

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 079**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2008 E 08845432 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2205642**

54 Título: **Composiciones de polisacáridos que no son anticoagulantes**

30 Prioridad:

02.11.2007 US 985080 P

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

19.04.2016

73 Titular/es:

**MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
675 WEST KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**SUNDARAM, MALLIK;
KISHIMOTO, TAKASHI KEI y
ROY, SUCHARITA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 567 079 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

Composiciones de polisacáridos que no son anticoagulantes

ANTECEDENTES

5 Un compuesto de heparina, que es un glucosaminoglucano similar a heparina, que está sulfatado en alto grado (HLGAG acrónimo de "heparin like glycosaminoglycan") que ha sido producido por unas células cebadas y aislado a partir de unas fuentes naturales, es un agente anticoagulante clínico ampliamente usado. Sin embargo, los efectos de una heparina natural, o no fraccionada, pueden ser difíciles de predecir y los pacientes deben de ser vigilados estrechamente para evitar un efecto de anticoagulación excesiva o deficitaria. Las heparinas de bajo peso molecular (LMWHs acrónimo de "low molecular weight heparins"), que se han obtenidas por diversos métodos de fraccionamiento o despolimerización de una heparina polimérica, tienen una más predecible acción farmacológica como agentes anticoagulantes, unos reducidos efectos colaterales, una actividad antitrombótica prolongada, y una biodisponibilidad mejor que la de una heparina no fraccionada (UFH acrónimo de "unfractionated heparin"). Varias LMWHs han sido aprobadas para el tratamiento de unas condiciones tromboticas de pacientes externos.

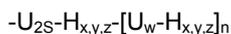
10 Existe un creciente interés en el cometido potencial de ciertos agentes antitrombóticos en la gestión de los pacientes de cáncer. Los resultados procedentes de diversas pruebas clínicas recientes han sugerido la existencia de una ventaja de supervivencia para ciertos tipos de pacientes de cáncer, que han sido tratados con unas LMWHs (como se ha recopilado en la cita bibliográfica de Lemoine, 2005, *Journal of Clinical Oncology*, 23: 2119-20).

SUMARIO

20 La presente divulgación está basada, en parte, en el desarrollo de unas preparaciones de polisacáridos, p.ej. de unas preparaciones de polisacáridos que se derivan de una heparina, que carecen de una actividad anticoagulante sustancial (p.ej. que sustancialmente no tienen ninguna actividad anticoagulante), pero que retienen una actividad en otros procesos biológicos que no son mediados por una coagulación, y de unos métodos para producirlos. Estos compuestos pueden tener una o más de las siguientes características: 1) una actividad anti-Xa y una actividad anti-IIa, cada una de ellas de menos que 50 UI/mg, y 2) una actividad anti-metastásica, anti-angiogénica, anti-fibrótica y/o anti-inflamatoria. Los polisacáridos que aquí se divulgan pueden tener también unas características estructurales que los distinguen con respecto de otros polisacáridos (p.ej. de unas heparinas que están disponibles comercialmente). Por ejemplo, una preparación de polisacárido que aquí se describe puede tener una o más de las siguientes características: la preparación tiene un peso molecular medio ponderado comprendido entre 3.500 y 7.000 Da; la preparación no tiene sustancialmente residuos modificados de hexosaminas o de ácidos urónicos, p.ej. no tienen sustancialmente residuos de ácidos urónicos en los se ha escindido por lo menos una de sus funciones de glicol; la preparación tiene más de 40 % de unos residuos del disacárido $U_{2S}H_{NS,6S}$; un grado de sulfatación de la preparación de menos que 40 %; una o más cadenas de polisacáridos de la preparación tiene(n) una insaturación en la posición 4,5 de un residuo de un ácido urónico con un extremo no reductor, y la preparación tiene menos que 10 % del tetrasacárido $-UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Esta divulgación incluye unas preparaciones que tienen una o más de estas propiedades y características, así como unos métodos para producir y usar dichas preparaciones.

35 De acuerdo con el presente invento, se proporciona una preparación de polisacáridos tal como se definirá en las reivindicaciones adjuntas. También se proporcionan unas composiciones farmacéuticas, unos métodos para su producción y unos usos que se definirán en las reivindicaciones adjuntas.

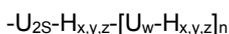
40 Más generalmente, la presente divulgación tiene como característica una preparación de polisacáridos (p.ej. una preparación que se deriva de una heparina) que incluye (p.ej. que consiste esencialmente en) unos polisacáridos de la Fórmula I:



en que n es un número entero tal que n es = 1-20 (p.ej., 1-10, 1-11, 1-12, 1-13, 1-14, 1-15, 1-16, 1-17, 1-18 o 1-19); w es = -2OS o -2OH; x es = -NS o -NAC; y es = -3OS o -3OH; z es = -6OS o -6OH; y

45 en que U indica un residuo de un ácido urónico y H indica un residuo de una hexosamina; y en que los w, x, y, y z son iguales o diferentes en cada residuo de U o H.

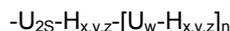
La divulgación tiene también como característica una preparación de polisacáridos (p.ej. una preparación que se deriva de una heparina) que tiene un peso molecular medio ponderado comprendido entre 3.500 y 7.000 Da (p.ej. entre 3.500 y 5.000 Da) y una actividad anticoagulante reducida (p.ej. no tiene sustancialmente ninguna), en que la preparación incluye (p.ej. consiste esencialmente en) unos polisacáridos que comprenden la Fórmula I:



50 en que n es un número entero tal que n es = 1-20 (p.ej., 1-10, 1-11, 1-12, 1-13, 1-14, 1-15, 1-16, 1-17, 1-18, o 1-19); w es = -2OS o -2OH; x es = -NS o -NAC; y es = -3OS o -3OH; z es = -6OS o -6OH;

55 en que U indica un residuo de un ácido urónico y H indica un residuo de una hexosamina; y en que los w, x, y, y z son iguales o diferentes en cada residuo de U o H.

La divulgación tiene también como característica una preparación de polisacáridos (p.ej. una preparación que se deriva de una heparina) que carece de actividad anticoagulante sustancial (p.ej. que sustancialmente no tiene ninguna), en que la preparación se compone esencialmente de unos polisacáridos de la Fórmula I:



5 en que n es un número entero tal que $n = 1-20$ (p.ej., 1-10, 1-11, 1-12, 1-13, 1-14, 1-15, 1-16, 1-17, 1-18, o 1-19); w = -2OS o -2OH; x = -NS o -NAC; y = -3OS o -3OH; z = -6OS o -6OH;

10 en que U indica un residuo de un ácido urónico y H indica un residuo de una hexosamina; y en que w, x, y, y z son iguales o diferentes en cada residuo de U o H, y en que la composición tiene una actividad anti-Xa y una actividad anti-IIa, cada una de ellas de menos que 50 UI/mg (p.ej., una actividad anti-Xa de menos que aproximadamente 45 UI/mg, 40 UI/mg, 35 UI/mg, 30 UI/mg, 25 UI/mg o 20 UI/mg y una actividad anti-IIa de menos que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg o 5 UI/mg).

15 La divulgación tiene también como característica una preparación de polisacáridos (p.ej. una preparación que se deriva de una heparina) que tiene las siguientes características: (a) un peso molecular medio ponderado comprendido entre 3.500 y 7.000 Da (p.ej., comprendido entre 3.500 y 5.000 Da); (b) una actividad anti-Xa y una actividad anti-IIa cada una de ellas de menos que 50 UI/mg (p.ej., una actividad anti-Xa de menos que aproximadamente 45 UI/mg, 40 UI/mg, 35 UI/mg, 30 UI/mg, 25 UI/mg o 20 UI/mg y una actividad anti-IIa de menos que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg o 5 UI/mg); y (c) sustancialmente no está presente en la preparación ningún residuo de un ácido urónico que ha sido escindido en una de sus funciones de glicol (p.ej. menos que 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o nada).

20 También se divulgan unas sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las preparaciones que aquí se describen (p.ej. que más arriba se han descrito) y unas composiciones (p.ej. unas composiciones farmacéuticas) que comprenden las preparaciones que aquí se describen y/o sus sales farmacéuticamente aceptables.

25 Cualquiera de las preparaciones que aquí se describen, p.ej. que se han descrito más arriba, puede tener otras propiedades. P.ej., una de las preparaciones o composiciones farmacéuticas que se han descrito más arriba, puede tener adicionalmente una o más de las propiedades funcionales o estructurales que se han exponen más adelante.

En un ejemplo, la preparación tiene un peso molecular medio ponderado comprendido entre 3.500 y 7.000 Da (p.ej., entre 3.500 y 6.000 Da; entre 3.500 y 5.500 Da; entre 3.500 y 5.000 Da; entre 4.000 y 6.000 Da; entre 4.000 y 5.500 Da; entre 4.000 y 5.000 Da; entre 4.500 y 5.500 Da; entre 4.500 y 5.000 Da).

30 En un ejemplo, la preparación tiene una actividad anti-Xa y una actividad anti-IIa cada una de ellas de menos que 50 UI/mg (p.ej., una actividad anti-Xa de menos que aproximadamente 45 UI/mg, 40 UI/mg, 35 UI/mg, 30 UI/mg, 25 UI/mg o 20 UI/mg y una actividad anti-IIa de menos que aproximadamente 40 UI/mg, 30 UI/mg, 20 UI/mg, 15 UI/mg, 10 UI/mg o 5 UI/mg).

En un ejemplo, la preparación incluye más que un 40 % de residuos del disacárido $U_{2S}H_{NS,6S}$ (p.ej., más que un 50 %, 60 %, 70 % o 80 % de residuos del disacárido $U_{2S}H_{NS,6S}$).

35 En un ejemplo, las preparaciones incluyen unas cadenas de polisacáridos que tienen un grado de desulfatación de menos que un 40 % (p.ej. de menos que un 30 %, 20 % o 10 %). El grado de desulfatación, tal como se usa en el presente contexto, se define como la reducción porcentual, expresada en moles de sulfato por moles de una unidad de disacárido, en comparación con una heparina no fraccionada.

40 En un ejemplo, las preparaciones incluyen unas cadenas de polisacáridos que tienen un grado de sulfatación mayor que o igual a 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4 o 2,6. El grado de sulfatación, tal como se usa en el presente contexto, se define como el número medio de moles de sulfato por moles de una unidad de disacárido.

45 En un ejemplo, por lo menos una de las cadenas de polisacáridos existentes en la preparación o composición tiene una insaturación en la posición 4,5 en el extremo no reductor (p.ej. como un resultado de la digestión con una heparinasa o de la esterificación con bencilo, seguida por una beta-eliminación). Por ejemplo, aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o sustancialmente la totalidad de los ácidos urónicos no reductores existentes en la preparación o composición tienen una insaturación en la posición 4,5.

En un ejemplo, la preparación o composición incluye un nivel más bajo del $-UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ que la enoxaparina, la dalteparina y/o la UFH. P.ej. la preparación o composición incluye aproximadamente de 0 a 4 % en moles, p.ej., de 0 a 3 % en moles, p.ej., de 0 a 2 % en moles del $-UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$.

50 En un ejemplo, aproximadamente 10-40 % (p.ej., aproximadamente 10-35 %, aproximadamente 10-30 %, aproximadamente 15-35 %, aproximadamente 15-30 %, aproximadamente 20-35 %, aproximadamente 20-30 %) de las cadenas de polisacáridos de la preparación incluyen el pentasacárido $H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$.

55 En un ejemplo, la preparación incluye aproximadamente 10-40 % (p.ej., aproximadamente 10-35 %, aproximadamente 10-30 %, aproximadamente 15-35 %, aproximadamente 15-30 %, aproximadamente 20-35 %, aproximadamente 20-30 %) de las cadenas de polisacáridos que contienen el tetrasacárido $-U_{2S}H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$.

En un ejemplo, la preparación no tiene sustancialmente (p.ej., tiene menos que 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o nada) de residuos de un ácido urónico que ha sido escindido en una de sus funciones de glicol.

5 En un ejemplo, la preparación o composición tiene una distribución de pesos moleculares tal que 10-50 % (p.ej., 20-50 %, 20-45 %, 25-50 %, 25-45 %, 30-50 %, 30-45 % o 35-45 %) de los oligosacáridos de la preparación tienen un peso molecular < 3.000 Da; 40-65 % (p.ej., 40-60 %, 40-55 % o 40-50 %) de los oligosacáridos tienen un peso molecular comprendido entre 3.000-8.000 Da, y 5-30 % (p.ej., 5-25 %, 5-20 %, 5-15 %, 10-25 % o 10-20 %) de los oligosacáridos tienen un peso molecular > 8.000 Da.

10 En un ejemplo, la preparación tiene una polidispersidad de aproximadamente 1,6 a 2,1 (p.ej., de aproximadamente 1,6 a 2,0, de aproximadamente 1,7 a 2,0, de aproximadamente 1,6 a 1,9, de aproximadamente 1,7 a 1,9).

En un ejemplo, la preparación o composición tiene una significativa actividad anti-metastásica.

En un ejemplo, la preparación o composición se fija específicamente, o inhibe, a una actividad de una o más de las sustancias: VEGF, FGF, SDF-1 o P-selectina.

15 En un ejemplo, la preparación o la composición tiene un contenido de calcio de menos que 3 %, 2,5 %, 2 %, 1,5 %, 1,0 % y/o un contenido de sodio de menos que 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %. En un ejemplo la preparación o composición comprende: menos que 1.000 ng/mg, 750 ng/mg, 500 ng/mg, 250 ng/mg de una enzima heparinasa, p.ej. una enzima heparinasa como aquí se describe, menos que 1,0 %, 0,5 %, 0,3 % p/p de metanol; y menos que 2,0 %, 1,75 %, 1,25 %, 1,0 %, 0,5 %, 0,3 %, 0,15 % de cloruro.

20 La divulgación tiene también como característica unos métodos para producir una preparación de polisacáridos. Los métodos incluyen digerir una UFH con una enzima que disocia en el pentasacárido $H_{NAc/S,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ (p.ej. en el enlace situado entre los residuos $H_{NS,3S}$ y I_{2S}) y/o disocia a un disacárido $I_{2S}H_{NS,3S}$ o $I_{2S}H_{AC}$. En algunos casos, la enzima es una enzima heparinasa (p.ej. la Heparinasa I de *Bacteroides thetaiotaomicron*).

25 Se divulgan también unos métodos para producir una preparación, que incluyen: (1) digerir una UFH con una enzima heparinasa que disocia en el pentasacárido $H_{NAc/S,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ (p.ej. en el enlace situado entre los residuos $H_{NS,3S}$ y I_{2S}) y/o disocia a un $I_{2S}H_{NS}$ o $I_{2S}H_{AC}$ (p.ej. la Heparinasa I de *Bacteroides thetaiotaomicron*), (2) vigilar la absorbancia a 232 nm durante la etapa de digestión; y (3) detener (p.ej., sofocar) la reacción de digestión cuando la absorbancia a 232 nm está situada entre 1,7 y 2,0. En un ejemplo, la enzima heparinasa está presente en una cantidad de aproximadamente 1,0 a 5,0 UI/g de UFH. En un ejemplo, la etapa de digestión no incluye un tratamiento de la reacción de digestión con un agente reductor tiólico (p.ej., ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol, o un compuesto similar).

30 La divulgación tiene también como característica unos métodos para producir una preparación de polisacáridos. Los métodos incluyen: (1) digerir una heparina no fraccionada (UFH) con una enzima heparinasa que disocia en el pentasacárido $H_{NAc/S,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$, p.ej., disocia en el enlace situado entre los residuos $H_{NS,3S}$ y I_{2S} y/o disocia a un $I_{2S}H_{NS}$ o $I_{2S}H_{AC}$ (p.ej., la Heparinasa I de *Bacteroides thetaiotaomicron*), para proporcionar un polisacárido; y (2) aislar el polisacárido (p.ej., por precipitación con una sal y con un disolvente orgánico polar), para producir de esta manera una preparación de polisacáridos.

35 En un ejemplo, la etapa de digestión incluye tratar la UFH con la enzima (p.ej., en una cantidad de aproximadamente 1,0 a 5,0 UI/g de UFH); vigilar la absorbancia a 232 nm durante la etapa de digestión; y detener (p.ej., sofocar) la reacción de digestión cuando la absorbancia a 232 nm alcanza un valor situado entre 1,7 y 2,0. En un ejemplo, la etapa de digestión no incluye un tratamiento de la reacción de digestión con un agente reductor tiólico (p.ej., ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol o un compuesto similar).

En un ejemplo, la preparación es evaluada en cuanto a una actividad biológica, p.ej., una actividad antimetastásica; una fijación a cualquiera de las proteínas VEGF, FGF, SDF-1 y P-selectina; o una inhibición de una actividad de cualquiera de las proteínas VEGF, FGF, SDF-1 y P-selectina.

45 La divulgación tiene también como característica una preparación de polisacáridos que se ha producido por un método que aquí se describe.

También se divulga una mezcla intermedia o de reacción procedente de cualquiera de los métodos para producir o analizar una preparación de polisacáridos que aquí se describe.

50 La divulgación tiene también como característica una composición farmacéutica que incluye una preparación de polisacáridos que aquí se describe.

En un ejemplo, la composición farmacéutica incluye adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 La divulgación tiene también como característica un método para tratar a un sujeto, que incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de polisacáridos que aquí se divulga. Los términos "tratar", "tratamiento" y otros similares, significan administrar la preparación a un sujeto o a una célula o a un tejido de un sujeto con el fin de obtener un deseado efecto farmacológico, fisiológico o clínico. Un tratamiento con una preparación de polisacáridos que aquí se describe puede disminuir, reducir, mitigar, mejorar, retrasar o prevenir una condición indeseada existente o el comienzo de un síntoma de ésta. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se

refiere a una cantidad que es efectiva, en unas dosificaciones y durante unos períodos de tiempo, que se necesitan para conseguir el deseado efecto farmacológico, fisiológico o clínico en el sujeto.

También se divulgan unos métodos para tratar a un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, un trastorno metastásico (p.ej. un cáncer, p.ej. un carcinoma u otro cáncer sólido). En esos sujetos, un tratamiento puede incluir, pero no está limitado a, un crecimiento tumoral inhibido, una reducción en la masa tumoral, una reducción en el tamaño o en el número de unas lesiones metastásicas, un desarrollo inhibido de nuevas lesiones metastásicas, una prolongada supervivencia, una prolongada supervivencia libre de progresión, un período de tiempo prolongado hasta la progresión y/o una calidad de vida aumentada. En otro ejemplo, el sujeto puede tener un trastorno o una condición que se selecciona entre el conjunto que se compone de: un trastorno inflamatorio, un trastorno autoinmunitario, un trastorno fibrótico o fibroproliferativo o un trastorno atópico. Unos ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, un asma, una artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria intestinal (incluyendo a una enfermedad de Crohn y una colitis ulcerosa), una esclerosis múltiple, una psoriasis, unas lesiones por reperusión - isquemia, un choque séptico, una degeneración macular relacionada con la edad, una aterosclerosis, una enfermedad de Alzheimer, una enfermedad cardiovascular, una vasculitis, unas diabetes de los tipos I y II, un síndrome metabólico, una retinopatía diabética y una reestenosis. Unos ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, un asma, una artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria intestinal, una esclerosis múltiple, una psoriasis, una diabetes del tipo I, un lupus eritematoso sistémico (SLE acrónimo de systemic lupus erythematosus), un síndrome de Sjögren, una tiroiditis de Hashimoto, una enfermedad de Graves, un síndrome de Guillain-Barré, una hepatitis autoinmunitaria y una miastenia grave. Unos ejemplos de enfermedades fibróticas incluyen, pero no se limitan a, una escleroderma, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, una retinopatía diabética, una sarcoidosis, una fibrosis pulmonar idiopática, una cirrosis, una fibrosis quística, unos fibroides postoperatorios y una reestenosis. Unos ejemplos de una enfermedad atópica incluyen, pero no se limitan a, una dermatitis atópica, un asma atópico y una rinitis alérgica. Las composiciones se administran a un sujeto que tiene, o está en riesgo de desarrollar, una o más de las enfermedades, en una cantidad eficaz para tratar el trastorno o la condición.

En un ejemplo preferido, el sujeto tiene, o está en riesgo de tener, un cáncer o un trastorno metastásico (p.ej., un carcinoma). Por ejemplo, el sujeto tiene un tumor primario y tiene, 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 subcutánea.

En un ejemplo, la preparación de polisacáridos se administra en combinación con otra terapia, p.ej. con otro agente terapéutico, p.ej. con un agente citotóxico o citostático, y en unas combinaciones de los mismos.

En un ejemplo, la preparación de polisacáridos se administra crónicamente, p.ej. al menos dos veces durante un período de tiempo específico, p.ej. por lo menos dos veces durante un período de tiempo de seis meses. En un ejemplo, una preparación de polisacáridos se administra dos veces durante un período de tiempo de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, seis meses, un año o que incluso es más largo. La preparación de polisacáridos se puede administrar diariamente (p.ej. una vez, dos veces, o tres o cuatro veces por día), un día sí y otro no, semanalmente (p.ej. una vez, dos veces o tres veces por semana), una semana sí y otra no, mensualmente o según cualquier otro esquema de administración crónica.

Una preparación de polisacáridos que carece de una actividad anticoagulante sustancial, tal como se usa en el presente contexto, es una que tiene una actividad anti-Xa y anti-IIa en cada caso de menos que 100 UI/mg (p.ej., de menos que 80 UI/mg, 70 UI/mg o 60 UI/mg). En algunos casos, la preparación de polisacáridos no tiene sustancialmente ninguna actividad anticoagulante, es decir una actividad anti-Xa y anti-IIa en cada caso de menos que 50 UI/mg.

Para cualquiera de las gamas que aquí se describen, p.ej. para una estructura o actividad dada, las gamas pueden ser las gamas que se han divulgado así como otras gamas. Por ejemplo, una gama construida a partir de un punto final más bajo de una gama, p.ej. para un bloque de construcción o una actividad que se haya establecido, se puede combinar con el punto final superior de otra gama, p.ej. para el bloque de construcción o la actividad que se haya establecido, para proporcionar una gama.

Una preparación de polisacáridos "aislada" o "purificada" está sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente celular o tisular a partir de la que se deriva el polisacárido, o está sustancialmente libre de compuestos precursores químicos o de otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente. El concepto de "sustancialmente libre" significa que una preparación es pura en por lo menos un 50 % (en peso/peso). En un ejemplo preferido, la preparación tiene menos que aproximadamente 30 %, 20 %, 10 % y más preferiblemente 5 % (peso en seco) de unos polisacáridos que no se derivan de una heparina, de unas proteínas o de unos compuestos precursores químicos u otros compuestos químicos, p.ej. procedentes de la producción. A éstos se hace también referencia como "contaminantes". Unos ejemplos de contaminantes, que pueden estar presentes en una preparación de polisacáridos que aquí se describe, incluyen, pero no se limitan a, calcio, sodio, una enzima heparinasa (u otra enzima que tenga una similar especificidad para substratos), metanol, etanol, cloruro, sulfato, sulfato de dermatano y sulfato de condroitina.

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

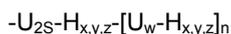
BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra el efecto de una preparación de polisacáridos que aquí se describe en un modelo de metástasis experimental de melanoma murino (B16F10 i.v.). Se determinó una carga tumoral pulmonar (peso pulmonar – peso pulmonar normal) para unas ratonas C57BL/6 hembras (con una edad de 9-10 semanas) desafiadas con una inyección i.v. de 2×10^5 células de B16F10 y tratadas previamente con una única dosis (10 mg/kg) de MONC703 (tanda R-6-1), dalteparina/Fragmin® o MONC 202 (testigo negativo, un polisacárido N-desulfatado) inmediatamente antes de la inyección. El adjetivo "normal" designa a unas ratonas no desafiadas y no tratadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADAPolisacáridos optimizados

En muchos ajustes o escenarios clínicos, unas preparaciones de LMWH comercialmente disponibles se prefieren frente a unas preparaciones de UFH como agentes anticoagulantes, puesto que las LMWHs tienen una farmacocinética más predecible y se pueden administrar por vía subcutánea. Sin embargo, a causa del potencial para complicaciones hemorrágicas debidas a sus efectos anticoagulantes, las preparaciones de LMWH actualmente disponibles son menos apropiadas para una terapia de trastornos no mediados por coagulación, y/o para unos trastornos que pueden requerir unas dosis más altas o unos regímenes de dosificación crónicos. La divulgación tiene como característica unas preparaciones de polisacáridos que están diseñadas para carecer de una actividad anticoagulante sustancial al mismo tiempo que retienen unas propiedades clínicamente ventajosas. Las propiedades de las preparaciones de polisacáridos incluyen p.ej. carecer de una actividad coagulante sustancial, p.ej. no tener sustancialmente ninguna actividad anticoagulante (p.ej. tener una actividad anti-IIa de menos 50 UI/mg, una actividad anti-Xa de menos que 50 UI/mg), y tener una actividad anti-metastásica, anti-angiogénica y/o anti-inflamatoria.

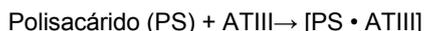
Unos ejemplos de tales preparaciones incluyen unas cadenas que incluyen el siguiente:



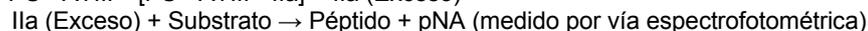
en que n es un número entero tal que n es = 1-20; w es = -2OS o -2OH; x es = -NS o -NAc; y es = -3OS o -3OH; z es = -6OS o -6OH; en que U indica un residuo de un ácido urónico y H indica un residuo de una hexosamina; y en que los w, x, y, y z son iguales o diferentes en cada residuo U o H.

Actividad anti-IIa

Se divulgan aquí unas preparaciones de polisacáridos que proporcionan una actividad anti-IIa sustancialmente reducida, aproximadamente de 0 a 50 UI/mg, p.ej., aproximadamente de 0 a 40 UI/mg, aproximadamente de 0 a 30 UI/mg, aproximadamente de 0 a 25 UI/mg, aproximadamente de 0 a 20 UI/mg, aproximadamente de 0 a 10 UI/mg, aproximadamente de 5 a 10 UI/mg, aproximadamente de 5 a 15 UI/mg o aproximadamente de 5 a 20 UI/mg. La actividad anti-IIa se calcula en Unidades Internacionales UI de actividad anti-IIa por milígramo usando unos métodos estadísticos para ensayos lineales y paralelos. Los niveles de actividad anti-IIa que se describen aquí se miden usando el siguiente principio.



IIa



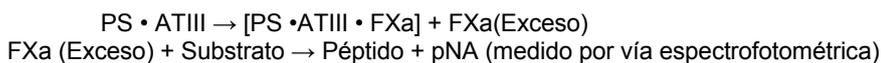
La actividad anti-factor IIa se determina por medio del efecto potenciador de las muestras sobre la antitrombina (ATIII) en la inhibición de trombina. Un exceso de trombina se puede medir indirectamente por vía espectrofotométrica. La actividad anti-factor IIa se puede medir, p.ej. en un dispositivo analizador de Diagnostica Stago o en un sistema de ACL Futura3 Coagulation con unos reactivos procedentes de Chromogenix (Substrato S-2238, Trombina (53 nkat/vial) y Antitrombina), o en cualquier sistema equivalente. La respuesta del analizador es calibrada usando la 2ª Norma Internacional para Heparinas de Bajo Peso Molecular.

Actividad anti-Xa

Preferiblemente, una preparación que aquí se proporciona tiene una actividad anti-Xa de aproximadamente de 0 a 50 UI/mg, aproximadamente de 0 a 40 UI/mg, aproximadamente de 0 a 30 UI/mg, aproximadamente de 0 a 25 UI/mg, aproximadamente de 10 a 50 UI/mg, aproximadamente de 20 a 50 UI/mg, aproximadamente de 20 a 40 UI/mg o aproximadamente de 30 a 40 UI/mg. La actividad anti-Xa de una preparación se calcula en Unidades Internacionales de actividad anti-factor Xa por milígramo usando unos métodos estadísticos para ensayos lineales y paralelos. Los niveles de actividad anti-IIa que se describen aquí se miden usando el siguiente principio:



FXa



La actividad anti-factor Xa se determina por medio del efecto potenciador de las muestras sobre la antitrombina (ATIII) en la inhibición del Factor Xa activado (FXa). Un exceso de factor Xa se puede medir indirectamente por vía espectrofotométrica. La actividad anti-factor Xa se puede medir, p.ej., en un dispositivo analizador de Diagnostica Stago con el estuche de ensayo Stachrom® Heparin Kit, en un sistema de ACL Futura3 Coagulation con el estuche Coatest® Heparin Kit procedente de Chromogenix, o en cualquier sistema equivalente. La respuesta del analizador se puede calibrar usando la Norma Internacional de NIBSC para Heparinas de Bajo Peso Molecular.

Peso molecular y longitud de las cadenas

10 Cuando se determina el peso molecular medio ponderado de una preparación, un peso molecular medio ponderado aproximadamente de 3.500 a 7.000 Da, aproximadamente de 3.500 a 5.500 Da, de manera preferible de aproximadamente 4.500 a 5.500 Da o de aproximadamente 4.500 a 5.000 Da indica que un número significativo de cadenas en la preparación de polisacáridos tiene una suficiente longitud de las cadenas.

15 El concepto de "peso molecular medio ponderado", tal como se usa en el presente contexto, se refiere al valor medio ponderado, en daltones, de unas cadenas de repeticiones de un disacárido de ácido urónico / hexosamina. La presencia de unos bloques de construcción que no son de ácido urónico y/o que no son de hexosamina no se incluye en la determinación del peso molecular medio ponderado. Por lo tanto, el peso molecular de unos bloques de construcción que no son de ácido urónico y que no son de hexosamina dentro de una cadena o de unas cadenas en la preparación no se deberá incluir al realizar la determinación del peso molecular medio ponderado. El peso molecular medio ponderado (M_w) se calcula a partir de la siguiente ecuación: $M_w = \sum(c_i m_i) / \sum c_i$. La variable c_i es la concentración del polímero en la rodaja i y la variable m_i es el peso molecular del polímero en la rodaja i . Las sumas se toman a lo largo de un pico cromatográfico que contiene muchas rodajas de datos. Una rodaja de datos puede ser representada gráficamente como una línea vertical en una representación gráfica del pico cromatográfico en función del tiempo. El pico de elución se puede subdividir, por lo tanto, en muchas rodajas. El cálculo del peso molecular medio ponderado es dependiente en promedio de la suma de todas las rodajas de la concentración y del peso molecular. El peso molecular medio ponderado se puede medir, p.ej. usando el programa lógico (software) de Wyatt Astra o cualquier otro programa lógico. Los pesos moleculares medios ponderados que aquí se describen se determinan mediante una cromatografía en fase líquida alta con dos columnas en serie, por ejemplo una TSK G3.000 SWXL y una G2000 SWXL, acopladas con un detector del dispersamiento de la luz en ángulos múltiples (MALS acrónimo de multi angle light scattering) y un detector refractométrico en serie. El eluyente usado es un sulfato de sodio 0,2 M, de pH 5,0, y en un caudal de 0,5 ml/min.

25 La determinación de si una preparación de polisacáridos incluye unas cadenas con una longitud suficiente de las cadenas, se puede hacer, por ejemplo, determinando la longitud media de cadena de las cadenas en la preparación y determinando el peso molecular medio ponderado de las cadenas que están dentro de la preparación. Cuando se determina una longitud media de cadena, una longitud media de cadena aproximadamente de 5 a 20, p.ej., aproximadamente de 7 a 18, aproximadamente de 7 a 14, aproximadamente de 7 a 12, aproximadamente de 7 a 10 o aproximadamente de 8 a 10 repeticiones de disacáridos indica que un número significativo de las cadenas en la preparación tienen una suficiente longitud de cadena.

35 El concepto de "longitud media de cadena", como se usa en el presente contexto, se refiere a la longitud media de cadena de unas repeticiones de disacáridos de ácido urónico / hexosamina que se presentan dentro de una misma cadena. La presencia de unos bloques de construcción que no son de ácido urónico y/o que no son de hexosamina (p.ej., restos de PEG fijados) no se incluye en la determinación de la longitud media de cadena. La longitud media de cadena se determina dividiendo el peso molecular medio numérico (M_n) por el peso molecular medio numérico para un disacárido (500 Da). Unos métodos para determinar el peso molecular medio numérico se describen más abajo usando el SEC MALS.

Ácidos urónicos escindidos en una de sus funciones de glicol

Una preparación de polisacáridos que aquí se describe puede no incluir sustancialmente la apertura de los anillos de glicósidos que convencionalmente se denominan derivados de reducción-oxidación (RO acrónimo de "reduction - oxidation). Los derivados de RO tienen uno o más anillos de glicósidos que ha(n) sido abierto(s), p.ej. en el enlace entre C2 y C3.

Estructura con un extremo no reductor

Una preparación que aquí se describe puede tener una mezcla de ΔU y de ácido idurónico (I)/ácido glucurónico (G) en el extremo no reductor de las cadenas de la preparación. Preferiblemente, alrededor de 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o la totalidad de las cadenas de polisacáridos de la preparación tienen un ΔU . La nomenclatura "-U" se refiere a un ácido urónico insaturado (ácido idurónico (I), ácido glucurónico (G) o ácido galacturónico) que tiene un doble enlace que se ha introducido en la posición 4-5 como un resultado, p.ej. de la acción como liasa de una heparinasa, una HSGAG liasa, u otra enzima que tenga una similar especificidad para un substrato. La cantidad de ΔU y/o de I/G en el extremo no reductor de las cadenas dentro de la muestra se puede determinar usando, p.ej., una 2D-RMN. En dichos métodos, el número total de las cadenas que tienen una hexosamina acetilada (H_{NAc}) en el extremo reductor y/o el número de confirmaciones de que se ha abierto el anillo en el extremo reductor se pueden

usar para determinar el número total de las cadenas dentro de la preparación. El porcentaje total de las cadenas que tienen un ΔU y/o I/G en el extremo no reductor se puede comparar con el número total de cadenas en la preparación. En algunas de las preparaciones que aquí se describen, menos que 90 %, menos que 95 %, menos que 98 %, menos que 99 %, o ninguna de las cadenas en la preparación, tienen un ΔU sulfatado en el extremo no reductor.

Estructuras con un extremo reductor

En algunos casos, menos de un 50 %, p.ej., no más que aproximadamente un 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de las cadenas en la preparación tiene una estructura modificada con un extremo reductor.

Polidispersidad

La polidispersidad de unas preparaciones de polisacáridos que aquí se divulgan es de aproximadamente 2,1 o menos, p.ej., aproximadamente de 1,6 a 2,1 (p.ej., aproximadamente de 1,6 a 2,0, aproximadamente de 1,7 a 2,0, aproximadamente de 1,6 a 1,9 o aproximadamente de 1,7 a 1,9).

El término "polidisperso" o "polidispersidad" se refiere al peso molecular medio ponderado de una composición (M_w) dividido por el peso molecular medio numérico (M_n). El peso molecular medio numérico (M_n) se calcula a partir de la siguiente ecuación $M_n = \sum ci / (\sum ci/mi)$: La variable ci es la concentración del polisacárido en la rodaja i y M_i es el peso molecular del polisacárido en la rodaja i . Las sumas se toman en un pico cromatográfico que contiene muchas rodajas de datos. Una rodaja de datos puede ser representada gráficamente como una línea vertical en un diagrama de un pico cromatográfico en función del tiempo. Por lo tanto, el pico de elución se puede subdividir en muchas rodajas. El peso molecular medio numérico es un cálculo dependiente del peso molecular y de la concentración de cada rodaja de datos. Unos métodos para determinar el peso molecular medio numérico se han descrito anteriormente, y se usaron para determinar asimismo la polidispersidad.

Métodos de producir preparaciones de polisacáridos

Se consideran también diversos métodos de producir preparaciones de polisacáridos, p.ej., una preparación que se describe en el presente contexto. Por ejemplo, tales métodos incluyen un método de producir una preparación de polisacáridos que tiene una longitud media de cadena de aproximadamente 7 hasta 18 disacáridos. El método incluye proporcionar una preparación de heparina precursora que tiene una longitud de cadena mayor que 7 a 18 disacáridos y tratar a la preparación de heparina precursora (p.ej. mediante una despolimerización enzimática o química, p.ej. mediante una despolimerización con el ácido nitroso), para obtener una preparación de polisacáridos que tiene una longitud media de cadena de aproximadamente 7 a 18 disacáridos. Preferiblemente, la precursora tiene una longitud media de cadena de aproximadamente 7 a 14, p.ej. de 8 a 13 disacáridos. Por ejemplo la preparación de heparina precursora puede ser una heparina no fraccionada.

La preparación de una heparina precursora puede ser elaborada por un método que comprende una despolimerización (p.ej. una despolimerización enzimática). En uno de los casos, una enzima apropiada es una que disocia a un UFH en el sitio del pentasacárido ($H_{NAc/S,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$), opcionalmente entre otros sitios. En otro ejemplo, una enzima apropiada es una que disocia a un $I_{2S}H_{NS}$ o $I_{2S}H_{AC}$. Por ejemplo, se puede usar la Heparinasa I de *Bacteroides thetaiotaomicron*. Otras enzimas se pueden identificar escrutando enzimas en cuanto a las anteriores aptitudes, p.ej. tal como se determina mediante una 1D RMN, una 2D RMN, una HSQC-RMN, una espectrometría de masas, p.ej. una MS de electropulverización, una MALDI-MS, una LC-MS o una GPC-MS, usando el Arixtra u otro polisacárido apropiado como un testigo para la actividad de la enzima y/o la detección por MALDI de los productos de disociación.

Actividades biológicas

Las preparaciones que aquí se describen tienen una actividad anti-metastásica tal como se ensaya en un modelo de metástasis en un animal, en el que unas células del melanoma B16F10, inyectadas en las venas del rabo de unos ratones C57/BL son detenidas en los pulmones y pueden proliferar como focos pulmonares discretos. Este ensayo se describe generalmente en la cita de Gabri y colaboradores, 2006, Clin. Cancer Res., 12:7092-98. Una preparación puede tener adicionalmente una actividad en otros modelos experimentales de metástasis, incluyendo el ensayo de C170HM2 en el que unas células del linaje de cáncer colorrectal humano C170HM2 se inyectan dentro de la cavidad peritoneal, cuando el sitio primario de metástasis se encuentra en el hígado. Las preparaciones que aquí se describen en el presente contexto pueden también mostrar una actividad anti-metastásica en unos modelos espontáneos de metástasis, tales como el modelo AP5LV, en el que unas células del cáncer colorrectal humano AP5LV se implantan dentro de la pared peritoneal y exhiben una metástasis espontánea en el pulmón, o el modelo 4T1, en el que unas células de carcinoma de mama murino 4T1, que han sido implantadas en la almohadilla grasa mamaria exhiben una metástasis espontánea en el pulmón y en otros órganos.

Las preparaciones que aquí se describen pueden fijar y/o modular (p.ej., inhibir) una actividad de fijación/inhibición de una o más de las proteínas VEGF, FGF, SDF-1 y P-selectina. En algunos casos, una interacción de la preparación con (p.ej., una fijación a) una proteína diana (p.ej., VEGF, FGF, SDF-1 o P-selectina se puede ensayar p.ej. in vitro, usando unos métodos conocidos en la especialidad. Se conocen numerosos/as métodos y técnicas para detectar la fijación o modulación (p.ej., la inhibición) de una actividad, p.ej., unos ensayos de competencia entre receptores patrones, una transferencia de energía por fluorescencia (FET acrónimo de fluorescence energy

transfer), una transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET acrónimo de fluorescence resonance energy transfer) (véanse por ejemplo, la patente de los EE.UU. n° 5.631.169; la patente de los EE.UU. n° 4.868.103), y una polarización de fluorescencia (FP acrónimo de fluorescence polarization). En algunos casos, el proceso de evaluar la fijación de una preparación de polisacáridos a una proteína diana puede incluir una vigilancia en tiempo real de la interacción de fijación, p.ej., usando un análisis de interacción biomolecular (BIA con el acrónimo de Biomolecular Interaction Analysis) (véanse p.ej., las citas de Sjolander y Urbaniczky (1991) Anal. Chem., 63:2338-2345 y de Szabo y colaboradores (1995) Curr. Opin. Struct. Biol., 5:699-705). Una resonancia de plasmones superficiales o un "BIA" detecta unas interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin tener que marcar a ninguno de los interactuantes (p.ej., el BIAcore).

Unas actividades de VEGF, FGF, y P-selectina en células in vitro e in vivo son bien conocidas en la especialidad. La aptitud de una preparación de polisacáridos para modular (p.ej., inhibir) una actividad de VEGF, FGF, y P-selectina se puede ensayar in vitro o en un ensayo basado en células o in vivo en un organismo. Por ejemplo, se puede ensayar la aptitud de una preparación de polisacáridos para modular (p.ej. inhibir) la actividad de una de las VEGF, FGF, y P-selectina para modular (p.ej. estimular) la proliferación de células endoteliales, p.ej. las células epiteliales de la vena umbilical humana. Unos métodos ilustrativos de determinar la modulación de la actividad de FGF se pueden encontrar en la patente de los EE.UU. n° 5.733.893. Un ensayo basado en células se puede realizar usando una única célula o una colección de por lo menos dos o más células. La célula puede ser una célula de levadura (p.ej., *Saccharomyces cerevisiae*) o una célula de mamífero, p.ej. una línea celular.

Composiciones farmacéuticas

Se proporcionan unas composiciones, p.ej. unas composiciones farmacéuticamente aceptables, que incluyen una preparación que se ha descrito en el presente contexto, formulada conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente contexto, el concepto de "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye uno cualquiera y la totalidad de los disolventes, medios de dispersión, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y otros similares que sean fisiológicamente compatibles con una administración por vía parenteral. El vehículo puede ser apropiado para cualquier administración por vía parenteral, p.ej., una administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, rectal, inhalada o espinal (p.ej., por inyección o infusión).

Las composiciones pueden presentarse en una diversidad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, unas formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas tales como unas soluciones líquidas (p.ej. unas soluciones inyectables e infusibles es decir aptas para inyectarse o infundirse), dispersiones o suspensiones, y liposomas. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Unas composiciones preferidas típicas están en la forma de unas soluciones inyectables o infusibles. El modo de administración preferido es el parenteral (p.ej. intravenoso, subcutáneo, intraocular, intraperitoneal o intramuscular). En un ejemplo preferido, la preparación se administra por infusión o inyección intravenosa. En otro ejemplo preferido, la preparación se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las frases " administración parenteral " y "administrada parenteralmente" tal como se usan en el presente contexto, significa unos modos de administración diferentes de una administración por vía enteral o tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación ninguna, una inyección o infusión por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intravítrea, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidal, intraespinal, epidural e intraesternal.

Las composiciones terapéuticas deberían típicamente ser estériles y estables en las condiciones de producción y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, una microemulsión, una dispersión, un liposoma u otra estructura ordenada o encargada que sea apropiada para presentarse en una alta concentración. Unas soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (es decir, la preparación de polisacáridos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de los ingredientes que se han enumerado más arriba, según se requiera, seguido por una esterilización filtrada. Generalmente, unas dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo dentro de un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión de carácter básico y los otros ingredientes requeridos, seleccionados entre los más arriba enumerados. En el caso de unos polvos estériles para la preparación de unas soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son una desecación en vacío y una desecación por congelación (esto es liofilización) que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución estéril y filtrada previamente del mismo. La apropiada fluidez de una solución puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como una lecitina, por el mantenimiento del requerido tamaño de partículas en el caso de una dispersión y por el uso de unos agentes tensioactivos. Una absorción prolongada de composiciones inyectables se puede llevar a cabo incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, seleccionado por ejemplo entre diversos polímeros, unas sales monoestearatos y una gelatina.

Para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta /el modo de administración que se prefiere es una inyección o infusión por vía intravenosa. Tal como se apreciará por un profesional experto, la ruta y/o el modo de administración variará(n) dependiendo de los resultados deseados.

- 5 Unas formulaciones para inyección pueden ser presentadas en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo en la de ampollas, jeringas, plumas con jeringas, o en unos recipientes para dosis múltiples, p.ej. con un agente conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar unas formas tales como las de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener unos agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersamiento.
- 10 Para una administración por inhalación, la preparación se puede suministrar de manera conveniente como una forma de presentación para la pulverización de aerosoles a partir de envases presurizados o de un nebulizador, con el uso de un agente propulsor apropiado, p.ej. diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede ser determinada proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular, para su uso en un aparato inhalador o insuflador, unas cápsulas y unos cartuchos de p.ej. gelatina, que contienen una mezcla de polvos del compuesto y una base en polvo apropiada tal como lactosa o un almidón. Por lo demás, se pueden usar unas formulaciones de polvos secos para una terapia por inhalación. Dichas formulaciones de polvos secos se pueden preparar tal como se describe, p.ej., en el documento de solicitud de patente internacional WO 02/32406.
- 15 Además de las composiciones que se han descrito con anterioridad, los compuestos se pueden formular también como una preparación de depósito. Tales formulaciones de larga acción se pueden formular con unos apropiados materiales poliméricos o hidrófobos (por ejemplo en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o de unas resinas para intercambio de iones, o como unos derivados escasamente solubles, por ejemplo como una sal escasamente soluble.
- 20 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender también unos apropiados vehículos o excipientes sólidos o en una fase de gel.
- Las composiciones se pueden incluir dentro de un recipiente, envase o dispositivo dispensador conjuntamente con instrucciones para la administración.
- 25 La preparación se puede administrar con unos dispositivos para la implantación a corto o largo plazo, por ejemplo un dispositivo de stent. La preparación se puede implantar por vía subcutánea, se puede implantar dentro de tejidos u órganos (p.ej. en la arteria coronaria, en la arteria carótida, en la arteria renal o en otras arterias periféricas, en venas, en el riñón, en la córnea y el corazón, en el cuerpo vítreo, en el cerebro, etc.) o se puede implantar en unos espacios fisiológicos situados alrededor de tejidos y órganos (p.ej. en la cápsula renal, el pericardio o el espacio torácico o peritoneal).
- 30 La preparación se puede usar también para revestir diversos dispositivos médicos. Por ejemplo, la preparación se puede usar para revestir a un dispositivo de stent o un circuito extracorporal. Tales formulaciones de las preparaciones pueden incluir usar, p.ej., unas perlas de liberación controlada, unos geles o unas microesferas de liberación controlada así como diversos polímeros tales como un PLGA, una celulosa, un alginato u otros polisacáridos.
- 35 Unos regímenes de dosificación son ajustados para proporcionar la óptima respuesta deseada (p.ej. una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis puede ser reducida o aumentada proporcionalmente, tal como se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular unas composiciones parentales en una forma de dosificación unitaria para obtener una facilidad de administración y una uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria, tal como se usa en el presente contexto, se refiere a unas unidades físicamente discretas que sean idóneas como dosificaciones unitarias para los sujetos que hayan de ser tratados; cada unidad contiene una cantidad previamente determinada del compuesto activo, que se calcula para producir el deseado efecto terapéutico en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidades de dosificación se dicta por, y es dependiente directamente de, (a) las características singulares del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se haya de conseguir, y (b) las limitaciones que son inherentes en la técnica de formular composiciones tales como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en unos individuos.
- 40 Se ha de hacer observar que los valores de la dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la condición que haya de ser aliviada. Se ha de entender además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ser ajustados a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las composiciones
- 45 50 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una cantidad terapéuticamente efectiva de una preparación. Una terapéuticamente efectiva de la preparación puede variar de acuerdo con unos factores tal como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto y puede incluir más de una dosis unitaria. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la que cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales de la preparación estén contrapesados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede inhibir a un parámetro medible, p.ej., la actividad del VEGF, la actividad del FGF, la actividad de la P-selectina o el tamaño o la tasa de crecimiento de lesiones metastásicas, p.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 todavía más preferiblemente por al menos aproximadamente 70 % u 80 % con relación a unos sujetos no tratados. La aptitud de un compuesto para inhibir a un parámetro medible, p.ej., a una
- 55 60

metástasis o una angiogénesis, puede ser evaluada en un sistema de modelo en un animal o en un ser humano (p.ej., en una prueba clínica).

Alternativamente, una propiedad de una composición puede ser evaluada examinando la actividad del compuesto en un ensayo *in vitro*. Unas dosis ilustrativas para la administración por vía intravenosa de la preparación de polisacáridos son las aproximadamente de 0,03 mg/kg a 0,45 mg/kg, p.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, de manera preferible 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, de manera preferible aproximadamente de 0,30 a 0,50 mg/kg, p.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.

También se divulgan unos estuches que comprenden una de las preparaciones de polisacáridos que aquí se describen. El estuche puede incluir uno o más de otros elementos que incluyen: unas instrucciones de uso; otros reactivos, p.ej., un agente terapéutico; unos dispositivos u otros materiales para preparar a la preparación de polisacáridos para su administración, unos vehículos farmacéuticamente aceptables; y unos dispositivos u otros materiales para la administración a un sujeto. Las instrucciones pueden incluir unas instrucciones para una aplicación terapéutica, incluyendo las dosificaciones y/o los modos de administración que se sugieran, p.ej., en un paciente que tenga un trastorno, p.ej., un trastorno que aquí se describe. El estuche puede contener además por lo menos un reactivo adicional, tal como un agente de diagnóstico o terapéutico, p.ej., un agente de diagnóstico o terapéutico como aquí se describe, formulado según sea apropiado, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

Usos

Las preparaciones de polisacáridos se pueden usar para tratar a un sujeto. Tal como se usa en el presente contexto, un sujeto es un mamífero, p.ej. un mamífero experimental no humano, un mamífero veterinario o un ser humano. Los mamíferos no humanos incluyen un primate, una vaca, un caballo, un cerdo, un cordero, una cabra, un perro, un gato o un roedor.

Las preparaciones se pueden usar, por ejemplo, para tratar o prevenir un trastorno metastásico (p.ej., un cáncer, p.ej., un carcinoma u otro cáncer sólido). Tal como se usa en el presente contexto, se entiende que el término "cáncer" ha de incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o de procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos que se han transformado malignamente, de manera independiente del tipo histopatológico o del estadio de invasividad. Los métodos y las composiciones que aquí se divulgan son particularmente útiles para tratar, o reducir el tamaño, los números o la tasa de crecimiento de las lesiones metastásicas que estén asociadas con un cáncer.

Unos ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos, tumores de tejidos blandos, tumores hematopoyéticos y lesiones metastásicas. Unos ejemplos de tumores sólidos incluyen unas malignidades, p.ej., sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas, de los diversos sistemas de órganos, tales como los que afectan a un pulmón, a una mama, a un linfoide, a un órgano gastrointestinal (p.ej., al colon), a los órganos genitales y al tracto genitourinario (p.ej., células renales, uroteliales o de la vejiga), a la faringe, al sistema nervioso central CNS (p.ej., células neurales o gliales), a la piel (p.ej., un melanoma) y al páncreas, así como a unos adenocarcinomas que incluyen malignidades tales como la mayor parte de los cánceres de colon, de un cáncer rectal, de un carcinoma de células renales, de un cáncer de hígado, de un carcinoma de células no pequeñas del pulmón, de un cáncer del intestino delgado y de un cáncer del esófago. Los métodos y las composiciones que aquí se divulgan son particularmente útiles para tratar, p.ej., reducir o retrasar, unas lesiones metastásicas que están asociadas con los cánceres más arriba mencionados. En algunos casos, el paciente habrá de ser sometido a una o más operaciones de retirada quirúrgica de un tejido, una quimioterapia u otra terapia contra el cáncer y el objetivo principal o único será el de lesiones metastásicas, p.ej., unas metástasis en la médula ósea o unos nódulos linfáticos.

Los métodos que aquí se divulgan, p.ej., los métodos de tratamiento, pueden incluir además la etapa de vigilar al sujeto, p.ej., acerca de un cambio (p.ej., un aumento o una disminución) en uno o más de los siguientes parámetros: el tamaño de un tumor; los niveles de un marcador de cáncer, para un paciente con un cáncer; el tamaño o la tasa de aparición de nuevas lesiones, p.ej., en un examen; la aparición de nuevos síntomas relacionados con una enfermedad, el tamaño de una masa de tejido blando, p.ej., una disminución o estabilización; la calidad de vida, p.ej., la magnitud del dolor asociado con una enfermedad, p.ej., un dolor de huesos; o cualquier otro parámetro relacionado con un resultado clínico. El sujeto puede ser vigilado en uno o más de los siguientes períodos: antes del comienzo del tratamiento; durante el tratamiento; o después de que se hayan administrado uno o más elementos del tratamiento. Una vigilancia se puede usar para evaluar la necesidad de un tratamiento ulterior con la misma preparación o para un tratamiento adicional con unos agentes adicionales. Generalmente, una disminución en uno o más de los parámetros que más arriba se han descrito es indicativa de la condición mejorada del sujeto.

Las preparaciones que aquí se describen se pueden administrar a un sujeto en dosis únicas o múltiples para tratar o prevenir un trastorno metastásico o canceroso, p.ej., un trastorno canceroso que aquí se describe.

Las preparaciones que aquí se describen se pueden usar también para tratar trastornos inflamatorios, autoinmunitarios, fibróticos, fibroproliferativos, atópicos o angiogénicos. Unos ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, un asma, una artritis reumatoide, una

enfermedad inflamatoria intestinal (incluyendo una enfermedad de Crohn y una colitis ulcerosa), una esclerosis múltiple, una psoriasis, unas lesiones por isquemia y reperfusión, un choque séptico, una degeneración macular relacionada con la edad, una aterosclerosis, una enfermedad de Alzheimer, una enfermedad cardiovascular, una vasculitis, unas diabetes de los tipos I y II, un síndrome metabólico, una retinopatía diabética o una reestenosis.

5 Unos ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, un asma, una artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria intestinal, una esclerosis múltiple, una psoriasis, una diabetes del tipo I, un lupus sistémico eritematoso (SLE), el síndrome de Sjögren, una tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Graves, el síndrome de Guillain-Barré, una hepatitis autoinmunitaria, una miastenia grave. Unos ejemplos de enfermedades fibróticas incluyen, pero no se limitan a, una escleroderma, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, una
10 nefropatía diabética, una sarcoidosis, una fibrosis pulmonar idiopática, una cirrosis, una fibrosis quística, unos fibroides postoperatorios o una reestenosis. Ejemplos de una enfermedad atópica incluyen pero no se limitan a una dermatitis atópica, un asma atópico y una rinitis alérgica.

Unos ejemplos de trastornos fibroproliferativos incluyen una escleroderma sistémica y local, unos queloides y unas cicatrices hipertróficas, una aterosclerosis, una reestenosis, un fibrosarcoma y una artritis reumatoide. Unos
15 ejemplos de una cicatrización asociada con un trauma incluyen una cicatrización debida a una operación quirúrgica, o una fibrosis inducida por medios quimioterapéuticos, una fibrosis inducida por una radiación, una cicatrización asociada con una lesión o unas quemaduras.

En un caso, las preparaciones de polisacáridos se usan para inhibir una angiogénesis, p.ej. para tratar unos trastornos angiogénicos. Una angiogénesis, tal como se usa en el presente contexto, es una formación inapropiada
20 de nuevos vasos sanguíneos. Unos trastornos angiogénicos incluyen, pero no se limitan a, unos tumores, unos trastornos neovasculares de los ojos, una endometriosis, una degeneración macular, una osteoporosis, una psoriasis, una artritis, un cáncer y unos trastornos cardiovasculares.

Las preparaciones que se describen en el presente caso se pueden usar para tratar o prevenir unos trastornos infecciosos tales como p.ej., una malaria.

25 Se entiende que algunos trastornos caerán dentro de más de una categoría de enfermedad que aquí se describe.

Terapia en combinación

Los métodos y las composiciones que se divulgan en el presente caso se pueden usar en combinación con otras modalidades terapéuticas. El concepto de administrado "en combinación", tal como se usa en el presente contexto, significa que se prestan al sujeto dos (o más) tratamientos diferentes en el curso de la afección del sujeto con el
30 trastorno tal como los efectos de los tratamientos sobre el solapamiento en el paciente en un momento en el tiempo. En algunos casos, la prestación de un tratamiento está realizándose todavía cuando comienza la prestación del segundo, de modo tal que hay un solapamiento en términos de la administración. A esto se hace referencia algunas veces como "prestación simultánea " o "concurrente". En otros casos, la prestación de un tratamiento termina antes de que comience la prestación del otro tratamiento. En algunos ejemplos de un caso cualquiera, el tratamiento es más efectivo debido a una administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más efectivo, p.ej., se
35 observa un efecto equivalente con menos cantidad del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en una mayor extensión, que lo que se observaría si el segundo tratamiento fuese administrado en la ausencia del primer tratamiento, o la situación análoga se observa con el primer tratamiento. En algunos casos, la prestación es tal 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, enteramente aditivo o mayor que el aditivo. La prestación puede ser tal que un efecto del primer tratamiento suministrado sea todavía detectable cuando se suministra el segundo.

En un ejemplo, los métodos incluyen administrar al sujeto una preparación que aquí se describe, en combinación
45 con una o más terapias adicionales, p.ej., una intervención quirúrgica, una terapia por radiación, o una administración de otra preparación terapéutica. En un ejemplo, la terapia adicional puede incluir una quimioterapia, p.ej., con un agente citotóxico. En un ejemplo, la terapia adicional puede incluir una terapia dirigida hacia un objetivo, p.ej., un agente inhibidor de la tirosina cinasa, un agente inhibidor de proteasomas, o un agente inhibidor de proteasas. En un ejemplo, la terapia adicional puede incluir un compuesto anti-inflamatorio, anti-angiogénico, anti-fibrótico o anti-proliferativo, p.ej., un esteroide, un agente inmunomodulador biológico, un anticuerpo monoclonal, un
50 fragmento de anticuerpo, un aptámero, un siRNA es decir un ARN de interferencia corto, una molécula antisentido, una proteína de fusión, una citocina, un receptor de citocina, un esteroide, un agente dilatador bronquial, una estatina, un agente anti-inflamatorio (p.ej., el metotrexato), un NSAID (es decir un fármaco antiinflamatorio no esteroide). En otro ejemplo, la terapia adicional podría incluir tratamientos terapéuticos de diferentes clases. La preparación de polisacáridos y la terapia adicional se pueden administrar de manera simultánea o secuencial.

Unos agentes citotóxicos ilustrativos, que se pueden administrar en combinación con la preparación de polisacáridos, incluyen agentes anti-microtúbulos, agentes inhibidores de topoisomerasa, antimetabolitos, agentes
55 inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, agentes intercalantes, agentes capaces de interferir con una secuencia de transducción de señales, agentes que favorecen a una apoptosis y una radiación. En un ejemplo, el agente citotóxico, que se puede administrar junto con una preparación aquí descrita, es el taxol, la citocalasina B, la gramicidina D, el bromuro de etidio, la emetina, la mitomicina, el etoposido, el tenoposido, la vincristina, la vinblastina, la colquicina, la doxorubicina, la daunorubicina, la dihidroxi antracina diona, la mitoxantrona, la
60

mitramicina, la actinomicina D, la 1-deshidrotestosterona, unos glucocorticoides, la procaína, la tetracaína, la lidocaína, el propranolol, la puromicina y unos maitansinoides.

5 La terapia en combinación puede incluir también una composición que aquí se divulga, formulada concomitantemente y/o administrada concomitantemente con uno o más agentes terapéuticos adicionales, p.ej., uno o más agentes anti-cancerosos, agentes citotóxicos o citostáticos, un tratamiento hormonal, unas vacunas y/o otras inmunoterapias.

El invento se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que deberán de ser considerados como limitativos.

EJEMPLOS

10 Ejemplo 1: Producción de una preparación de polisacáridos

Este ejemplo describe la producción de una preparación de polisacáridos que aquí se describe

Visión de conjunto del método:

15 Una heparina no fraccionada (5 g) se disolvió en 50 ml de un tampón (50 mM de acetato de sodio y 10 mM de acetato de calcio, de pH 7,0) y se equilibró a 30 °C. Subsiguientemente, una suspensión de la Heparinasa I de *Bacteroides thetaiotaomicron* (2,25 UI/g) se añadió a esta solución de reacción, y la reacción se dejó en agitación durante por lo menos 16 horas mientras que la temperatura se mantenía entre 20 y 30 °C. El grado de despolimerización de esta reacción se vigiló midiendo la absorbancia a 232 nm (UV₂₃₂), y la reacción se sofocó cuando la UV₂₃₂ alcanzó un valor de la absorbancia que estaba comprendido entre 1,7 y 2,0. Subsiguientemente, se añadieron 5 g de cloruro de sodio a la solución de reacción, seguido por la adición de metanol (150 ml) con una agitación constante. El precipitado se dejó envejecer a 6 °C durante 2-24 horas. Este precipitado se filtró luego y se secó para proporcionar la deseada preparación de polisacáridos en un rendimiento de 75-80 %. Se encontró que la preparación de polisacáridos obtenida poseía las siguientes características:

PM: 4.300-4.900

25 Distribución de PM: (i) < 3.000 Daltones: 36-45 %
(ii) 3.000-8.000 Daltones: 42-50 %
(iii) > 8.000 Daltones : 6-15 %

Actividad anti-Xa: 25-40 UI/mg

Actividad anti-IIa: 5-15 UI/mg

30 Ejemplo 2: Propiedades anti-metastásicas de unas preparaciones de polisacáridos

Este ejemplo muestra que las preparaciones de polisacáridos tienen una actividad anticancerosa y anti-metastásica en múltiples modelos de metástasis.

Modelo A: Modelo de una metástasis experimental de melanoma murino (B16F10 iv)

35 Una preparación de polisacáridos que se ha producido tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 (a la que aquí se hace referencia cómo "MONC703") mostró una actividad anti-metástasis en un modelo de metástasis experimental de melanoma murino.

40 Unas ratonas C57BL/6 hembras (con una edad de 9-10 semanas) se trataron una vez con una única dosis (10 mg/kg) de MONC703, de dalteparina / Fragmin® (una LMWH de la que se ha informado que tiene una actividad anti-metastásica), o de MONC 202 (testigo negativo, LMWH N-desulfatada) inmediatamente antes de una inyección i.v. de 2×10^5 células de B16F10. Las ratonas se sacrificaron en el día 21 y la carga tumoral se calculó como el peso de pulmón - peso de pulmón normal. Tal como se muestra en la Figura 1, la MONC703 inhibía significativamente la colonización del pulmón con una B16F10 en relación con un testigo (no tratado) agrupado.

Modelo B: Metástasis de cáncer de colon en el hígado

La MONC703 mostró una actividad anti-metástasis en un modelo de metástasis hepática ortotópica

45 La metástasis hepática se inició por una inyección por vía intraperitoneal de células de un tumor colorrectal humano C17OHM2 dentro de unos ratones atímicos desnudos (es decir, desprovistos de inmunidad) (nu/nu) MF1 machos. Se usó la mezcla de 5FU y leucovorina como un testigo positivo.

50 Las células de C17OHM2 se mantuvieron in vitro en un medio de cultivo RPMI (de Sigma) que contenía 10 % (v/v) de un suero de bovino fetal inactivado por calor y 2 mM de L-glutamina a 37 °C en CO₂ al 5 % y en condiciones

húmedas. Las células procedentes de unas monocapas sub-confluentes se cosecharon con EDTA al 0,025 %, se lavaron en un medio de cultivo y se volvieron a suspender en una solución salina estéril tamponada con fosfato, a un pH de 7,4 (PBS) para su administración in vivo. $1,5 \times 10^6$ células en un volumen de 1 ml se inyectaron por vía intraperitoneal en 65 ratones, y los ratones se asignaron a unos grupos de tratamiento como se detallan seguidamente.

5

Grupo 1: n = 10	testigo con vehículo
Grupo 2: n = 10	25 mg/kg de 5FU/leucovorina i.v. tratados en ciclo en los días 1, 3, 5, 7
Grupo 3: n = 10	5 mg/kg del compuesto 1 (dalteparina) por vía s.c. una vez por día
Grupo 4: n = 10	5 mg/kg del compuesto 3 (M703) s.c. una vez por día
10 Grupo 5: n = 10	15 mg/kg del compuesto 3 s.c. una vez por día
Grupo 6: n = 10	30 mg/kg del compuesto 3 s.c. una vez por día
Grupo 7: n = 5	no tratado.

15

El tratamiento se inició en el día 1 a continuación de una inyección de células y se continuó hasta el día 35 o hasta que la condición clínica del animal requiriese la terminación. Un ratón en el grupo 6 se hizo terminar en el día 20 debido a un rabo negro, a un magullamiento y a un aspecto muy pálido. Los grupos 5 y 6 pasaron sin una dosis en el día 5. No se observaron efectos desfavorables de los compuestos de ensayo en unos ratones que eran portadores de los tumores.

El estudio se terminó en el día 35 y los tumores presentes en el hígado fueron extirpados y pesados. Los pesos medios de los tumores hepáticos y el área de sección transversal se recopilan en la Tabla 2.

20

Tabla 2. Resumen del peso medio de tumores y análisis estadístico

Grupo	Tratamiento	Peso medio de tumores			Área media de tumores		
		(g)	(% de vehículo)	ANOVA de una vía	(mm ²)	(% de vehículo)	ANOVA de una vía
1	Vehículo	0,097	100,00	-	34,18	100,00	-
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 M703	0,134	138,14	NS	45,63	133,5	NS
5	15 mg/kg de M703	0,151	155,67	NS	40,79	119,34	NS
6	30 mg/kg de M703	0,019	19,59	p = 0,026	8,86	25,92	p = 0,049
7	Testigo no tratado	0,31	-	p = 0,035	83,58	244,53	p = 0,084

* El análisis estadístico y el % del testigo para el grupo 2 se calcularon en comparación con el grupo 7, no con el grupo 1.
NS = no significativo

25

30 mg/kg de M703 redujeron de una manera significativa el tamaño del tumor en aproximadamente un 80 % (p = 0,017) cuando se comparó con el grupo testigo con vehículo. La dalteparina redujo el peso del tumor hepático en aproximadamente un 81 % (p = 0,017) cuando se comparó con el grupo testigo con vehículo. Similarmente, el área de la sección transversal de los tumores mostró también una reducción significativa con 30 mg/kg de M703 (p = 0,049) y con dalteparina (p = 0,027).

30

El testigo positivo con 5FU/leucovorina (grupo 2) disminuyó de una manera significativa el peso del tumor en el hígado, en aproximadamente un 88 % (p = 0,006, o alternativamente una disminución de 84 % en el área de la sección transversal medida del tumor p = 0,011) cuando se comparó con el grupo testigo no tratado (grupo 7). Sin embargo, cuando se comparó con el grupo testigo con vehículo (grupo 1), la disminución en el tamaño del tumor era de 62 % y no era significativa. Se observó que el tamaño del tumor hepático en el grupo testigo con vehículo fue un 69 % más pequeño que el medido en el grupo no tratado (la diferencia en el peso del tumor era significativa). Esto fue debido posiblemente a la manipulación de los ratones sobre una base diaria desde un estadio temprano con el

fin de administrar las dosis en los grupos de tratamiento, lo que puede haber reducido la adherencia del tumor dentro del hígado.

Los pesos de los ratones se vigilaron a lo largo de toda la duración del estudio. Los pesos de los ratones para cada grupo permanecieron dentro de un margen aceptable para todos los grupos a lo largo del estudio.

- 5 Este ejemplo demuestra las propiedades anti-metastásicas de la preparación de polisacáridos que aquí se describe.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación de polisacáridos que tiene una actividad anti-Xa y una actividad anti-IIa cada una de ellas de menos que 50 UI/mg, en que la preparación no tiene residuos de un ácido urónico escindidos en glicol y en que la preparación se compone de unos polisacáridos de Fórmula I:



en que n es un número entero tal que $n = 1-20$;

w = -2OS o -2OH;

x = -NS o -NAc;

y = -3OS o -3OH;

10 z = -6OS o -6OH; y

en que U indica un residuo de un ácido urónico y H indica un residuo de una hexosamina;

y en que los w, x, y, y z son iguales o diferentes en cada residuo de U o H, y

en que la preparación es obtenible por un método que comprende digerir una heparina no fraccionada (UFH) con la Heparinasa I de *Bacteroides thetaiotaomicron*.

15 2. La preparación de polisacáridos de la reivindicación 1, en que n es = 1-15.

3. La preparación de polisacáridos de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene unas cadenas de polisacáridos que contienen más de un 40 % de residuos del disacárido $U_{2S}H_{NS,6S}$

4. La preparación de polisacáridos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que tiene un grado de desulfatación de menos que un 40 % .

20 5. La preparación de polisacáridos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en que:

(a) menos de un 2 % de las cadenas de polisacáridos de la preparación comprende el tetrasacárido $UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ y/o

(b) un 20-30 % de las cadenas de polisacáridos de la preparación comprende el pentasacárido $H_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$; y/o

25 (c) un 20-30 % de las cadenas de polisacáridos de la preparación comprende el tetrasacárido $U_{2S}H_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$

6. La preparación de polisacáridos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en que un 10-50 % de los oligosacáridos de la preparación tiene un peso molecular < 3.000 Da; un 40-65 % de los oligosacáridos tiene un peso molecular comprendido entre 3.000-8.000 Da, y un 5-30 % de los oligosacáridos tiene un peso molecular > 8.000 Da.

30 7. La preparación de polisacáridos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en que la preparación tiene una polidispersidad de 1,6 a 2,1.

8. La preparación de polisacáridos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en que la preparación tiene una actividad anti-Xa de desde 10 hasta menos que 50 UI/mg.

35 9. La preparación de polisacáridos de la reivindicación 8, en que la preparación tiene una actividad anti-Xa de desde 20 hasta menos que 50 UI/mg.

10. Una composición farmacéutica que comprende una preparación de polisacáridos de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones.

40 11. Una preparación de polisacáridos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para el uso en el tratamiento de una enfermedad metastásica; una enfermedad mediada por VEGF, FGF, SDF-1 y/o selectina; una enfermedad inflamatoria; una enfermedad autoinmunitaria; una fibrosis o una enfermedad que implica una angiogénesis en un sujeto.

12. La preparación para el uso de la reivindicación 11, en que la enfermedad metastásica es un carcinoma.

13. La preparación para el uso de la reivindicación 11, en que la preparación ha de ser administrada en combinación con un agente citotóxico.

45 14. Un método de producir una preparación de polisacáridos tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, comprendiendo el método:

(1) digerir una heparina no fraccionada (UFH) con la Heparinasa I de *Bacteroides thetaiotaomicron* para proporcionar una heparina despolimerizada; y

(2) aislar la heparina despolimerizada para producir de esta manera la preparación de polisacáridos;

en que la etapa de digerir comprende opcionalmente:

(i) vigilar la absorbancia a 232 nm durante la etapa de digerir; y

(ii) detener la reacción de digestión cuando la absorbancia a 232 nm alcanza un valor comprendido entre 1,7 y 2,0; y

5 la etapa de aislar incluye opcionalmente precipitar la heparina despolimerizada con una sal y con un disolvente orgánico polar.

15. El método de la reivindicación 14, en que el método comprende adicionalmente preparar una composición farmacéutica que comprende la preparación de polisacáridos.

10 16. El uso de una preparación de polisacáridos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para la producción de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad metastásica; una enfermedad mediada por VEGF, FGF, SDF-1 y/o selectina; una enfermedad inflamatoria; una enfermedad autoinmunitaria; una fibrosis; o una enfermedad que implica una angiogénesis en un sujeto.

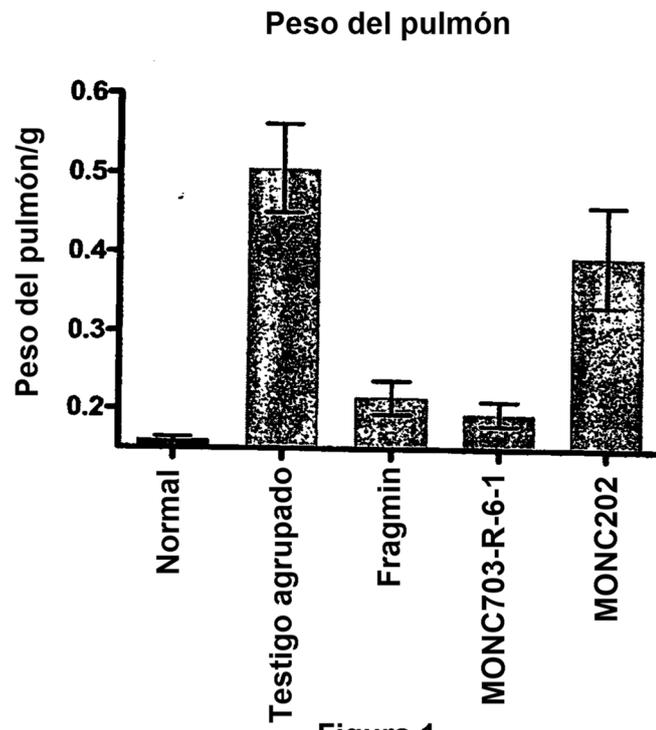


Figura 1