S</sub>H<sub>NS,6S</sub>.
17. El método según la reivindicación 16, en el que la preparación de polisacárido presenta un grado de desulfatación menor que 40%.
- 10 18. El método según la reivindicación 17, en el que la preparación de polisacárido presenta un grado de desulfatación menor que 30%.
19. El método según la reivindicación 18, en el que la preparación de polisacárido presenta un grado de desulfatación menor que 10%.
- 15 20. El método según la reivindicación 1, en el que la preparación de polisacárido comprende polisacáridos que incluyen la Fórmula I:



en la que cada caso de U indica un resto de ácido urónico y cada caso de H indica un resto hexosamina;

en la que m y n son números enteros de manera que

m = 4-16 y

20 n = 1-4;

cada una de w, x, y y z puede ser independientemente igual o diferente para cada caso de [U<sub>w</sub>-H<sub>x,y,z</sub>] y cada una de x, y y z puede ser independientemente igual o diferente para cada caso de [U<sub>G</sub>-H<sub>x,y,z</sub>], en la que

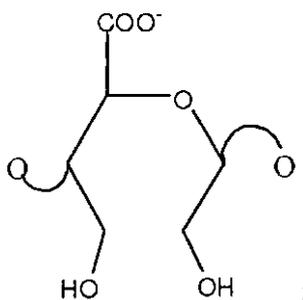
w = -2OS o -2OH;

x = -NS o -NAc;

25 y = -3OS o -3OH;

z = -6OS o -6OH;

y U<sub>G</sub> =



30 en la que el símbolo ~ indica que las unidades marcadas m y n se distribuyen a lo largo de la cadena de polisacárido y no están necesariamente en secuencia.

21. El método según la reivindicación 20, en el que n es 1-3.

22. El método según la reivindicación 1, en el que el cáncer se selecciona de: cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de mama, glioma, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, linfoma, mieloma múltiple, melanoma, cáncer del intestino delgado y carcinoma de tiroides.

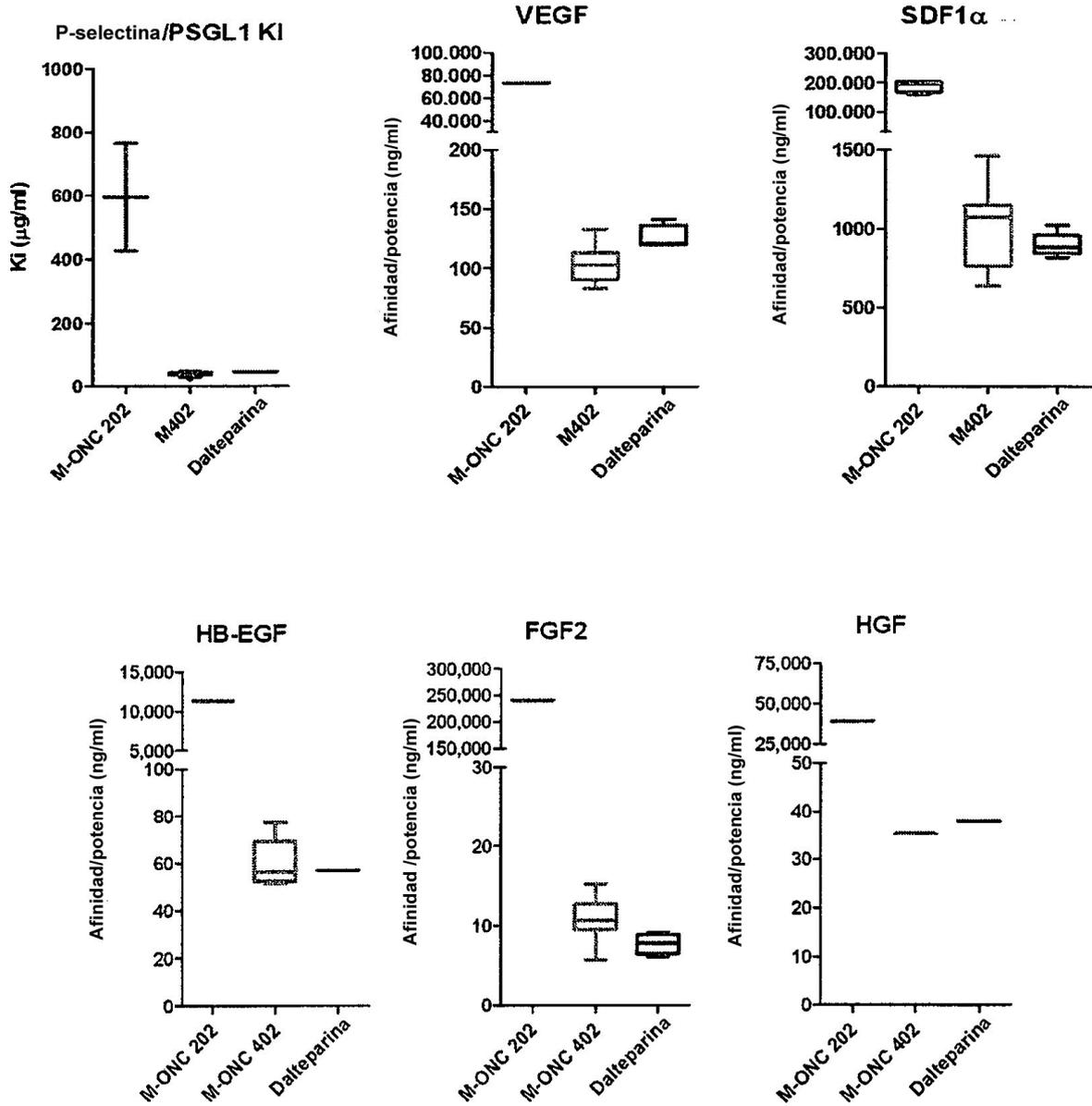
35

23. El método según la reivindicación 1, en el que el cáncer es cáncer pancreático.

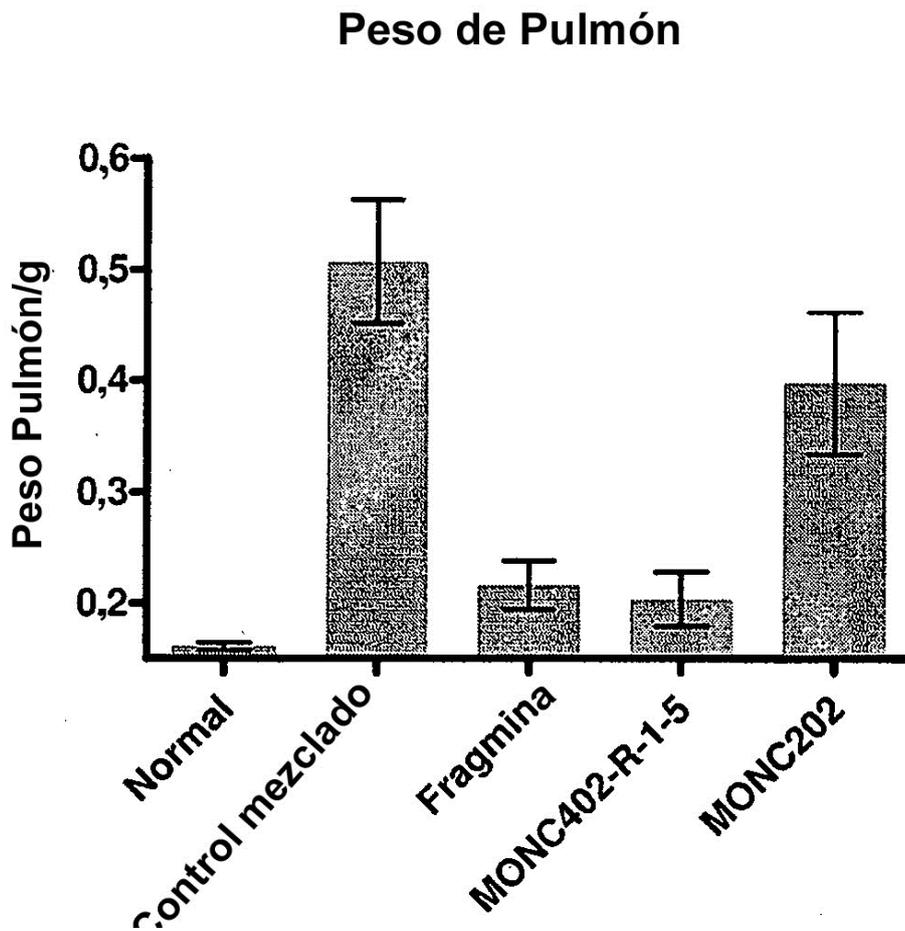
24. El método según la reivindicación 1, en el que el cáncer es cáncer colorrectal.

25. El método según la reivindicación 1, en el que el cáncer es un cáncer metastásico.
26. El método según la reivindicación 25, en el que el cáncer metastásico es cáncer pancreático metastásico.
27. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo el método:
- 5 determinar niveles estromales tumorales de las MDSC, las EPC, expresión de MMP-9 en plasma, expresión de G-CSF, expresión de MIG o asociaciones de los mismos en una muestra obtenida del individuo previamente a la administración de la preparación de polisacárido y
- 10 con posterioridad determinar niveles estromales tumorales de las MDSC, las EPC, expresión de MMP-9 en plasma, expresión de G-CSF, expresión de MIG o asociaciones de los mismos en una muestra adicional obtenida del individuo después de que se haya administrado al individuo la preparación de polisacárido, para determinar de ese modo el efecto de la preparación de polisacárido en el individuo.
28. El método según la reivindicación 1, en el que menos de 30% de los restos de ácido urónico de la preparación de polisacárido son restos de ácido urónico separados de glicol.
29. El método según la reivindicación 1, en el que la preparación de polisacárido presenta una actividad anti-Xa menor que 20 UI/mg, por ej., menor que 10 UI/mg.
- 15 30. El método según la reivindicación 1, en el que la preparación de polisacárido presenta una actividad anti-IIa menor que 20 UI/mg, por ej., menor que 1 UI/mg.
31. El método según la reivindicación 1, en el que al menos 50% de las cadenas en la preparación de polisacárido presenta un extremo de reducción que comprende un resto de 2,5-anhidromanosa que se ha reducido para formar un alcohol.
- 20 32. El método según la reivindicación 1, en el que al individuo se ha administrado la preparación de polisacárido junto con un tratamiento adicional.
33. El método según la reivindicación 32, en el que el tratamiento adicional es un agente quimioterapéutico.
34. El método según la reivindicación 33, en el que el agente quimioterapéutico es un agente citotóxico seleccionado de gemcitabina, taxanos y combinaciones de los mismos.
- 25 35. El método según la reivindicación 34, en el que el agente quimioterapéutico es gemcitabina.

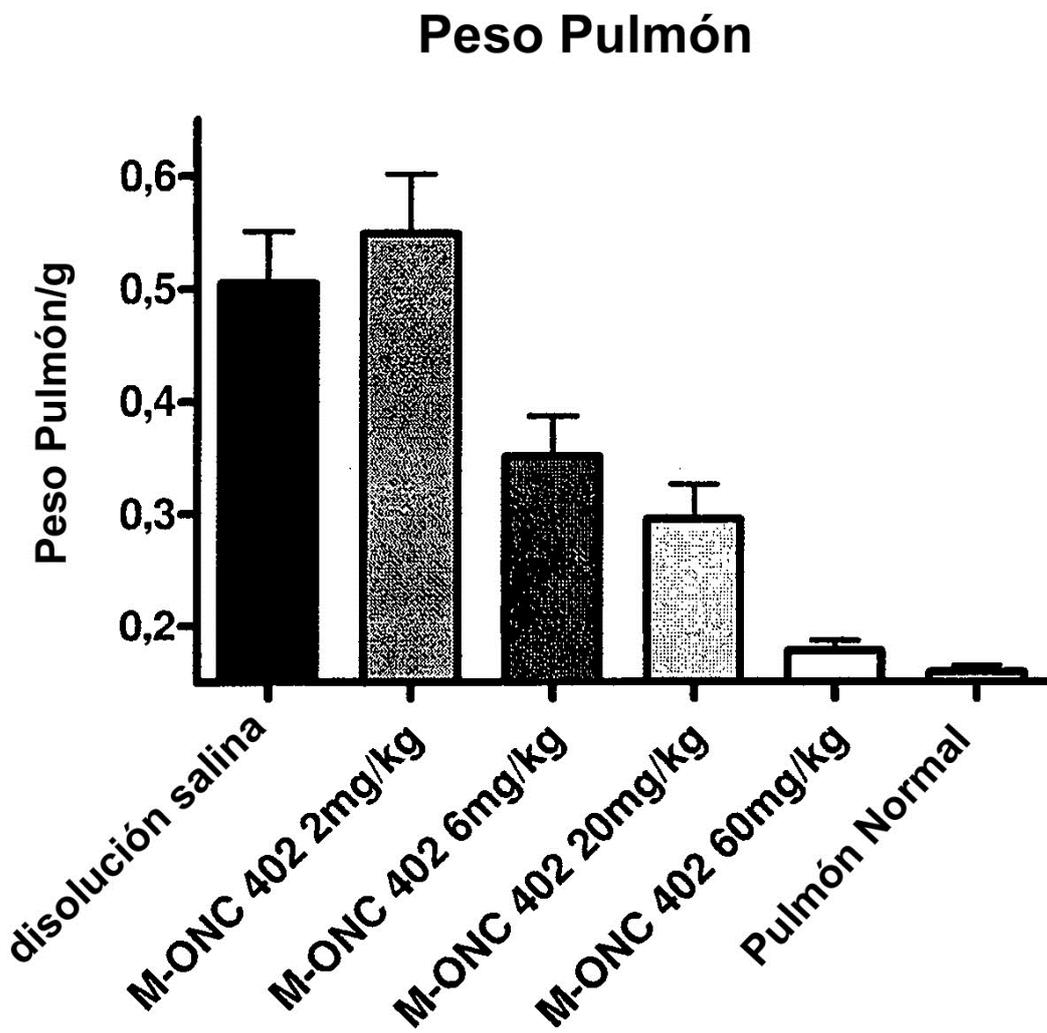
# FIGURA 1



## FIGURA 2



**FIGURA 3**



# FIGURA 4

## Peso Pulmón Día 32

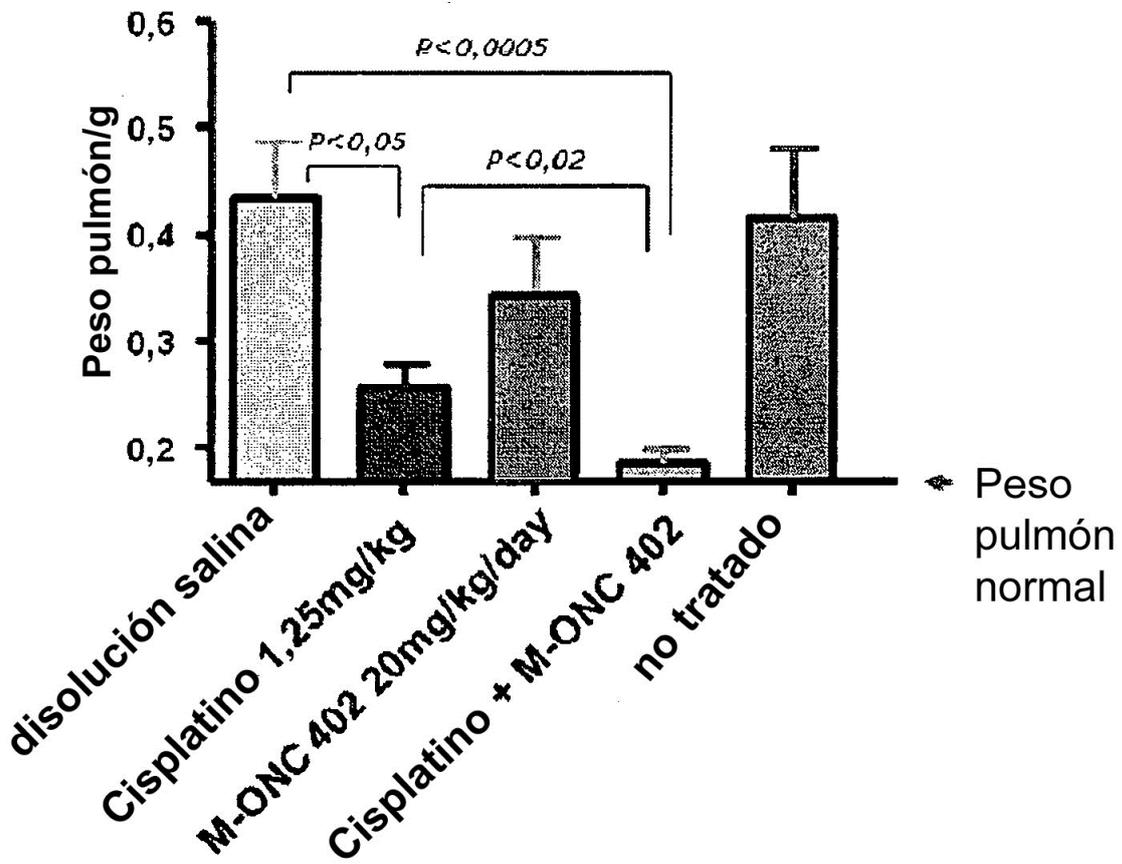
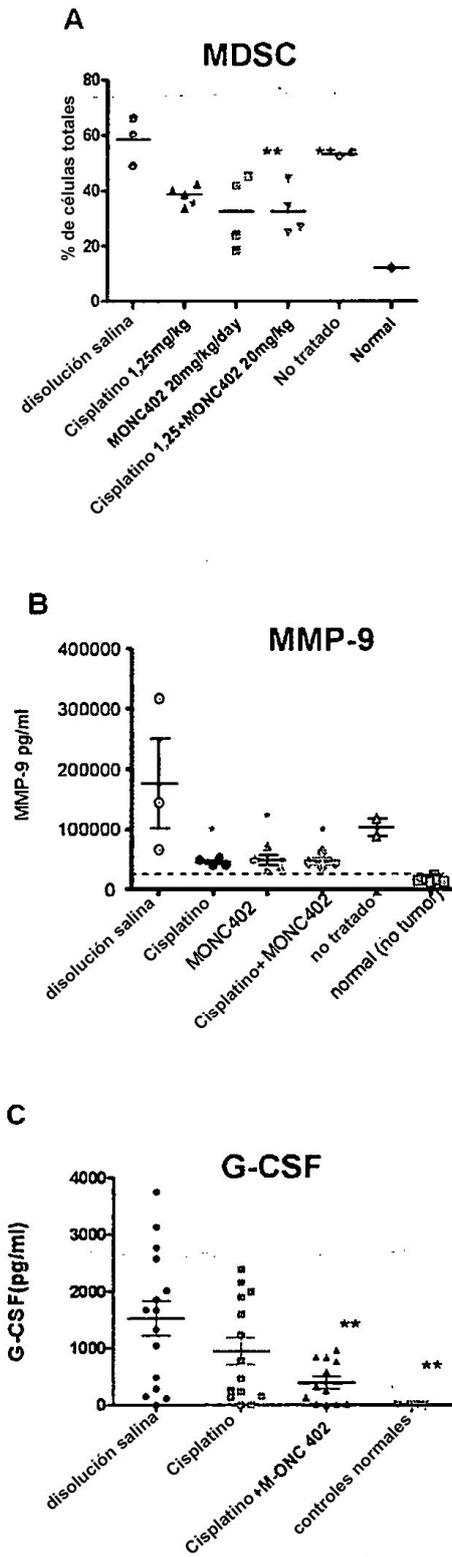
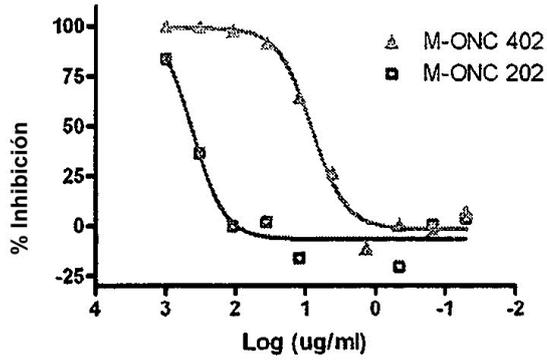


FIGURA 5

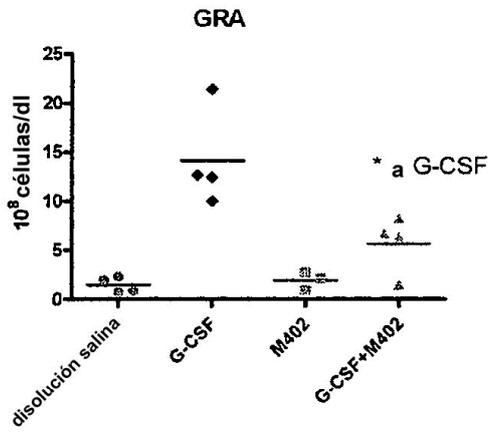


# FIGURA 6

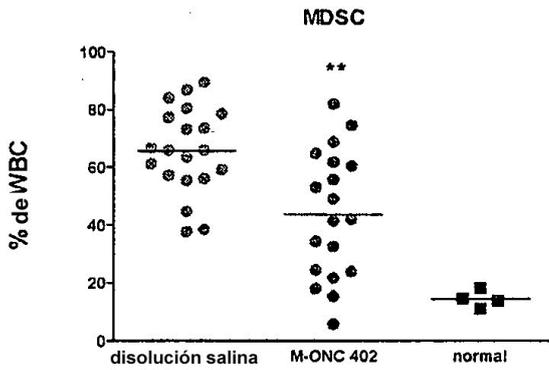
A



B



C



**FIGURA 7**

