

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 975**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/25 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2001** **E 08172045 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017** **EP 2085780**

54 Título: **Métodos y productos relacionados con heparina de peso molecular bajo**

30 Prioridad:

12.09.2000 US 231994 P

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

07.11.2017

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(100.0%)
77 MASSACHUSETTS AVENUE
CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**SUNDARAM, MALLIKARJUN;
VENKATARAMAN, GANESH;
SHRIVER, ZACHARY;
LIU, DONGFANG;
QI, YI MEI y
SASISEKHARAN, RAM**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 640 975 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).

DESCRIPCION

Métodos y productos relacionados con heparina de peso molecular bajo

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La coagulación es una ruta fisiológica implicada en el mantenimiento de la hemostasis normal de la sangre en los mamíferos. En condiciones en las que se produce una lesión vascular, la ruta de la coagulación se estimula para formar un coágulo de sangre a fin de prevenir la pérdida de sangre. Inmediatamente después de que ocurre la lesión vascular, las plaquetas de la sangre comienzan a agregarse en el sitio de la lesión formando un tapón físico para detener la pérdida. Adicionalmente, el vaso lesionado sufre una vasoconstricción para reducir el flujo de sangre al área y comienza a agregarse la fibrina formando una red insoluble o coágulo, que cubre el área lesionada. Cuando un desequilibrio en la ruta de la coagulación se desplaza hacia una coagulación excesiva, el resultado es el desarrollo de tendencias trombóticas, que se manifiestan a menudo como ataques cardíacos, derrames cerebrales, trombosis venosa profunda, e infartos de miocardio. Las terapias actuales para tratamiento de los trastornos asociados con los desequilibrios en la ruta de la coagulación implican muchos riesgos y deben ser controladas cuidadosamente.

La heparina, un glucosaminoglucano fuertemente sulfatado similar a la heparina (HLGAG) producido por los mastocitos, es un anticoagulante clínico ampliamente utilizado, y es uno de los primeros fármacos biopolímeros y uno de los pocos fármacos constituidos por hidratos de carbono. La heparina provoca fundamentalmente su efecto por dos mecanismos, los cuales implican la unión de la antitrombina III (AT-III) a una secuencia específica de pentasacárido, $H_{NAc/S,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ contenida en el polímero. En primer lugar, la unión a AT-III al pentasacárido induce un cambio de conformación en la proteína que media su inhibición del factor Xa. En segundo lugar, la trombina (factor IIa) se une también a la heparina en un sitio próximo al sitio de unión a AT-III al pentasacárido. La formación de un complejo ternario entre AT-III, trombina y heparina da como resultado la desactivación de la trombina. Al contrario de su actividad anti-Xa, que requiere solamente el sitio de unión al pentasacárido de AT-III, la actividad anti-IIa de la heparina es dependiente del tamaño, requiriendo al menos 18 unidades de sacárido para la formación eficiente de un complejo ternario de AT-III, trombina, y heparina.

Además de las propiedades anticoagulantes de la heparina, su complejidad y amplia distribución en los mamíferos han conducido a la sugerencia de que la misma puede estar implicada también en un amplio intervalo de actividades biológicas adicionales. Los glucosaminoglucanos semejantes a la heparina (HLGAGs), presentes tanto en la superficie de la célula como en la matriz extracelular, son un grupo de polisacáridos complejos que tienen una longitud variable, que consisten en una unidad repetida de disacárido compuesta de glucosamina y un ácido urónico (ácido idurónico o ácido glucurónico). El alto grado de complejidad para los HLGAGs proviene no sólo de su polidispersidad y de la posibilidad de dos componentes de ácido urónico diferentes, sino también de la modificación diferencial en cuatro posiciones de la unidad de disacárido. Tres posiciones, a saber, C2 del ácido urónico, y las posiciones C3, C6 de la glucosamina, pueden estar O-sulfatadas. Adicionalmente, C2 de la glucosamina puede estar N-acetilado o N-sulfatado. En conjunto, estas modificaciones podrían conducir teóricamente a 32 unidades de disacárido posibles, haciendo los HLGAGs potencialmente más densos en información que el ADN (4 bases) o las proteínas (20 aminoácidos). Esta enormidad de posibles variantes estructurales hace posible que los HLGAGs estén involucrados en un gran número de procesos biológicos diversos, que incluyen la angiogénesis (Sasisekharan, R., Moses, M. A., Nugent, M. A., Cooney, C. L. y Langer, R. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1524-8.), embriogénesis (Binari, R. C., Staveley, B. E., Johnson, W. A., Godavarti, R., Sasisekharan, R. y Manoukian, A. S. (1997) *Development* 124, 2623-32; Tsuda, M., Kamimura, K., Nakato, H., Archer, M., Staatz, W., Fox, B., Humphrey, M., Olson, S., Futch, T., Kaluza, V., Siegfried, E., Stam, L. y Selleck, S. B. (1999) *Nature* 400, 276-80.; y Lin, X., Buff, E. M., Perrimon, N. y Michelson, A. M. (1999) *Development* 126, 3715-23.), y la formación de fibrillas β en la enfermedad de Alzheimer (McLaurin, J., Franklin, T., Zhang, X., Deng, J. & Fraser, P. E. (1999) *Eur J Biochem* 266, 1101-10. And Lindahl, B., Westling, C., Gimenez-Gallego, G., Lindahl, U. y Salmivirta, M. (1999) *J Biol Chem* 274, 30631-5).

Aunque la heparina es muy eficaz en una diversidad de situaciones clínicas y tiene el potencial de ser utilizada en muchas otras, los efectos secundarios asociados con la terapia de heparina son muchos y variados. Efectos secundarios tales como la trombocitopenia inducida por heparina (HIT) están asociados fundamentalmente con la cadena larga de la heparina no fraccionada (UFH), que proporciona dominios de unión para diversas proteínas. Esto ha conducido a la explosión en la generación y utilización de heparina de peso molecular bajo (LMWH) como una alternativa eficaz a UFH. Aunque la atención se ha enfocado en LMWH como sustitutos de heparina debido a su acción farmacológica más predecible, efectos secundarios reducidos, actividad antitrombótica prolongada, y mejor biodisponibilidad, existe actualmente una capacidad limitada de normalizar el proceso de fabricación de LMWH. Dado que las LMWH se derivan de heparinas y por tanto son polidispersas y microheterogéneas, con estructura indefinida, poseen variabilidad inherente, lo que impide actualmente un procedimiento eficiente para su fabricación. Sería valioso tanto médica como científicamente disponer de un método coherente, de calidad controlada, eficiente en tiempo, independiente de la concentración, y altamente reproducible para producir heparina y otros glucosaminoglucanos.

En un intento de caracterizar las variaciones moleculares, estructurales y de actividad de la heparina, se han investigado varias técnicas para el análisis de las preparaciones de heparina. La electroforesis en gradiente de gel de poliácridamida (PAGE) y la HPLC de intercambio de iones fuertes (SAX) han sido utilizadas para el análisis cualitativo y cuantitativo de las preparaciones de heparina. Aunque el método PAGE en gradiente puede ser útil en la determinación del peso molecular, adolece de falta de resolución, particularmente falta de resolución de diferentes oligosacáridos que tengan el mismo tamaño. La SAX-HPLC, que está basada en la detección por absorbancia ultravioleta, es a menudo insuficientemente sensible para la detección de pequeñas cantidades de oligosacáridos estructuralmente importantes derivados de heparina. Las tecnologías actuales para purificar y analizar heparinas y otros glucosaminoglucanos son insuficientes. Existe una gran necesidad clínica y científica de métodos mejorados de aislamiento y análisis.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se refiere en algunos aspectos a métodos para caracterizar preparaciones de polisacáridos. Como resultado de las estructuras complejas de los sacáridos, ha sido difícil, si no imposible, caracterizar la pureza y/o actividad de las preparaciones de polisacáridos. Al contrario que las muestras de ácido nucleico y proteínas, las preparaciones de polisacáridos se caracterizan generalmente basándose en su capacidad para producir un cierto nivel de actividad en una muestra biológica. Estos ensayos no alcanzan el nivel de exactitud que puede alcanzarse por caracterización estructural directa. De acuerdo con algunos aspectos de la invención, se proporciona un método de análisis y caracterización de una muestra de polisacárido. El método implica aplicar una restricción experimental a un polisacárido en una muestra a fin de producir un polisacárido modificado que tiene un componente de firma, detectar la presencia del componente de firma en la muestra como indicación de que el polisacárido está presente en la muestra, y determinar la presencia o ausencia del componente de firma para analizar la muestra. En algunas realizaciones, el componente de firma tiene una actividad biológica conocida, y en otras realizaciones el componente de firma es biológicamente inactivo.

La restricción experimental aplicada a la muestra es cualquier tipo de manipulación que dé como resultado la identificación de la presencia o ausencia del componente de firma. La restricción experimental puede, por ejemplo, ser una cualquiera sola o una combinación de los tipos siguientes de restricciones experimentales: electroforesis capilar, cromatografía de líquidos de alta presión, cromatografía de permeación en gel, resonancia magnética nuclear, modificación con una enzima tal como digestión con una exoenzima o una endoenzima, digestión química, o modificación química.

El componente de firma puede utilizarse para proporcionar información acerca de la muestra. Algunos de los usos dependen de si el componente de firma es un componente biológico activo o inactivo. Por ejemplo, en algunos casos en los que el componente de firma es un componente biológico activo y la muestra es un lote de polisacárido, el componente de firma puede utilizarse para monitorizar la pureza del lote determinando la cantidad del componente de firma en el lote. En otras realizaciones, el método de análisis es un método para monitorizar la presencia de componentes activos en la muestra, en el que la presencia del componente de firma en la muestra es indicativa de un componente activo en la muestra. En otras realizaciones, el método de análisis es un método para determinar la cantidad de componentes activos en la muestra determinando la cantidad del componente de firma de la muestra. El método puede realizarse también en al menos dos muestras de tal modo que se determinan las cantidades relativas del componente de firma en cada una de las al menos dos muestras, siendo el nivel relativo más alto del componente de firma indicativo de la muestra más activa.

En algunos casos en los que el componente de firma es un componente biológico inactivo, el método de análisis puede ser un método para monitorizar la presencia de componentes activos en la muestra, siendo la presencia del componente de firma en la muestra indicativa de una muestra que carece de un componente activo.

Los métodos son útiles también en algunas realizaciones para identificar moléculas biológicamente activas. Por ejemplo, el componente de firma puede utilizarse para cribar una genoteca.

Así, en algunas realizaciones, el componente de firma es una porción biológicamente activa de un polisacárido. Porciones biológicamente activas de polisacáridos incluyen, pero sin carácter limitante, un tetrasacárido del dominio de unión a AT-III de la heparina, un tetrasacárido del dominio de unión a FGF de heparina, $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; y $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$.

En algunas realizaciones, el polisacárido es un glucosaminoglucano, tal como una heparina de peso molecular bajo (LMWH), heparina, una heparina preparada por medios biotecnológicos, una heparina modificada químicamente, una heparina sintética, y un sulfato de heparano.

En otra realización, el polisacárido contenido en la muestra se compara con una base de datos de referencia de polisacáridos de tamaño idéntico al del polisacárido, en el que los polisacáridos de la base de datos de referencia se han sometido también a las mismas restricciones experimentales que el polisacárido en la muestra, proporcionando la comparación un análisis de la composición del polisacárido de muestra.

En algunas realizaciones preferidas, la muestra es un producto farmacéutico. En otras realizaciones, la muestra es una muestra biológica, tal como una muestra de sangre.

También se proporciona un método para evaluar la calidad de una muestra de polisacáridos. El método implica identificar un componente contenido en la muestra de polisacárido, determinar un valor cuantitativo de la cantidad de componente, en el que el valor cuantitativo del componente es indicativo de la calidad de la muestra de polisacárido. En una realización, el método implica identificar al menos dos componentes en la muestra de polisacárido y determinar un valor cuantitativo de la cantidad de cada uno de los al menos dos componentes para evaluar la calidad de la muestra de polisacárido.

El valor cuantitativo puede calcularse por una diversidad de métodos diferentes, que dependen del modo en que se procesa la muestra para identificar el componente. Por ejemplo, el valor cuantitativo puede calcularse como el área bajo la curva cuando la muestra se procesa por electroforesis capilar, como el factor de respuesta, o como la cantidad relativa en porcentaje de cada fracción presente en la muestra.

En una realización, la etapa de calcular la cantidad relativa en porcentaje de cada fracción presente en la muestra se determina de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$PRA = RF \times AUC_{\%R}$$

en la que

PRA = cantidad relativa en porcentaje de cada fracción

RF = factor de respuesta

$AUC_{\%R}$ = AUC relativa en porcentaje $[(100 \times AUC_C)/AUC_T]$

AUC_C = área bajo la curva para un componente

AUC_T = la suma del área bajo la curva para todos los componentes.

En otra realización, el método implementado por ordenador para generar una estructura de datos, materializado tangiblemente en un medio legible por ordenador, que representa un valor cuantitativo de un componente de un polisacárido, comprendiendo el método un acto de realización del cálculo anterior.

En una realización, el componente es el componente de firma $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; o $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$. También se describe un método para producir una composición de glucosaminoglucanos. El método implica llevar a cabo una precipitación salina de una muestra que contiene glucosaminoglucanos, en un disolvente para producir una primera fracción de mayor peso molecular, y una segunda fracción de LMWH aislada, y procesar la segunda fracción de LMWH aislada para producir una preparación de LMWH concentrada. En una realización preferida, la sal usada en la etapa de precipitación es una sal de cationes divalentes y aniones débiles. La técnica anterior generalmente mostró que cuando se usa un método para aislar heparina usando una precipitación salina, la primera fracción se debería procesar para generar LMWH, y la segunda fracción se debería desechar. Se ha descubierto que la segunda fracción contiene realmente una fuente preferida de LMWH biológicamente activa.

En algunas realizaciones, la sal de los cationes divalentes y aniones débiles se selecciona de entre el grupo que comprende: bario, calcio, magnesio, estroncio, cobre, níquel, cadmio, cinc, mercurio, berilio, níquel, paladio, platino, hierro, y estaño. En otras realizaciones, la sal de cationes divalentes y aniones débiles son acetatos de cationes de elementos de la tabla periódica que tienen valencia divalente.

Los componentes de la fracción de LMWH se pueden alterar adicionalmente manipulando la temperatura y tipo de disolvente usado en la precipitación. Por ejemplo, en una realización, la precipitación se puede llevar a cabo a una temperatura en el intervalo de 0°C a 70°C. En otras realizaciones, la temperatura de la mezcla es 70°C, 60°C, 50°C, 40°C, 30°C, 25°C, 20°C, 15°C, 10°C, 5°C, 3°C, 2°C, 1°C, o 0°C. En aún otras realizaciones, la precipitación se lleva a cabo a una temperatura de 4°C. Preferiblemente, el disolvente es un disolvente polar. Los disolventes polares incluyen, pero sin limitarse a, H₂O, H₂O mezclado con etanol, H₂O mezclado con acetona, o una combinación de H₂O, etanol, y acetona. En algunas realizaciones, el disolvente polar usado en la precipitación tiene una relación volumen a volumen de H₂O:etanol en el intervalo de 99:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 65:35, 55:45, 50:50, 45:55, 35:65, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, o 1:99. En otras realizaciones, el disolvente polar usado en la precipitación tiene una relación volumen a volumen de H₂O:acetona en el intervalo de 99:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 65:35, 55:45, 50:50, 45:55, 35:65, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, o 1:99. En una realización, el disolvente polar es una mezcla de H₂O, etanol, y acetona.

La etapa de procesar la segunda fracción para producir la preparación de LMWH concentrada, en una realización, es una digestión enzimática, tal como digestión con Heparinasa III. En otras realizaciones, el procesamiento de la segunda fracción para producir la preparación de LMWH concentrada es degradación química. En algunas realizaciones, el método de degradación química se selecciona del grupo que incluye despolimerización oxidativa con H₂O₂ o CU⁺ y H₂O₂, escisión desaminante con nitrito de isoamilo, o ácido nitroso, escisión β-eliminadora con éster bencílico de heparina por tratamiento alcalino o por heparinasa. El procesamiento de la segunda fracción para

producir la preparación de LMWH concentrada, en otras realizaciones, es una etapa de purificación para producir una preparación de LMWH purificada. El método puede implicar la etapa adicional de formular la preparación de LMWH purificada en un vehículo farmacéutico.

5 En otras realizaciones, el glucosaminoglucano se selecciona del grupo que consiste en heparina, análogos de heparina, LMWH, heparina biotecnológica, heparina modificada químicamente, o heparina sintética.

Se proporcionan composiciones que comprenden una preparación de LMWH que tiene una actividad anti-Xa de al menos 150 UI/mg, y/o una preparación de LMWH que tiene una relación de actividad anti-factor Xa:anti-factor IIa de más de 5. En algunas realizaciones, la preparación de LMWH se aísla, y en otras realizaciones es sintética. En algunas realizaciones, la preparación de LMWH que tiene una actividad anti-Xa de al menos 150 UI/mg tiene una
10 relación de actividad anti-factor Xa:anti-factor IIa de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9, o 10.

En otros aspectos, la composición es una preparación de LMWH que tiene al menos 15% de disacáridos disulfatados, menos de 75% de disacáridos trisulfatados, 3-5% de disacáridos monosulfatados, y al menos 2% de tetrasacárido 4-7.

15 La composición se puede formular para suministro terapéutico a un sujeto mediante métodos tales como suministro subcutáneo, suministro intravenoso, suministro por aerosol, o suministro oral.

En algunas realizaciones, la preparación de LMWH incluye al menos 3,5%, 4,0%, o 5,0% de $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; o $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$.

Un método para tratar un sujeto que tiene una afección. El método implica seleccionar una composición de LMWH que tiene un nivel identificado de secuencia de unión a AT, dependiendo el nivel de secuencia de unión a AT
20 seleccionado de la afección a tratar en el sujeto, y administrar a un sujeto una cantidad eficaz de la composición de LMWH que tiene un nivel identificado de secuencia de unión a AT.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar enfermedad tromboembólica venosa o arterial. La preparación de LMWH administrada a estos sujetos puede incluir al menos 3,5%, 4,0%, o 5,0% de $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; o $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$. En otras realizaciones, la
25 composición de LMWH es una preparación de LMWH que tiene una actividad anti-Xa de al menos 150 UI/mg. En todavía otras realizaciones, la composición de LMWH es una preparación de LMWH que tiene una relación de actividad anti-factor Xa:anti-factor IIa de más de 5. También se describe una composición que comprende una preparación de LMWH preparada mediante un procedimiento que comprende: obtener una preparación de heparina, y llevar a cabo una realización exhaustiva de la preparación de heparina usando heparinasa I, heparinasa II, y
30 heparinasa III. También se describe un kit para analizar una muestra de polisacárido que incluye una composición de control para identificar un componente de firma de un polisacárido, e instrucciones para aplicar una restricción experimental a una muestra de polisacárido para producir un polisacárido modificado que tiene un componente de firma característico del polisacárido, y para comparar el polisacárido modificado con la composición de control para identificar la presencia o ausencia del componente de firma. En algunas realizaciones, el kit también incluye una
35 composición para aplicar una restricción experimental a la muestra de polisacárido, tal como, por ejemplo, una exoenzima o una endoenzima. En aún otras realizaciones, las instrucciones incluyen las etapas para cuantificar el componente de firma del polisacárido en la muestra.

Cada una de las limitaciones de la invención puede abarcar diversas realizaciones de la invención. Por esta razón, se prevé que todas las limitaciones de la invención que implica un elemento cualquiera o combinaciones de
40 elementos pueden incluirse en cada uno de los aspectos de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un espectro de masas MALDI del complejo protonado de AT-10 con $(\text{RG})_{19}\text{R}$.

La Figura 2 muestra el tratamiento de AT-10 con heparinasa. (A) Tratamiento incompleto de AT-10 con heparinasa I. En las condiciones utilizadas en este estudio, la heparinasa I escinde un enlace glicosídico que
45 contiene un $\text{I}_{2\text{S}}$. (B) Espectro de masas MALDI de fragmentos de AT-10 procedentes de la digestión exhaustiva con heparinasa I. (C) El espectro de masas MALDI de AT-10 etiquetado tratado con heparinasa I exhibe cinco fragmentos: uno con masa molecular de 576,7 Da (atribuible a $\pm \text{D}$), dos tetrasacáridos con masa molecular de 1037,9 (*) y 1154,0 Da, y un hexasacárido etiquetado másicamente con una masa molecular de 1671,4 (masa de 1615,3 más la etiqueta másica de 56,1). Dado que la eficiencia de
50 acoplamiento fue $\sim 90\%$, también se observa un hexasacárido sin marcar (masa de 1615,1).

La Figura 3 representa la degradación exhaustiva de AT-10 con ácido nitroso. El ácido nitroso escinde en los restos H_{NS} , dejando como resto una anhidromanosa ($\Delta = 97,1$ Da). En el recuadro se muestra el espectro de masas del perfil de degradación cuando la muestra se trató con iduronidasa (arriba), glucosamina-6-O-sulfatasa (centro) y glucuronidasa (abajo) en dicho orden.

55 La Figura 4 es un espectro de masas MALDI que muestra la degradación parcial de AT-10 con ácido nitroso.

La Figura 5 muestra las estructuras de los tres compuestos modelo de oligosacáridos utilizados en este estudio. (A) El pentasacárido 1 (Penta 1) tiene la secuencia $H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$, contiene un sitio de unión a AT-III completamente intacto, y tiene una masa molecular calculada de 1508,2. Los dos enlaces glicosídicos potencialmente sensibles a la escisión por heparinasa I, II o III están marcados como A.1 y A.2. (B) El pentasacárido 2 (Penta 2), con la secuencia $H_{NS,6S}GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$ y una masa molecular calculado de 1428,1, es estructuralmente idéntico a Penta 1, menos un 3-O-sulfato en la glucosamina interna, por lo que no contiene un sitio AT-III completo. Como en el caso de Penta 1, los enlaces potencialmente sensibles a la escisión por heparinasa están marcados B.1 y B.2. (C) Se utilizó también en este estudio un hexasacárido derivado de heparinasa (Hexa 1), con la secuencia $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Hexa 1 (masa molecular calculada 1614,3) contiene sólo un sitio de unión a AT-III parcialmente intacto; análogamente a AT-10, falta la unidad de disacárido del extremo reductor $I_{2S}H_{NS,6S}$. Como en el caso de Penta 1 y Penta 2, los sitios de escisión potencial están marcados como C.1, C.2.

La Figura 6 es un espectro de masas MALDI de los productos de digestión con (A) heparinasa I, (B) heparinasa II, y (C) heparinasa III de Penta 1. Heparinasa I y II cortan Penta 1 en el enlace $G_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ (sitio A.2) para dar un disacárido pentasulfatado y un producto disacárido trisulfatado. Penta 1 no es escindible por heparinasa III.

La figura 7 es un espectro de masas MALDI de los productos de digestión con (A) heparinasa I, (B) heparinasa II, y (C) heparinasa III de Penta 2 complejo con $(RG)_{19}R$.

La Figura 8 es un espectro de masas MALDI de los productos de digestión con (A) heparinasa I, (B) heparinasa II, y (C) heparinasa III de Hexa 1 complejo con $(RG)_{19}R$.

La Figura 9 muestra la titulación por fluorescencia de AT-III con heparina de longitud completa ($\bullet$) AT-10 ($\blacklozenge$) a pH 6,0 $I = 0,025$. Los datos se representan gráficamente como la relación de fluorescencia de AT-III después de la introducción de sacárido a la fluorescencia inicial de AT-III (I/I_0) frente a la concentración de sacárido añadido. Los datos se ajustaron por regresión no lineal, y se determinó la K_D . Para la heparina, el valor de K_D medido fue 10 nM, mientras que para AT-10 este valor fue 800 nM. El recuadro muestra la unión de heparina a AT-III a pH 7,4 $I = 0,15$. El valor K_D medido de 36 nM concuerda favorablemente con otras determinaciones de la afinidad de heparina por AT-III.

La Figura 10 muestra el análisis funcional del decaesacárido AT-10 y su comparación con el pentasacárido de unión a AT-III. La actividad anticoagulante *in vitro* del decaesacárido AT-10 ($\blacktriangle$) se comparó con el pentasacárido sintético ($\blacksquare$) o enoxaparina ($\blacklozenge$) una heparina de peso molecular bajo generada por escisión química de la heparina. Las actividades de los tres compuestos se evaluaron midiendo (A) actividad anti-IIa, (B) la actividad anti-Xa, (C) la actividad anti-Xa utilizando el factor Xa purificado, o (D) vía HepTest. Asimismo, se midieron el tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT) y el tiempo de protrombina (PT), en los que ninguno de los compuestos exhibía actividad significativa, coherente con su alta relación de actividad anti-Xa:anti-IIa.

Las Figuras 11A y 11B muestran gráficas del análisis de composición de UFH derivada de mucosa intestinal porcina. Se digirió UFH con Heparinasa I, II, y III, y se sometió a Electroforesis Capilar (CE). El pico 1 (Figura 9A) se confirmó así como el disacárido trisulfatado $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$. Los picos 2, 3, y 4 son disacáridos disulfatados, y 5, 6, y 7 son disacáridos monosulfatados. El pico 8 es el tetrasacárido $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Además de éstos, existe una pequeña cantidad de disacáridos no sulfatados que migran de modo mucho más lento que los sacáridos sulfatados, como se muestra en la Figura 9B.

La Figura 12 muestra la traza de CE de la digestión exhaustiva del pentasacárido AT-10 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ $IH_{NAC,6S}$ $GH_{NS,3S,6S}$. El tetrasacárido del pico 8 en la digestión exhaustiva de heparina tiene la misma masa y tiempo de migración como $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$.

La Figura 13 es una gráfica de actividad anti-factor Xa para fracciones diferentes de UFH como una función de su contenido de $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Una gráfica de actividad anti-factor Xa como función de % de $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ da una recta con $r = 0,91$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención implica varios descubrimientos que han conducido a nuevos avances en el campo de la biología de los polisacáridos. Uno de los problemas principales en la caracterización de los polisacáridos es consecuencia de su diversidad estructural. Esta diversidad estructural es uno de los factores que han hecho difícil estudiar las relaciones secuencia-función para los polisacáridos. La síntesis química de oligosacáridos definidos se ha utilizado en el estudio de la contribución relativa a las actividades biológicas, tales como la unión con afinidad alta a AT-III de modificaciones específicas en la secuencia de pentasacáridos de heparina (Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. y Olson, S. T. (1998) J Biol Chem 273, 7478-87.). Sin embargo, tales métodos de síntesis son complejos y no han sido aplicados extensamente al estudio de otras secuencias biológicas. Un enfoque alternativo que implica fraccionamiento por afinidad de polisacáridos con proteínas de interés y caracterización subsiguiente ha

proporcionado alguna información global en relación con los patrones de sulfatación de los polisacáridos que determinan afinidad (Parthasarathy, N., Gotow, L. F., Bottoms, J. D., Kute, T. E., Wagner, W. D. y Mulloy, B. (1998) J Biol Chem 273, 21111-4.; Sasaki, T., Larsson, H., Kreuger, J., Salmivirta, M., Claesson-Welsh, L., Lindahl, U., Hohenester, E. y Timpl, R. (1999) Embo J 18, 6240-8.; y Kreuger, J., Prydz, K., Pettersson, R. F., Lindahl, U. y Salmivirta, M. (1999) Glycobiology 9, 723-9.).

La invención está basada, en un aspecto, en un nuevo método para caracterizar muestras de polisacáridos. Se ha descubierto que las secuencias de polisacáridos pueden secuenciarse rápida y exactamente a fin de identificar un componente de firma del polisacárido. El componente de firma puede utilizarse para caracterizar la muestra de polisacárido de maneras que no eran posibles anteriormente. El análisis de polisacáridos de grado farmacéutico está regido por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y otras farmacopeas nacionales. Por regla general, los tipos de análisis requeridos para los polisacáridos son ensayos funcionales y en algunos casos ensayos estructurales muy generales. Los ensayos que están siendo utilizados actualmente para determinar la actividad/pureza de una preparación de heparina disponible comercialmente son un ensayo de coagulación *in vitro* y un ensayo para endotoxinas bacterianas. Se ha determinado que la cantidad de heparina es aquella cantidad que hará que 1 ml de plasma de oveja experimente semicoagulación cuando se mantiene durante 1 hora a 20°C en comparación con un estándar USP de referencia (definido como unidades/ml) o el estándar Quinto Internacional para Heparina no Fraccionada (WHO-5) (definido como Unidades Internacionales/ml). (Linhardt, R. J. y Gunay, N. S. (1999) Semin Thromb Hemost 25, 5-16.). Comparados con los requisitos reguladores estrictos para otros fármacos (no polisacáridos), estos estándares de caracterización están anticuados.

Los métodos de la invención proporcionan una vía mucho más exacta para caracterizar estas muestras. Los métodos implican manipular una muestra que contiene polisacárido a fin de identificar la presencia o ausencia de un componente de firma. Puede determinarse la cantidad del componente de firma presente en la muestra. La cantidad de componente de firma proporciona una caracterización exacta de la muestra.

Así, en algunos aspectos, la invención es un método para analizar una muestra aplicando una restricción experimental a un polisacárido en una muestra, para producir un polisacárido modificado, que tiene un componente de firma, detectar la presencia del componente de firma en la muestra como indicación de que el polisacárido está presente en la muestra, y determinar la presencia o ausencia del componente de firma para analizar la muestra.

Un "polisacárido" es un polímero compuesto de monosacáridos enlazados unos a otros. En muchos polisacáridos, el bloque de construcción básico del polisacárido es realmente una unidad de disacárido, que puede ser repetitiva o no repetitiva. Así, una unidad, cuando se utiliza con respecto a un polisacárido, hace referencia a un bloque de construcción básico de un polisacárido, y puede incluir un bloque de construcción monomérico (monosacárido) o un bloque de construcción dimérico (disacárido).

Los métodos para caracterizar muestras de polisacáridos se desarrollaron basándose en el análisis experimental de glucosaminoglucanos similares a heparina (HLGAGs), pero las propiedades expuestas en esta memoria pueden extenderse a otros polisacáridos. Los métodos de la invención se expondrán con respecto a HLGAGs como ejemplo, pero los métodos no se limitan a HLGAGs. Así, en una realización, la muestra de polisacárido a analizar incluye HLGAGs o glucosaminoglucanos. Como se utilizan en esta memoria, los términos "HLGAG" y "glucosaminoglucanos" se utilizan intercambiamente para hacer referencia a una familia de moléculas que tienen estructuras y propiedades similares a la heparina. Estas moléculas incluyen, pero sin carácter limitante, heparina de peso molecular bajo (LMWH), heparina, heparina preparada biotecnológicamente, heparina modificada químicamente, heparina sintética, y sulfato de heparano. La expresión "heparina biotecnológica" abarca heparina que se prepara a partir de fuentes naturales de polisacáridos que han sido modificados químicamente, y se describe en Razi et al., Bioche. J. 1995 Jul 15; 309 (Pt 2): 465-72. La heparina modificada químicamente se describe en Yates et al., Carbohydrate Res (1996) Nov 20; 294:15-27, y es conocida por los expertos en la técnica. La heparina sintética es bien conocida por los expertos en la técnica, y se describe en Petitou, M. et al., Bioorg Med Chem Lett. (1999) Abr 19; 9(8):1161-6.

Como se muestra en los ejemplos siguientes, la secuencia de un decaacárido fraccionado con AT-III (AT-10), que puede utilizarse como componente de firma de HLGAGs, ha sido identificada utilizando un esquema de nomenclatura codificada en propiedades/espectrometría de masas (PEN-MALDI), una metodología de secuenciación descrita en las Solicitudes de Patente U.S. n^{os} de Serie 09/557.997 y 09/558.137 presentadas el 24 de abril de 2000, que tienen inventores comunes, y en Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) Science 286, 537-42. La Secuenciación Integral de Glucanos (IGS) (Turnbull, J. E., Hopwood, J. J. y Gallagher, J. T. (1999) Proc Natl Acad Sci U S A 96, 2698-703.) y el análisis de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) del decaacárido son coherentes con los resultados de PEN-MALDI. La flexibilidad de esta estrategia de secuenciación se demuestra también por el hecho de que es posible deducir información de secuencia para oligosacáridos contaminantes, si están presentes. La secuenciación de un sacárido químicamente complejo fraccionado con AT-III (incluyendo la rara 3-O-sulfatación de la glucosamina) estableció una metodología que puede extenderse al análisis de otros oligosacáridos HLGAG de interés, por ejemplo aquellos HLGAGs con propiedades de unión a factores de crecimiento. Una metodología de secuenciación directa para estos tipos de secuencias ha hecho posible los estudios de estructura-función de esta clase importante de moléculas.

Los HLGAGs y otros polisacáridos tienen todos ellos componentes de firma. Un “componente de firma” es un oligosacárido que está presente en y es característico de un polisacárido particular. Las propiedades de la firma seleccionada pueden depender del tipo de polisacárido que se estudia y del tipo de restricción experimental aplicada al polisacárido. La firma es un elemento reproducible de un polisacárido particular que se manipula con una restricción experimental particular. Por ejemplo, algunas firmas de los HLGAGs que han sido identificadas y cuya utilidad se ha demostrado son $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; o $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$. Cuando una muestra que contiene HLGAG se somete a electroforesis capilar después de tratamiento con heparinasa, esta firma será identificada y es susceptible de ser cuantificada.

El componente de firma puede ser biológicamente activo o inactivo. Puede derivarse una información importante del componente de firma tanto si el mismo es un componente activo como si se trata de un componente inactivo. Una firma que tiene actividad biológica es un oligosacárido que se sabe que produce una función biológica específica. Por ejemplo, se sabe que los tetrasacáridos $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; o $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$ de HLGAGs forman parte de las secuencias que poseen actividad anticoagulante, dando como resultado la inhibición del factor Xa. Por tanto, la presencia de este componente en una muestra es directamente indicativa de la actividad anti-coagulante del HLGAG.

Las firmas que tienen actividad biológica pueden utilizarse para una diversidad de propósitos. Por ejemplo, estos tipos de firmas son útiles para monitorizar la variabilidad lote-a-lote de una preparación de polisacárido. La pureza de cada lote puede determinarse determinando la cantidad de componente activo de firma en el lote. Estas firmas son útiles también para monitorizar la presencia de componentes activos en la muestra, cuando la presencia del componente de firma en la muestra es indicativa de un componente activo en la muestra. Por ejemplo, el componente de firma puede utilizarse para seguir el componente activo a lo largo de un procedimiento de procesamiento. Utilizando este método, es posible evaluar los productos después de cada etapa de separación para determinar qué fracción contiene el componente biológicamente activo. La cantidad de componentes activos en la muestra puede cuantificarse también determinando la cantidad de componente de firma en la muestra.

Los métodos pueden realizarse también sobre al menos dos muestras a fin de determinar qué muestra tiene la actividad máxima o comparar de algún otro modo la pureza de las muestras. En este caso, se determinan las cantidades relativas de componente de firma en cada una de las al menos dos muestras. El nivel máximo relativo de componente de firma es indicativo de la muestra más activa.

Adicionalmente, la firma activa puede utilizarse para identificar moléculas biológicamente activas cribando compuestos o genotecas de compuestos. Las genotecas incluyen, por ejemplo, genotecas de presentación de fago, genotecas combinatorias, genotecas de peptoides y restos de síntesis no peptídicos. La presentación de fago puede ser particularmente eficaz en la identificación de péptidos que interaccionan con los componentes de firma, incluyendo anticuerpos humanos. Resumidamente, se prepara una genoteca de fagos (utilizando por ejemplo los fagos m13, fd, o lambda), presentando inserciones de 4 a aproximadamente 80 restos de aminoácidos utilizando procedimientos convencionales. Las inserciones pueden representar, por ejemplo, una matriz totalmente degenerada o sesgada. Es posible seleccionar luego inserciones portadoras de fago que se unen al componente de firma. Este proceso puede repetirse a lo largo de varios ciclos de reelección de fago que se une al componente de firma. Las tandas repetidas conducen al enriquecimiento de secuencias particulares portadoras del fago. El análisis de secuencias de ADN puede llevarse a cabo para identificar las secuencias de los polipéptidos expresados. Puede determinarse la porción lineal mínima de la secuencia que se une al componente de firma. Es posible repetir el procedimiento utilizando una genoteca sesgada que contiene inserciones que contienen parte o la totalidad de la porción lineal mínima más uno o más restos degenerados adicionales aguas arriba o aguas abajo de la misma. Pueden utilizarse también métodos de cribado de levadura de dos híbridos para identificar polipéptidos que se unen al componente de firma. Genotecas peptídicas y no peptídicas que están basadas en un componente de firma conocido pueden ser generadas fácilmente por los expertos en la técnica. Entidades comerciales tales como ArQule (Woburn, MA) preparan genotecas preparadas por encargo para la generación de compuestos miméticos.

Ejemplos de porciones biológicamente activas de un polisacárido incluyen, pero sin carácter limitante, un tetrasacárido del dominio de unión a AT-III de heparina, un tetrasacárido del dominio de unión a FGF de heparina, $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$, o $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$.

Las firmas que son biológicamente inactivas son oligosacáridos que no están asociados con una función biológica específica conocida. Estos oligosacáridos pueden tener alguna función biológica, pero no la función específica que se analiza. Por ejemplo, el oligosacárido puede causar realmente una inhibición del crecimiento de las células tumorales, pero no tener efecto alguno sobre la cascada de la coagulación. Si la muestra de polisacárido está siendo evaluada con el propósito de identificar la presencia o la cantidad de polisacáridos que son útiles para fines de anti-coagulación, se considera que el oligosacárido que se detecta es una firma biológicamente inactiva. Por el contrario, si la muestra de polisacárido está siendo evaluada con el fin de identificar la presencia o cantidad de polisacáridos que son útiles para la prevención de la proliferación de las células tumorales, se considera que el oligosacárido que se detecta es una firma biológicamente activa.

Las firmas que son biológicamente inactivas pueden utilizarse para algunos de los mismos fines que las firmas biológicamente activas, así como para otros fines. Las firmas biológicamente inactivas pueden utilizarse también

para monitorizar la variabilidad lote a lote de una preparación de polisacáridos. Puesto que se están comparando dos lotes entre sí, pueden utilizarse tanto firmas inactivas como firmas activas. Los componentes de firma inactivos pueden utilizarse también para monitorizar la presencia de componentes activos en la muestra cuando la presencia del componente de firma en la muestra es indicativa de una muestra que carece de una actividad específica o que tiene niveles menores de esta actividad. Así, si la presencia de un componente de firma inactivo es inversamente proporcional a la presencia de un componente activo, entonces la presencia del componente inactivo puede proporcionar información importante acerca de la actividad de la muestra. Por ejemplo, si el componente de firma inactivo es un producto de degradación de un componente activo de un polisacárido, entonces la presencia del componente inactivo indica que algo del componente activo se ha descompuesto y por tanto la muestra es menos activa de que lo sería en el caso de que no estuviera presente el componente inactivo.

Una "restricción experimental", como se utiliza en esta memoria, es un proceso bioquímico realizado sobre una muestra de polisacárido que da como resultado una modificación de la muestra que permite que se detecte la firma. Restricciones experimentales incluyen, pero sin carácter limitante, métodos de separación, por ejemplo espectrometría de masas, electroforesis capilar, cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), cromatografía de permeación en gel, resonancia magnética nuclear; digestión enzimática, por ejemplo con una exoenzima, una endoenzima; digestión química; modificación química; desprendimiento químico (es decir, eliminación de una unidad de monosacárido); y modificación enzimática, por ejemplo sulfatación en una posición particular con una sulfotransferasa de sulfato de heparano.

La firma puede identificarse por cualquier medio que sea coherente con la restricción experimental utilizada. El peso molecular de un componente de firma, por ejemplo, puede determinarse por varios métodos que incluyen espectrometría de masas. El uso de espectrometría de masas para determinar el peso molecular de los polisacáridos es bien conocido en la técnica. La espectrometría de masas ha sido utilizada como una herramienta potente para caracterizar polisacáridos debido a su exactitud (± 1 Dalton) a la hora de dar las masas de fragmentos generados (por ejemplo, por escisión enzimática), y también debido a que se requieren únicamente concentraciones de muestra del orden de pM. Por ejemplo, se ha descrito la espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI-MS) para identificar el peso molecular de fragmentos de polisacáridos en publicaciones tales como Rhomberg, A. J. et al, PNAS, USA, v. 95, p. 4176-4181 (1998); Rhomberg, A. J. et al, PNAS, USA, v. 95, p. 12232-12237 (1998); y Ernst, S. et. al., PNAS, USA, v. 95, p. 4182-4187 (1998). Otros tipos de espectrometría de masas conocidos en la técnica, tales como MS con pulverización electrónica, espectrometría de masas con bombardeo de átomos rápidos (FAB-MS) y espectrometría de masas con disociación activada por colisión (CAD) pueden utilizarse también para identificar el peso molecular de los fragmentos de polisacáridos.

Los datos de espectrometría de masas pueden ser un instrumento valioso para averiguar información acerca del componente de firma del polisacárido solo o después de que el polisacárido ha sufrido degradación con enzimas o productos químicos. Después de que se ha identificado el peso molecular de un polisacárido, puede compararse el mismo con pesos moleculares de otros polisacáridos conocidos (por ejemplo utilizando los métodos de las Solicitudes de Patente de U.S. n^{os} de Serie 09/557.997 y 09/558.137 presentadas el 24 de abril de 2000). Como se muestra en estas solicitudes de patente, una técnica para comparar pesos moleculares consiste en generar una línea de masas y comparar el peso molecular del polisacárido desconocido con la línea de masas a fin de determinar una subpoblación de polisacáridos que tienen el mismo peso molecular. Una "línea de masas" es una base de datos de información, preferiblemente en forma de un gráfico o diagrama que almacena información para cada tipo posible de polisacárido que tenga una secuencia única basada en el peso molecular del polisacárido. Dado que los datos de espectrometría de masas indican la masa de un fragmento con exactitud de 1 Da, puede asignarse una longitud únicamente a un fragmento por consulta de una masa en la línea de masas. Adicionalmente, puede determinarse a partir de la línea de masas que, dentro de un fragmento de una longitud particular mayor que un disacárido, existe un mínimo de 4,02 Da diferente en masas que indica que dos grupos acetato (84,08 Da) han reemplazado a un grupo sulfato (80,06 Da). Por tanto, puede determinarse un número de sulfatos y acetatos de un fragmento de polisacárido a partir de la masa proporcionada por los datos de espectrometría de masas, y puede asignarse dicho número al fragmento de polisacárido.

Además del peso molecular, pueden determinarse otras propiedades de un componente de firma. Las relaciones de composición de los sustituyentes o unidades químicas (cantidad y tipo de sustituyentes o unidades químicas totales) pueden determinarse utilizando metodología conocida en la técnica, tal como electroforesis capilar. Un polisacárido puede someterse a una primera restricción experimental tal como degradación enzimática o química para separar el polisacárido en fragmentos más pequeños. Estos fragmentos pueden someterse luego a una segunda restricción experimental, es decir, pueden separarse utilizando electroforesis capilar para determinar la cantidad y tipo de sustituyentes o unidades químicas presentes en el polisacárido. Alternativamente, el polisacárido puede someterse a una sola restricción experimental tal como electroforesis capilar, sin degradación enzimática previa.

En el método de electroforesis capilar en gel, pueden analizarse muestras de reacción por capilares de pequeño diámetro llenos de gel. El pequeño diámetro de los capilares (50 μm) permite la disipación eficiente del calor generado durante la electroforesis. Así, pueden utilizarse altas intensidades de campo sin calentamiento Joule excesivo (400 V/m), reduciendo el tiempo de separación a aproximadamente 20 minutos por experimento de reacción, aumentando con ello la resolución con respecto a la electroforesis en gel convencional. Adicionalmente,

pueden analizarse muchos capilares en paralelo, permitiendo la amplificación de la información de polisacáridos generada.

Pueden utilizarse también otros métodos para evaluar el componente de firma. Por ejemplo, otros métodos incluyen métodos que están basados en parámetros tales como la viscosidad (Jandik, K.A., Gu, K. y Linhardt, R.J., (1994), Glycobiology, 4:284-296) o la absorbancia UV total (Ernst, S. et al., (1996), Biochem. J., 315:589-597).

Los fragmentos de HLGAG pueden degradarse utilizando enzimas tales como enzimas heparina-liaza (heparinasas) o ácido nitroso, y también pueden modificarse utilizando enzimas diferentes que transfieren grupos sulfato a las posiciones mencionadas anteriormente o eliminan los grupos sulfato de dichas posiciones. Las enzimas modificadoras son exolíticas y no progresivas, lo que significa que las mismas actúan una sola vez sobre el extremo no reductor y se soltarán de la cadena de heparina sin modificar secuencialmente el resto de la cadena. Para cada una de las posiciones modificables en la unidad de disacárido existe una enzima modificadora. Una enzima que añade un grupo sulfato se conoce como una sulfotransferasa, y una enzima que elimina grupos sulfato se denomina sulfatasa. Las enzimas modificadoras incluyen 2-O-sulfatasa/sulfotransferasa, 3-O-sulfatasa/sulfotransferasa, 6-O-sulfatasa/sulfotransferasa y N-desacetilasa-N-sulfotransferasa. La función de estas enzimas es evidente por sus nombres, por ejemplo una 2-O-sulfotransferasa transfiere un grupo sulfato a la posición 2-O de un ácido idurónico (el ácido glucurónico 2-O-sulfatado es un suceso raro en las cadenas de HLGAG), y una 2-O-sulfatasa elimina el grupo sulfato de la posición 2-O de un ácido idurónico.

Las enzimas degradantes de HLGAG incluyen, pero sin carácter limitante, heparinasa-I, heparinasa-II, heparinasa-III, D-glucuronidasa y L-iduronidasa, versiones modificadas de heparinasas, variantes y fragmentos funcionalmente activos de las mismas. Las tres heparinasas de *Flavobacterium heparinum* son instrumentos enzimáticos que han sido utilizados para la generación de heparina LMWH (5.000-8.000 Da) y heparina de peso molecular ultra-bajo (~ 3.000 Da). La heparinasa I escinde las regiones altamente sulfatadas de HLGAGs en los ácidos urónicos sulfatados en 2-O, mientras que la heparinasa II tiene una especificidad de sustrato más amplia y escinde enlaces glicosídicos que contienen ácidos urónicos tanto sulfatados en 2-O como no sulfatados (Ernst, S., Langer, R., Cooney, C. L. y Sasisekharan, R. (1995) Crit Rev Biochem Mol Biol 30, 387-444). La heparinasa III, en oposición a la heparinasa I, escinde fundamentalmente regiones infrasulfatadas de HLGAGs, a saber, enlaces glicosídicos que contienen un ácido urónico no sulfatado (Ernst, S., Langer, R., Cooney, C. L. y Sasisekharan, R. (1995) Crit Rev Biochem Mol Biol 30, 387-444). Investigaciones múltiples acerca de la especificidad de sustrato de las heparinasas han aumentado su utilidad como instrumentos para el establecimiento de las relaciones de estructura-función para HLGAGs. Varias patentes y solicitudes de patente describen modificaciones y variantes y fragmentos de heparinasa útiles, incluyendo la patente US 6.217.863 B1 y las solicitudes pendientes 09/384.959 y 09/802.285. Otras modificaciones y variantes son también útiles. Se requiere una comprensión más detallada para maximizar su utilidad como generadores de LMWH farmacológica. Los descubrimientos de la invención proporcionan algo más de este detalle (como se describe más adelante).

Glucuronidasa e iduronidasa, como sugiere su nombre, escinden en el enlace glicosídico después de un ácido glucurónico y ácido idurónico respectivamente. El ácido nitroso corta aleatoriamente en los enlaces glicosídicos después de una hexosamina N-sulfatada, y convierte el anillo de hexosamina de seis miembros en un anillo de anhidromanitol de 5 miembros.

Los métodos para analizar polisacáridos identificando la presencia de un componente de firma pueden utilizarse para proporcionar una evaluación cualitativa del polisacárido (por ejemplo, si el componente de firma está presente o ausente) o una evaluación cuantitativa (por ejemplo, la cantidad de componente de firma presente para indicar una cualidad de la muestra tal como actividad, pureza o simplemente para comparar muestras diferentes). El método se realiza en algunos aspectos identificando un componente en la muestra de polisacárido y determinando un valor cuantitativo de la cantidad de componente. En algunas realizaciones, el método implica identificar y cuantificar al menos dos componentes.

El valor cuantitativo puede calcularse por cualquier medio, tal como determinando el área bajo la curva (AUC) cuando la muestra se procesa por electroforesis capilar, el factor de respuesta (RF), o la cantidad porcentual relativa de cada fracción presente en la muestra. Métodos para obtener estos tipos de cálculos se describen más adelante en detalle en la sección de Ejemplos. Resumidamente, el AUC puede calcularse directamente a partir de un espectro de CE. El factor de respuesta es aquella cantidad de firma que proporciona la misma respuesta que un oligosacárido de control. El RF puede calcularse, por ejemplo, en términos de absorbancia y compararse con la absorbancia de una muestra de control. La cantidad porcentual relativa de cada fracción presente en la muestra puede determinarse de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$PRA = RF \times AUC_{\%R}$$

en la que

PRA = cantidad relativa en porcentaje de cada fracción

RF = factor de respuesta

$AUC_{\%R}$ = AUC relativa en porcentaje $[(100 \times AUC_C)/AUC_T]$

AUC_C = área bajo la curva para un componente

AUC_T = la suma del área bajo la curva para todos los componentes.

5 Los datos pueden procesarse individualmente o por medio de un ordenador. Por ejemplo, puede realizarse de acuerdo con la invención un método implementado por ordenador para generar una estructura de datos, materializada tangiblemente en un medio legible por ordenador, que representa un valor cuantitativo de un componente de un polisacárido. La determinación cuantitativa se efectúa realizando el cálculo anterior.

10 Un sistema de ordenador que puede realizar lo anterior como un programa de ordenador puede incluir típicamente una unidad principal conectada a la vez a un dispositivo de salida que presenta la información a un usuario y a un dispositivo de entrada que recibe la entrada de un usuario. La unidad principal incluye generalmente un procesador conectado a un sistema de memoria por un mecanismo de interconexión. El dispositivo de entrada y el dispositivo de salida pueden estar conectados también al procesador y al sistema de memoria por el mecanismo de interconexión.

15 Pueden estar conectados al sistema de ordenador uno o más dispositivos de salida. Ejemplos de dispositivos de salida incluyen una presentación por tubo de rayos catódicos (CRT), presentaciones de cristal líquido (LCD), impresoras, dispositivos de comunicación tales como un módem, y salida de audio. Pueden estar conectados también al sistema de ordenador uno o más dispositivos de entrada. Dispositivos de entrada ilustrativos incluyen un teclado convencional, teclado numérico, esfera de control, ratón, pluma y tableta, dispositivo de comunicación, y dispositivos de entrada de datos tales como sensores. La materia que constituye el objeto descrito en esta memoria no se limita a los dispositivos particulares de entrada o salida utilizados en combinación con el sistema de ordenador o a los descritos en esta memoria.

20 El sistema de ordenador puede ser un sistema de ordenador de uso general que puede programarse utilizando un lenguaje de programación de ordenador, tal como C++, Java, u otro lenguaje, tal como un lenguaje de programación o lenguaje ensamblador. El sistema de ordenador puede incluir también hardware para fines especiales, programado especialmente, tal como, por ejemplo, un Circuito Integrado de Aplicación Específica (ASIC). En un sistema de ordenador de uso general, el procesador es típicamente un procesador disponible comercialmente, del que son ejemplos las series de procesadores x86, Celeron, y Pentium, disponibles de Intel, y dispositivos similares de AMD y Cyrix, los microprocesadores de la serie 680X0 disponibles de Motorola, el microprocesador PowerPC de IBM, y los procesadores de la serie Alpha de Digital Equipment Corporation. Están disponibles muchos otros procesadores. Un microprocesador de este tipo ejecuta un programa denominado sistema operativo, del que son ejemplos Windows NT, Linux, UNIX, DOS, VMS y OS8, que controla la ejecución de otros programas de ordenador y proporciona programación, depuración de fallos, control de entrada/salida, contabilidad, compilación, asignación de almacenamiento, tratamiento de los datos y gestión de la memoria, así como control de las comunicaciones y servicios análogos. El procesador y el sistema operativo definen una plataforma de ordenador para la cual pueden escribirse programas de aplicación en lenguajes de programación de alto nivel.

35 Un sistema de memoria incluye típicamente un medio de registro no volátil legible por ordenador y susceptible de escritura, del cual son ejemplos un disco magnético, una memoria flash y una cinta. El disco puede ser movable, tal como un "disco flexible", o permanente, conocido como un disco duro. Un disco tiene cierto número de pistas en las cuales se almacenan señales, típicamente en forma binaria, es decir, una forma interpretada como una secuencia de unos y ceros. Señales de este tipo pueden definir un programa de aplicación a ejecutar por el microprocesador, o información almacenada en el disco que debe ser procesada por el programa de aplicación. Típicamente, durante la operación, el procesador hace que los datos sean leídos del medio de registro no volátil a un elemento de memoria de circuito integrado, que es típicamente una memoria volátil de acceso aleatorio tal como una memoria dinámica de acceso aleatorio (DRAM) o memoria estática (SRAM). El elemento de memoria de circuito integrado permite típicamente un acceso más rápido que el disco a la información por el procesador. El procesador manipula generalmente los datos contenidos en la memoria de circuito integrado y copia luego los datos al disco después de que se ha completado el procesamiento. Se conoce una diversidad de mecanismos para gestionar el movimiento de los datos entre el disco y el elemento de memoria de circuito integrado, y el objeto descrito en esta memoria no se limita a tales mecanismos. Adicionalmente, el objeto descrito en esta memoria no se limita a un sistema de memoria particular.

50 El objeto descrito en esta memoria no está limitado a una plataforma de ordenador particular, procesador particular, o lenguaje de programación de alto nivel particular. Adicionalmente, el sistema de ordenador puede ser un sistema de ordenador multiprocesador o puede incluir ordenadores múltiples conectados a una red de ordenadores. Debe entenderse que cada módulo (por ejemplo 110, 120) en FIG. 1 puede ser módulos separados de un programa de ordenador, o puede tratarse de programas de ordenador separados. Tales módulos pueden ser operativos en ordenadores separados. Los datos (por ejemplo, 104, 106, 110, 114, y 116) pueden almacenarse en un sistema de memoria o transmitirse entre sistemas de ordenadores. El objeto descrito en esta memoria no está limitado a ninguna implementación particular que utilice software o hardware o firmware, o cualquier combinación de los mismos. Los diversos elementos del sistema, sea individualmente o en combinación, pueden implementarse como un producto de programa de ordenador materializado tangiblemente en un dispositivo de almacenamiento legible por

la máquina para ejecución por un procesador de ordenador. Se pueden realizar diversas etapas del proceso por un procesador de ordenador que ejecute un programa materializado tangiblemente en un medio legible por ordenador para realizar funciones trabajando sobre una entrada y generando una salida. Los lenguajes de programación de ordenador adecuados para implementar un sistema de este tipo incluyen lenguajes de programación de procedimientos, lenguajes de programación orientados a objetos, y combinaciones de ambos.

También se descubrieron métodos mejorados para preparar composiciones de LMWH. Los métodos actuales para purificar heparina de bajo peso molecular (LMWH) para uso clínico incluyen la precipitación de una mezcla de glucosaminoglucanos y la recuperación de una fracción que contiene fragmentos de heparina que oscilan en tamaño desde 1 a 14.000 Da. En N. Volpi, Biochemica t Diophysica Acta 1290 (1996) 299-307 se describe un método estándar utilizado en la purificación de heparina:

... los componentes de movimiento lento y de movimiento rápido de heparina se purificaron como sus sales de bario a diferentes temperaturas, como se dio a conocer previamente. La heparina purificada de mucosa intestinal bovina se disolvió en agua, y se añadió lentamente con agitación acetato de bario (5%) (el pH de la disolución se ajustó a 6,0-7,0). Tras calentar hasta 50°-70°C, la disolución se dejó a temperatura ambiente (20-25°C) durante 24 h. El precipitado obtenido se solubilizó en agua y se transformó en su sal sódica en resina de Amberlite IR-120. La sal sódica de la especie de heparina de movimiento lento bruta se recogió por precipitación con 2,0 volúmenes de acetona y se secó. El sobrenadante se mantuvo a 5°C durante 24 h, y el precipitado se recogió por centrifugación a 5°C. La sal de bario de la especie de movimiento rápido se purificó como se dio a conocer para la especie de movimiento lento.

El producto obtenido mediante esta metodología es una mezcla heterogénea de fragmentos de heparina que tiene numerosas dificultades cuando se administra a pacientes, debido a la naturaleza heterogénea del producto así como la falta de capacidad para cuantificar los niveles de componentes activos en la mezcla. Por el contrario, la nueva estrategia de purificación descrita aquí proporciona una fracción sustancialmente pura de LMWH que es cuantificable y reproducible, y de este modo carece de muchos de los efectos secundarios asociados con el producto de la técnica anterior. Sorprendentemente, se descubrió según la invención que la fracción citada como el componente de movimiento rápido (la segunda fracción), que se desechó en los métodos de la técnica anterior, realmente tiene cantidades significativas de actividad terapéutica. De este modo, el presente método implica un tipo similar de reacción de precipitación, pero implica el aislamiento y manipulación del material desechado previamente.

En general, el método implica una precipitación de la muestra de HLGAG con una sal de cationes divalentes y aniones débiles. En algunas realizaciones, la sal de los cationes divalentes y aniones débiles se selecciona de entre el grupo que incluye: bario, calcio, magnesio, estroncio, cobre, níquel, cadmio, cinc, mercurio, berilio, níquel, paladio, platino, hierro, y estaño. En algunas realizaciones, la sal de cationes divalentes y aniones débiles son acetatos de cationes de elementos de la tabla periódica que tienen valencia divalente. En realizaciones preferidas, la sal de cationes divalentes y aniones débiles es acetato de bario. En otras realizaciones, la sal de cationes divalentes y aniones débiles es acetato de calcio o cloruro de calcio. En algunas realizaciones, se pueden usar otros métodos de precipitación con acetato que son conocidos por los expertos en la técnica.

La precipitación se puede llevar a cabo en el intervalo de temperaturas de 0°C a 70°C. La temperatura para la precipitación puede ser 0°C, 2°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, o 70°C, o puede ser cualquier temperatura dentro de este intervalo. En una realización preferida, la temperatura de la precipitación es 4°C. En otras realizaciones, la temperatura de la precipitación será la temperatura ambiente, que incluye temperaturas en el intervalo de 18°C a 22°C.

El disolvente usado en la precipitación es un disolvente polar. En algunas realizaciones, el disolvente polar es H₂O, etanol, acetona, H₂O mezclado con etanol, H₂O mezclado con acetona, acetona. En algunas realizaciones, el disolvente polar tiene una relación volumen a volumen de H₂O:etanol en el intervalo de: 99:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 65:35, 55:45, 50:50, 45:55, 35:65, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, o 1:99. En otras realizaciones, el disolvente polar tiene una relación volumen a volumen de H₂O:acetona en el intervalo de 99:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 65:35, 55:45, 50:50, 45:55, 35:65, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, o 1:99. En todavía otras realizaciones, el disolvente polar es una mezcla de H₂O, etanol, y acetona.

Tras la etapa de la precipitación, la muestra (segunda fracción) se puede someter opcionalmente a un proceso de intercambio iónico antes de ser procesada adicionalmente. En algunos casos, la muestra se hace pasar a través de una columna de intercambio iónico, tal como una columna de amberlite IR-120. El uso de este tipo de columna es útil para eliminar la sal usada en la etapa de precipitación, y sustituirla por otra tal como sodio.

La muestra que contiene glucosaminoglucano es una muestra, de la cual al menos una fracción está compuesta de glucosaminoglucanos o HLGAGs. Como se ha expuesto anteriormente, los términos glucosaminoglucano o HLGAG incluyen, pero sin carácter limitante, heparina, análogos de heparina, LMWH, heparina biotecnológica, heparina modificada químicamente, o heparina sintética.

El glucosaminoglucano se puede fraccionar en heparina de un tamaño específico variando las condiciones descritas aquí para temperatura, disolvente, y enzima. Los ejemplos de resultados de variaciones de temperatura, aunque no

pretenden ser limitantes, ilustran la variación en el contenido de las fracciones de precipitación en base a la temperatura. El uso de acetato de bario al 5% p/v a 4°C da como resultado una segunda fracción que comprende LMWH como se define por la FDA. Esta fracción tiene actividad elevada para la anticoagulación, y una cantidad baja de sulfatación (< 70%). La fracción que queda en el sobrenadante a 4°C se puede categorizar como la heparina de peso molecular ultrabajo. En contraste con la precipitación a 4°C, la precipitación a temperatura ambiente da como resultado la fracción uno que contiene una heparina de mayor MW (MW: 10.000-14.000), una mayor cantidad de sulfatación (> 85%), y una menor actividad de anticoagulación que la que da la precipitación llevada a cabo a 4°C.

Otro ejemplo no limitante es el uso de acetato de calcio o acetato de magnesio al 5% en lugar de acetato de bario al 5%. A 4°C, este cambio dará como resultado la fracción uno que precipita (heparina de peso molecular elevado), mientras deja la fracción dos (heparina de peso molecular bajo) en el sobrenadante. La fracción 2 se puede hacer precipitar entonces del sobrenadante añadiendo un disolvente polar tal como etanol o acetona.

En general, la fracción de mayor peso molecular y/o mayor carga precipitará a mayor temperatura, con una menor cantidad de disolvente polar tal como etanol o acetona. La disminución de la temperatura, y/o el incremento de la cantidad de disolvente polar, puede dar como resultado la precipitación de la fracción con menor peso molecular, menor carga, y mayor actividad de anticoagulación. Los parámetros de la precipitación se pueden alterar sin experimentación innecesaria por alguien de pericia normal en la técnica.

Tras la precipitación, la segunda fracción, la fracción de LMWH, se procesa para producir una preparación de LMWH concentrada. La expresión "preparación de LMWH concentrada" se refiere a una preparación que se ha alterado de una u otra forma a partir de la segunda fracción aislada. La etapa de procesamiento puede implicar una etapa de separación o una etapa de purificación, tal como una precipitación. El procesamiento de la preparación de LMWH se puede lograr además mediante digestión enzimática o química para producir la preparación de LMWH concentrada. En una realización, la fracción se digiere, y la enzima usada en la digestión es Heparinasa III o una variante funcionalmente activa o fragmento de la misma. El término heparinasa se utiliza genéricamente para abarcar variantes funcionalmente activas y fragmentos de las mismas además de las heparinasas naturales. Varias patentes y solicitudes de patente describen modificaciones y variantes y fragmentos de heparinasa útiles, incluyendo la patente US 6.217.863 B1 y las solicitudes pendientes 09/384.959 y 09/802.285. La heparinasa III causa despolimerización de la heparina. Dependiendo de la concentración de heparinasa III utilizada, y del periodo durante el cual se utiliza (digestión parcial frente a digestión exhaustiva), se obtiene heparina de peso molecular específico, y/o carga. Por ejemplo, aunque no se pretende ser limitantes, ocurre que una digestión parcial de heparina con un equivalente molar de heparinasa III daría como resultado una fracción de mayor peso molecular, y/o mayor carga que lo que lo haría una reacción con un tiempo de digestión más largo. Asimismo, el aumento de la equivalencia molar de heparinasa III dará como resultado una fracción con menor peso molecular y/o menor carga que si se utiliza una equivalencia molar de heparinasa inferior. En algunas realizaciones, pueden utilizarse concentraciones y duración de digestiones de Heparinasa III en combinación con sal, temperatura, y composición del disolvente, como se describe en esta memoria, a fin de obtener heparina de peso molecular, carga y/o actividad biológica específicas.

Como alternativa, la segunda fracción se puede degradar químicamente para producir la preparación de LMWH concentrada. En una realización, la fracción se degrada químicamente utilizando un método seleccionado del grupo que incluye, pero sin carácter limitante: despolimerización oxidativa con H_2O_2 o Cu^+ y H_2O_2 , escisión desaminante con nitrito de isoamilo, o ácido nitroso, escisión β -eliminadora con éster bencílico de heparina por tratamiento alcalino o por heparinasa.

La segunda fracción de la precipitación, que se denomina heparina de movimiento rápido en la referencia de Volpi, difiere de la primera fracción, que se denomina por la referencia de Volpi como la heparina de movimiento lento. El peso molecular medio de la segunda fracción es 8.000 Dalton, y el peso molecular medio de la primera fracción es 14.000 Dalton. Además, la segunda fracción comprende 100% de LMWH, definiéndose LMWH como una subespecie de heparina de peso molecular medio menor que 8.000 Da, y en la que al menos 60% de las moléculas tienen un peso molecular menor que 8.000 Da. Usando esta definición, la primera fracción es 0% de LMWH.

También se describen composiciones de preparaciones de LMWH. La composición de LMWH es una mezcla de moléculas de diversos pesos moleculares. Como se ha descrito arriba, la mezcla homogénea contiene fragmentos que pueden variar en peso molecular pero tienen un peso molecular medio inferior a 8.000 D. Una composición de LMWH de compuestos que tengan un intervalo de pesos moleculares de 4.000-6.000 Daltons, por ejemplo, es una mezcla de diversas LMWH en la cual el tamaño medio oscila entre 4.000 a 6.000 Da. En algunas realizaciones, el porcentaje de LMWH que está va de 4.000 y 6.000 Da en la muestra es 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% de los componentes en la mezcla.

En algunos aspectos, la composición es una preparación de LMWH que tiene una actividad anti-Xa de al menos 150 UI/mg. En algunas realizaciones, la preparación de LMWH tiene una relación de actividad anti-factor Xa:anti-factor IIa mayor que 1, 2, 3, 4, o 5.

En otros aspectos, la composición es una preparación de LMWH que tiene una relación de actividad anti-factor Xa:anti-factor IIa mayor que 5. En todavía otros aspectos, la composición es una preparación de LMWH que tiene al menos 3,5% de $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; o $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$. En algunas

realizaciones, la preparación de LMWH tiene al menos 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 15,0, o 20,0% de $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; or $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$.

Las composiciones de LMWH se pueden formular opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones se pueden formular además en dispositivos de suministro específicos. Así, en algunas realizaciones, las composiciones se formulan específicamente para la forma de suministro intravenosa, subcutánea, oral, en aerosol, u otra forma de suministro mucosal. En algunas realizaciones, las composiciones se formulan en dispositivos de liberación sostenida como se describe más abajo.

Alguien de pericia normal en la técnica, a la luz de la presente descripción, está capacitado para producir preparaciones sustancialmente puras de composiciones de LMWH. Las preparaciones de LMWH se preparan a partir de fuentes de HLGAG. Una "fuente de HLGAG", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a una composición de glucosaminoglucano semejante a heparina que puede manipularse para producir LMWH utilizando tecnología estándar, incluyendo degradación enzimática, etc. Como se ha descrito arriba, los HLGAGs incluyen, pero sin carácter limitante, heparina aislada, heparina modificada químicamente, heparina preparada por biotecnología, heparina sintética, sulfato de heparano, y LMWH. Así pues, pueden aislarse HLGAGs de fuentes naturales, prepararse por síntesis directa, mutagénesis, etc. Los HLGAGs pueden ser sustancialmente puros en algunas realizaciones. Como se utiliza en esta memoria, la expresión "sustancialmente puro" significa que los polisacáridos están esencialmente exentos de otras sustancias en una proporción práctica y apropiada para su uso propuesto. En particular, los polisacáridos son suficientemente puros y están suficientemente exentos de otros constituyentes biológicos de sus ambientes hospedantes, de tal modo que son útiles en, por ejemplo, producción de preparaciones farmacéuticas.

Las preparaciones de LMWH como se utilizan en esta memoria son sales de GAGs sulfatados que tienen un peso molecular (MW) medio inferior a 8.000 Da y para las cuales al menos 60% de todas las moléculas tienen un MW inferior a 8.000 Da. Por definición, las preparaciones de LMWH se producen a partir de una muestra de HLGAG. El término LMWH no abarca polisacáridos que se sintetizan directamente como LMWHs, tales como SR90107A. SR90107A es un polisacárido sintético que tiene un peso molecular de aproximadamente 1500 Da. Estos tipos de compuestos, que se preparan directamente como compuestos de peso molecular bajo en lugar de prepararse a partir de una fuente de HLGAGs, no se consideran comprendidos dentro de la clase de LMWH. El término LMWH sí incluye, sin embargo, HLGAGs sintéticos que se procesan para producir LMWHs.

Se han utilizado varios métodos diferentes para la preparación comercial de LMWHs. El fraccionamiento directo por tamaños se ha utilizado para preparar LMWH (Fraxiparin) en una escala experimental, pero su deficiente rendimiento ha impedido por regla general su utilización en escala industrial. Para fines de producción industrial, se han utilizado cierto número de procesos químicos o enzimáticos. Los procesos químicos aprovechan la ventaja de un amplio intervalo de reacciones tales como despolimerización parcial con ácido nitroso (Fragmin), escisión oxidativa con H_2O_2 (Normiflo y Fluxum), escisión oxidativa con Cu^{++} y H_2O_2 , o por bencilación seguida por β -eliminación e hidrólisis alcalina (Enoxaparin). Se han descrito también métodos enzimáticos para generar LMWH utilizando despolimerización parcial β -eliminadora por heparinasa I (Logiparin).

Las LMWHs producidas según la presente descripción tienen propiedades funcionales mejoradas con respecto a las preparaciones de LMWH de la técnica anterior. Una ventaja de las composiciones de la descripción es que se puede alterar la cantidad de actividad anticoagulante para fines terapéuticos. Dependiendo del sujeto que se esté tratando y/o de la afección del sujeto, puede ser deseable incrementar o disminuir la actividad anticoagulante de los compuestos. Por ejemplo, si un sujeto sufre un suceso de coagulación agudo, a menudo es deseable administrar al sujeto una preparación de LMWH que tiene una actividad anticoagulante elevada, tal como una de las composiciones que tiene una actividad de al menos 150 UI/mg. Otros sujetos pueden estar solamente en riesgo de desarrollar un trastorno trombotico. Generalmente es deseable administrar a estos sujetos una preparación de LMWH que tiene una menor actividad anticoagulante. La capacidad de identificar el porcentaje de región de unión a AT no escindida, tal como el decaesacárido que tiene la estructura $\Delta\text{U}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{I}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, o uno de los tetrasacáridos $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; o $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$ (o compuestos relacionados), en una muestra, permite que se formulen composiciones con cantidades específicas de región no escindida de unión a AT intacta. Esta capacidad de preparar LMWH con porcentajes conocidos de la región de unión a AT intacta proporciona un método para cuantificar la actividad de composiciones terapéuticas de LMWH. Así pues, los métodos de la invención hacen posible que una persona con experiencia en la técnica prepare o identifique una composición apropiada de LMWH, dependiendo del sujeto y del trastorno que se esté tratando.

Como se utiliza en esta memoria, el término "intacto" significa no escindido y completo. La expresión "regiones de unión a AT" hace referencia a una región de HLGAG que interacciona específicamente con AT-III. La región de unión a AT incluye el compuesto decaesacárido que tiene la estructura: $\Delta\text{U}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{I}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$ y los tetrasacáridos $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; y $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$. En algunas realizaciones, la preparación de LMWH es una composición en la cual al menos 20% de la secuencia del polisacárido en la composición es región de unión a AT intacto. En otras realizaciones, al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, o 55% de la secuencia del polisacárido en la composición es región de unión a AT intacto. Como se ha expuesto anteriormente, el porcentaje óptimo de AT-10 intacto en una composición para tratamiento variará

dependiendo de la condición médica bajo tratamiento. Un nivel mayor de actividad puede ser deseable para pacientes en peligro de formación de coágulos de sangre que en pacientes sometidos a tratamiento para cáncer, en los cuales no es deseable actividad anticoagulante.

En otros aspectos, la composición es una preparación de LMWH que tiene >15% de disacáridos disulfatados, <75% de disacáridos trisulfatados, 3-5% de disacáridos monosulfatados y >2% de tetrasacárido 4-7. La preparación de LMWH tiene un MW medio < 8.000, del cual al menos 60% de las cadenas tiene un MW < 8.000. Las preparaciones de LMWH que tienen estas propiedades tienen una actividad anti-XA de > 150 UI/mg, y un valor antiXa/IIa de > 1,5. Las composiciones que tienen estas propiedades se pueden preparar mediante los métodos descritos más arriba. El material citado como la preparación de LMWH de la fracción 2 es una composición que tiene estas propiedades. La composición de la fracción 1 es un material heparínico que tiene < 15% de disacáridos disulfatados, > 75% de disacáridos trisulfatados, 0-3% de disacáridos monosulfatados, 0-2% de 4-7 tetrasacárido, y que tiene un MW medio de 8000-14000. El material de la fracción 1 tiene una actividad anti-XA de < 150 UI/mg, y un valor antiXa/IIa de < 2.

La cantidad de región de unión a AT en las preparaciones de LMWH puede manipularse por una diversidad de parámetros experimentales. Los métodos de la invención hacen posible controlar las cantidades de región de unión a AT en una preparación de LMWH, permitiendo el control de calidad de las preparaciones de LMWH utilizando el componente de firma, proporcionando un procedimiento de aislamiento mejorado que da como resultado el aislamiento de una preparación rica en LMWH, y proporcionando nuevas reglas para las especificidades de escisión de las heparinasas. Las dos primeras de estas propiedades se han expuesto en detalle anteriormente.

El papel de las heparinasas en la preparación de LMWHs con regiones de unión a AT intacto ha sido descrito en la técnica anterior. Específicamente, una secuencia publicada que contenía un sitio de unión a AT-III intacta, se describió como $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}}$ (Toida, T., Hileman, R. E., Smith, A. E., Vlahova, P. I. y Linhardt, R. J. (1996) J Biol Chem 271, 32040-7). Adicionalmente, se ha demostrado en la técnica anterior que tetrasacáridos que contienen 3-O-sulfato no son escindibles por ninguna de las heparinasas (Yamada, S., Yoshida, K., Sugiura, M, Sugahara, K., Khoo, K. H., Morris, H. R. y Dell, A. (1993) J Biol Chem 268,4780-7.), lo que sugiere que los enlaces con una glucosamina sulfatada en 3-O son resistentes a la escisión. Sorprendentemente, se descubrió que estas doctrinas de la técnica anterior eran incorrectas. En los ejemplos, los autores de la presente invención han demostrado concluyentemente por una diversidad de técnicas fisicoquímicas que la estructura real de AT-10 es $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$ y por consiguiente no contiene un sitio de unión a AT-III intacta. Teniendo en cuenta la reinterpretación de la estructura de AT-10, los autores de la invención trataron de reexaminar la acción de las heparinasas I-III frente a oligosacáridos de unión a AT que contienen 3-O-sulfato. Dado que AT-10 (ultra-LMWH, MW = 2769,3 Da) se obtiene por escisión controlada de heparina con heparinasa I, se intentó también examinar las consecuencias funcionales de un oligosacárido, utilizando técnicas bioanalíticas establecidas. Es necesaria una comprensión de este tipo tanto de la acción de las heparinasas como de sus consecuencias funcionales para la generación eficiente y óptima de LMWH para uso clínico.

Así, como se muestra en los Ejemplos, se ha descubierto que las heparinasas I y II escinden realmente la región de unión a AT de los HLGAGs dando como resultado la pérdida de la región de unión a AT intacta, mientras que la heparinasa III no lo hace. Adicionalmente, se ha descubierto que la sulfatación en 3-O de la glucosamina en el extremo reductor de un enlace glicosídico imparte resistencia a la escisión por las heparinasas I, II y III. El examen de las consecuencias biológicas y farmacológicas de un oligosacárido de heparina que contiene únicamente un sitio de unión parcial a AT-III muestra que un oligosacárido de este tipo tiene una actividad anti-Xa significativa pero carece de algunos de los atributos funcionales de los glucosaminoglucanos similares a heparina que contiene un sitio de AT-III intacto. De este modo, si se produce una preparación de HLGAGs, tal como, por ejemplo, mediante el método de preparación descrito anteriormente, la preparación se puede modificar adicionalmente de manera que tenga una mayor o menor actividad anticoagulante escindiendo enzimáticamente con heparinasas. Si la preparación se somete a escisión enzimática mediante heparinasa I y/o II, la actividad anticoagulante se reducirá. Si la preparación se trata con heparinasa III, la actividad anticoagulante se potenciará.

Estos métodos son también válidos para una clase más amplia de compuestos. Las doctrinas de la invención pueden utilizarse para desarrollar terapéuticas especializadas de polisacáridos a partir de una gran diversidad de materiales polisacáridos de partida. Una vez que se identifica un componente activo en un polisacárido, dicho componente activo puede utilizarse como firma para el control de calidad de la muestra, y puede utilizarse para generar e identificar composiciones terapéuticas que están mejoradas para una actividad terapéutica particular, y de las cuales se han eliminado las regiones que son responsables de dichos efectos secundarios.

Las composiciones pueden administrarse terapéuticamente a un sujeto. Como se utiliza en esta memoria, un sujeto es un ser humano, primate no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o roedor.

Los HLGAGs y las LMWHs en particular tienen muchas utilidades terapéuticas. Las composiciones de LMWH pueden utilizarse para el tratamiento de cualquier tipo de afección en el cual la terapia con LMWH haya sido identificada como una terapia útil. Así, la invención es útil en una diversidad de métodos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* en los cuales son útiles las terapias con LMWH. Por ejemplo, es sabido que las composiciones de LMWH son útiles para prevenir la coagulación, inhibir el crecimiento de las células cancerosas y las metástasis, prevenir la

angiogénesis, prevenir la neovascularización, y prevenir la psoriasis. Las composiciones de LMWH pueden ser utilizadas también en ensayos *in vivo*, tales como una muestra de control de calidad.

Todos estos trastornos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harrison's Principles of Internal Medicine (McGraw Hill, Inc., New York).

- 5 De este modo, las preparaciones de LMWH son útiles para tratar o prevenir trastornos asociados con la coagulación. Una "enfermedad asociada con la coagulación", como se usa aquí, se refiere a una afección caracterizada por inflamación local que resulta de una interrupción en el suministro sanguíneo a un tejido debido a un bloque del vaso sanguíneo responsable de suministrar sangre al tejido, tal como se observa en el infarto de miocardio o cerebral. Un
- 10 ataque isquémico cerebral o una isquemia cerebral es una forma de afección isquémica en la que se bloquea el suministro sanguíneo al cerebro. Esta interrupción en el suministro sanguíneo al cerebro puede resultar de una variedad de causas, incluyendo un bloqueo u oclusión intrínseca del propio vaso sanguíneo, una fuente de oclusión originada remotamente, una menor presión de perfusión o una mayor viscosidad de la sangre que da como resultado un flujo sanguíneo cerebral inadecuado, o un vaso sanguíneo roto en el espacio subaracnoideo o tejido intracerebral.
- 15 Los métodos de la descripción son útiles también para tratar isquemia cerebral. La isquemia cerebral puede dar como resultado déficits transitorios o permanentes, y la gravedad del daño neurológico en un paciente que ha experimentado isquemia cerebral depende de la intensidad y duración del suceso isquémico. Un ataque isquémico transitorio es aquel en el que el flujo sanguíneo al cerebro se interrumpe solo brevemente y provoca déficits neurológicos temporales, que a menudo se disipan en menos de 24 horas. Los síntomas de TIA incluyen
- 20 entumecimiento o debilidad de la cara o extremidades, pérdida de la capacidad para hablar claramente y/o para comprender el discurso de otros, una pérdida de visión o apagado de la visión, y una sensación de mareo. Los ataques isquémicos cerebrales permanentes, también denominados apoplejía, son causados por una interrupción más prolongada del flujo sanguíneo al cerebro, que resulta de una tromboembolia. Una apoplejía provoca una pérdida de neuronas que da como resultado típicamente un déficit neurológico que puede mejorar pero que no se
- 25 resuelve completamente. La apoplejía tromboembólica es debida a la oclusión de un vaso sanguíneo extracraneal o intracraneal por un trombo o émbolo. Debido a que a menudo es difícil de discernir si una apoplejía es causada por una trombosis o una embolia, el término "tromboembolia" se usa para cubrir apoplejías causadas por estos mecanismos.
- En algunas realizaciones, los métodos se dirigen al tratamiento de apoplejía tromboembólica aguda usando LMWHs.
- 30 Una apoplejía aguda es un síndrome médico que implica lesión neurológica que resulta de un suceso isquémico, que es una interrupción en el suministro sanguíneo al cerebro.
- Una cantidad eficaz de una preparación de LMWH, sola o en combinación con otra sustancia terapéutica para el tratamiento de apoplejía, es aquella cantidad suficiente para reducir la lesión cerebral *in vivo* que resulta de la apoplejía. Una reducción de la lesión cerebral es una prevención de la lesión al cerebro que de otro modo habría
- 35 ocurrido en un sujeto que experimenta una apoplejía tromboembólica ausente del tratamiento de la invención. Se pueden usar varios parámetros fisiológicos para evaluar la reducción de la lesión cerebral, incluyendo tamaño más pequeño del infarto, flujo sanguíneo cerebral regional mejorado, y menor presión intracraneal, por ejemplo, en comparación con los parámetros de pacientes previos al tratamiento, pacientes con apoplejía no tratada, o pacientes con apoplejía que han sido tratados con agentes trombolíticos solos.
- 40 La preparación de LMWH farmacéutica se puede usar sola o en combinación con otro agente terapéutico para tratar una enfermedad asociada con la coagulación. Los ejemplos de sustancias terapéuticas útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas con la coagulación incluyen agentes anticoagulación, agentes antiplaquetarios, y agentes trombolíticos.
- 45 Los agentes anticoagulación evitan la coagulación de componentes sanguíneos, y evitan así la formación de coágulos. Los anticoagulantes incluyen, pero no se limitan a, heparina, warfarina, cumadina, dicumarol, fenprocumón, acenocumarol, bismacetato de etilo, y derivados de indandiona.
- Los agentes antiplaquetarios inhiben la agregación de plaquetas, y se usan a menudo para evitar la apoplejía tromboembólica en pacientes que han experimentado un ataque isquémico transitorio o apoplejía. Los agentes antiplaquetarios incluyen, pero no se limitan a, aspirina, derivados de tienopiridina tales como ticlopidina y
- 50 clopidogrel, dipiridamol y sulfipirazona, así como miméticos de RGD y también agentes antitrombina tales como, pero sin limitarse a, hirudina.
- Los agentes trombolíticos rompen los coágulos, que provocan la apoplejía tromboembólica. Los agentes trombolíticos se han usado en el tratamiento de tromboembolia venosa aguda y embolias pulmonares, y son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Hennekens et al, J Am Coll Cardiol; v. 25 (7 sup.), p. 18S-22S (1995);
- 55 Holmes, et al, J Am Coll Cardiol; v. 25 (7 supl.), p. 10S-17S (1995)). Los agentes trombolíticos incluyen, pero no se limitan a, plasminógeno, a₂-antiplasmina, estreptoquinasa, anistreplasa, activador del plasminógeno tisular (tPA), y uroquinasa. "tPA", como se usa aquí, incluye tPA natural y tPA recombinante, así como formas modificadas de tPA que retienen las actividades enzimáticas o fibrinolíticas de tPA natural. La actividad enzimática de tPA se puede

medir evaluando la capacidad de la molécula para convertir plasminógeno en plasmina. La actividad fibrinolítica de tPA se puede determinar mediante cualquier actividad de lisis del coágulo *in vitro* conocida en la técnica, tal como el ensayo de lisis del coágulo purificado descrito por Carlson, et. al., Anal. Biochem. 168, 428-435 (1988), y sus formas modificadas descritas por Bennett, W. F. Et al., 1991, *más arriba*.

- 5 En una realización, las preparaciones de LMWH se usan para inhibir la angiogénesis. Una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis de la preparación de LMWH se administra a un sujeto que necesite el tratamiento de la misma. Angiogénesis, como se usa aquí, es la formación inapropiada de nuevos vasos sanguíneos. La "angiogénesis" se produce a menudo en tumores cuando las células endoteliales segregan un número de factores de crecimiento que son mitogénicos para el endotelio, provocando el alargamiento y proliferación de células endoteliales que da como resultado la generación de nuevos vasos sanguíneos. Varios de los mitógenos angiogénicos son péptidos de unión a heparina que están relacionados con factores de crecimiento de células endoteliales. La inhibición de la angiogénesis puede provocar represión tumoral en modelos de animales, sugiriendo un uso como un agente terapéutico contra el cáncer. Una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis es una cantidad de preparación de LMWH que es suficiente para disminuir el número de vasos sanguíneos que crecen en un tumor. Esta cantidad se puede evaluar en un modelo de animal de tumores y angiogénesis, muchos de los cuales son conocidos en la técnica.

Las preparaciones de LMWH también son útiles para inhibir la neovascularización asociada con enfermedad ocular. En otra realización, la preparación de LMWH se administra para tratar psoriasis. La psoriasis es una enfermedad dermatológica común causada por inflamación crónica.

- 20 Las composiciones que contienen LMWH también pueden inhibir el crecimiento y metástasis de células cancerosas. De este modo, los métodos de la invención son útiles para tratar y/o prevenir la proliferación o metástasis de células tumorales en un sujeto. Los términos "prevenir" y "que previene", como se usan aquí, se refieren a inhibir completa o parcialmente el efecto biológico, por ejemplo angiogénesis o proliferación o metástasis de un cáncer o célula tumoral, así como inhibir cualquier incremento en el efecto biológico, por ejemplo angiogénesis o proliferación o metástasis de un cáncer o célula tumoral.

- El cáncer puede ser un cáncer maligno o no maligno. Los cánceres o tumores incluyen, pero no se limitan a, cáncer del tracto biliar; cáncer cerebral; cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer esofágico; cáncer gástrico; neoplasmas intraepiteliales; linfomas; cáncer hepático; cáncer pulmonar (por ejemplo, de células pequeñas y células no pequeñas); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; 30 cáncer ovárico; cáncer de páncreas; cáncer prostático; cáncer rectal; sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas.

- Un sujeto que necesite tratamiento puede ser un sujeto que tiene una probabilidad elevada de desarrollar cáncer. Estos sujetos incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen una anomalía genética, cuya presencia se ha demostrado que tiene una relación correlativa con una mayor probabilidad de desarrollar un cáncer, y sujetos expuestos a 35 agentes que provocan cáncer, tales como tabaco, asbestos, y otras toxinas químicas, o un sujeto que ha sido tratado previamente para el cáncer y está en remisión aparente.

- Se administran cantidades eficaces de la composición que contiene LMWH a sujetos que necesitan tal tratamiento. Las cantidades eficaces son aquellas cantidades que darán como resultado una reducción deseada en la proliferación o metástasis celular, o que evitarán la coagulación sin provocar otros efectos secundarios médicamente inaceptables. Tales cantidades se pueden determinar sin una experimentación más allá de la normal. Se cree que serán eficaces dosis que oscilan de 1 nanogramo/kilogramo a 100 miligramos/kilogramo, dependiendo del modo de administración. El porcentaje eficaz de LMWH intacta se puede determinar con una experimentación no más allá de la normal. La cantidad absoluta dependerá de una variedad de factores (incluyendo si la administración se realiza conjuntamente con otros métodos de tratamiento, el número de dosis y parámetros del paciente individual, 40 incluyendo edad, estado físico, tamaño y peso), y se puede determinar con una experimentación normal. Generalmente se prefiere usar una dosis máxima, esto es, la dosis segura más elevada según el juicio médico. El modo de administración puede ser cualquier modo médicamente aceptable, incluyendo inhalación, oral, subcutáneo, intravenoso, etc.

- En algunos aspectos, la cantidad eficaz de una composición que contiene LMWH es aquella cantidad eficaz para prevenir la invasión de una célula tumoral a través de una barrera. La invasión y metástasis del cáncer es un proceso complejo que implica cambios en las propiedades de adhesión celular que permiten que una célula transformada invada y migre a través de la matriz extracelular (ECM) y adquiera propiedades de crecimiento independientes del anclaje. Liotta, L. A., et al., Cell 64:327-336 (1991). Algunos de estos cambios se producen en adhesiones focales, que son puntos de contacto célula/ECM que contienen moléculas de señalización asociadas a la membrana, citoesqueléticas, e intracelulares. La enfermedad metastásica se produce cuando los focos 55 diseminados de células tumorales siembran un tejido que apoya su crecimiento y propagación, y esta diseminación secundaria de células tumorales es la responsable de la morbimortalidad asociada con la mayoría de los cánceres. De este modo, el término "metástasis", como se usa aquí, se refiere a la invasión y migración de células tumorales lejos del sitio del tumor primario.

La barrera para las células tumorales puede ser una barrera artificial *in vitro* o una barrera natural *in vivo*. Las barreras *in vitro* incluyen, pero no se limitan a, membranas revestidas con matriz extracelular, tales como Matrigel. De este modo, las composiciones de LMWH se pueden evaluar para determinar su capacidad para inhibir la invasión de células tumorales en un sistema de ensayo de invasión de Matrigel como se describe en detalle por Parish, C.R., et al., "A Basement-Membrane Permeability Assay which Correlates with the Metastatic Potential of Tumour Cells," Int. J. Cancer (1992) 52:378-383. Matrigel es una membrana de basamento reconstituida que contiene colágeno de tipo IV, laminina, proteoglicanos de sulfato de heparano tal como perlecan, que se une a y localiza bFGF, vitronectina, así como también factor de crecimiento transformante (TGF), activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), activador de plasminógeno tisular (tPA), y la serpina, conocida como inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1). En la técnica anterior se han descrito otros ensayos *in vitro* e *in vivo* para metástasis; véase, por ejemplo, la patente US nº 5.935.850, expedida el 10 de agosto de 1999. Una barrera *in vivo* se refiere a una barrera celular presente en el cuerpo de un sujeto.

Según otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar sujetos que necesitan agotar la heparina circulante. En este aspecto, se utilizan cantidades eficaces de combinaciones de heparinasas I, II, y III (o sus formas modificadas). Por ejemplo, los sujetos que sufren cirugía de corazón abierto o hemodiálisis necesitan a menudo agotar cantidades médicamente indeseables de heparina en la sangre como resultado de la cirugía o hemodiálisis. Usando una combinación de heparinasa I o II y heparinasa III, se puede administrar al sujeto la cantidad apropiada de función anticoagulante terapéuticamente activa para obtener un balance apropiado de la cascada de coagulación. Las cantidades eficaces de la combinación de heparinasas son aquellas cantidades que darán como resultado una reducción deseada en los niveles de heparina circulante sin el agotamiento completo y sin provocar ningún otro efecto secundario médicamente inaceptable.

En general, las cantidades terapéuticamente útiles de la combinación de heparinasas se pueden determinar con una experimentación no más allá de la normal. Se cree que serán eficaces dosis que oscilan de 1 nanogramo/kilogramo a 100 miligramos/kilogramo, dependiendo del modo de administración. La cantidad absoluta dependerá de una variedad de factores (incluyendo si la administración se realiza conjuntamente con otros métodos de tratamiento, el número de dosis y parámetros del paciente individual, incluyendo edad, estado físico, tamaño y peso), y se puede determinar con una experimentación normal. Generalmente se prefiere que se use una dosis máxima, esto es, la dosis segura más elevada según el juicio médico. El modo de administración puede ser cualquier modo médicamente aceptable, incluyendo oral, subcutáneo, intravenoso, etc.

En general, cuando se administran para fines terapéuticos, las formulaciones de la invención se aplican en disoluciones farmacéuticamente aceptables. Tales preparaciones pueden contener de manera normal concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes amortiguadores, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

Las composiciones se pueden administrar *per se* (puras) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden usar convenientemente sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sus sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico, y bencenosulfónico. También, las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar como sales de metales alcalinos o alcalino-térreos, tales como sales de sodio, de potasio o de calcio del grupo ácido carboxílico.

Los agentes amortiguadores adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2% P/V); ácido cítrico y una sal (1-3% P/V); ácido bórico y una sal (0,5-2,5% P/V); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2% P/V). Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03% P/V); clorobutanol (0,3-0,9% P/V); parabenos (0,01-0,25% P/V) Y timerosal (0,004-0,02% P/V).

La presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas, para uso médico, que comprenden preparaciones de LMWH junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa aquí, y como se describe de forma más completa más abajo, significa una o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes, sólidos o líquidos, compatibles, que son adecuados para la administración a un ser humano o a otro animal. En la presente invención, el término "vehículo" representa un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de ser combinados con la LMWH de la presente invención, y entre sí, de manera que no hay interacción que alterase sustancialmente la eficiencia farmacéutica deseada.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del polisacárido, que puede ser isotónica con la sangre del receptor. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, disolución de Ringer, y disolución de cloruro sódico isotónica. Además, convencionalmente se emplean como disolvente o medio de suspensión aceites fijos estériles. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables. Las formulaciones de vehículos

adecuadas para administraciones subcutáneas, intramusculares, intraperitoneales, intravenosas, etc., se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Hay disponible una variedad de vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, del porcentaje particular de LMWH seleccionado, de la afección particular que se esté tratando, y de la dosis requerida para la eficacia terapéutica. De forma general, los métodos se pueden poner en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, queriendo decir cualquier modo que produzca niveles eficaces de un efecto biológico sin provocar efectos adversos clínicamente inaceptables.

Para uso en terapia, una cantidad eficaz de la preparación de LMWH se puede administrar a un sujeto mediante cualquier modo que suministre la LMWH a la superficie deseada, por ejemplo mucosal, sistémico. La "administración" de la composición farmacéutica se puede lograr por cualquier medio conocido por el experto. Las vías preferidas de administración incluyen, pero no se limitan a, oral, parenteral, intramuscular, intranasal, intratraqueal, por inhalación, ocular, vaginal y rectal.

Para la administración oral, los compuestos (es decir, las preparaciones de LMWH) se pueden formular fácilmente combinando el compuesto o compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los compuestos de la invención se formulen como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones, y similares, para ingestión oral por el sujeto a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener como excipiente sólido, opcionalmente triturando una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Opcionalmente, las formulaciones orales también se pueden formular en disolución salina o amortiguadores para neutralizar condiciones ácidas internas, o se pueden administrar sin vehículos.

Los núcleos de las grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar disoluciones de azúcares concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca, y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden añadir materias colorantes o pigmentos a los comprimidos o revestimientos de grageas para identificar o caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar oralmente incluyen cápsulas de dos partes hechas de gelatina, así como cápsulas blandas cerradas herméticamente hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de dos partes pueden contener los ingredientes activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. También se pueden usar microesferas formuladas para administración oral. Tales microesferas se han definido bien en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para tal administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar, formulados de manera convencional.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos para uso según la presente invención se pueden suministrar convenientemente en forma de una presentación de pulverizador de aerosol de paquetes a presión o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de por ejemplo gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Cuando es deseable suministrarlos sistémicamente, los compuestos se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tener formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones para inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen

aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones muy concentradas.

Como alternativa, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para la reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases para supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales 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 apenas solubles, por ejemplo como una sal apenas soluble.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados. Los ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles.

Tales formas de preparación farmacéutica líquidas o sólidas adecuadas son, por ejemplo, disoluciones acuosas o salinas para inhalación, microencapsuladas, encocleadas, revestidas sobre partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, peletes para implante en la piel, o secadas sobre un objeto afilado para ser rayado sobre la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación extendida de compuestos activos, en cuya preparación se usan habitualmente excipientes y aditivos y/o auxiliares tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes de hinchamiento, lubricantes, saborizantes, edulcorantes o solubilizantes como se describen anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para uso en una variedad de sistemas de suministro de fármacos. Para un repaso breve de los métodos para el suministro de fármacos, véase Langer, Science 249:1527-1533, (1990).

Las composiciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria, y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar la LMWH activa con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el polisacárido con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y entonces, si es necesario, conformando el producto. El polisacárido se puede almacenar liofilizado.

Otros sistemas de suministro pueden incluir sistemas de suministro de liberación en el tiempo, de liberación retrasada o de liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar las administraciones repetidas de la LMWH, incrementando las ventajas para el sujeto y el médico. Existen muchos tipos de sistemas de suministro de liberación, y son conocidos por los expertos normales en la técnica. Incluyen sistemas a base de polímeros tales como poliácido láctico y poliácido glicólico, polianhídridos y policaprolactona; sistemas sin polímeros que son lípidos, incluyendo esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas a base de péptidos; revestimientos de cera, comprimidos prensados que usan aglutinantes y excipientes convencionales, implantes parcialmente fusionados, y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas erosionales, en los que el polisacárido está contenido en una forma dentro de una matriz, encontrados en las patentes U.S. n^{os} 4.452.775 (Kent); 4.667.014 (Nestor et al.); y 4.748.034 y 5.239.660 (Leonard), y (b) sistemas difusionales, en los que un componente activo permea a una velocidad controlada a través de un polímero, encontrados en las patentes U.S. n^{os} 3.832.253 (Higuchi et al.) y 3.854.480 (Zaffaroni). Además, se puede utilizar un sistema de suministro de hardware a base de una bomba, algunos de los cuales están adaptados para el implante.

Cuando se administran a un paciente que sufre tratamiento contra el cáncer, las composiciones de LMWH se pueden administrar en cócteles que contienen otros agentes anticancerosos. Las composiciones también se pueden administrar en cócteles que contienen agentes que tratan los efectos secundarios de la terapia de radiación, tales como antieméticos, protectores de la radiación, etc.

Los fármacos anticancerosos que se pueden coadministrar con los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a Acicivina; Aclarrubicina; Hidrocloruro de Acodazol; Acronina; Adriamicina; Adozelesina; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramycin; Asparaginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Hidrocloruro de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesina; Sulfato de Bleomicina; Brequinar Sódico; Bropirimina; Busulfán; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimer; Carboplatino; Carmustina; Hidrocloruro de Carubicina;

Carzelesina; Cedefingol; Clorambucilo; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Hidrocloruro de Daunorrubicina; Decitabina; Dexormaplatino; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; Doxorubicina; Hidrocloruro de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Hidrocloruro de Eflornitina; Elsamitrucina; 5 Enloplatino; Enpromato; Epiropidina; Hidrocloruro de Epirubicina; Erbulozol; Hidrocloruro de Esorubicina; Estramustina; Fosfato de Estramustina y Sodio; Etanidazol; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etoprina; Hidrocloruro de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracilo; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina Sódica; Gemcitabina; Hidrocloruro de Gemcitabina; Hidroxiurea; Hidrocloruro de Idarrubicina; Ifosfamida; Ilmofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón Alfa-2b; Interferón Alfa-n1; Interferón Alfa-n3; Interferón Beta-la; Interferón 10 Gamma-lb; Iproplatino; Hidrocloruro de Irinotecán; Acetato de Lanreotida; Letrozol; Acetato de Leuprolida; Hidrocloruro de Liarozol; Lometrexol Sódico; Lomustina; Hidrocloruro de Losoxantrona; Masoprocol; Maitansina; Hidrocloruro de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalán; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato Sódico; Metoprina; Meturedapa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper; Mitotano; Hidrocloruro de Mitoxantrona; Ácido Micoferónico; 15 Nocodazol; Nogalamicina; Ormaplatino; Oxisuran; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobromán; Puposulfán; Hidrocloruro de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfimer Sódico; Porfiomicina; Prednimustina; Hidrocloruro de Procarbazina; Puomicina; Hidrocloruro de Puomicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Hidrocloruro de Safingol; Semustina; Simtrazeno; Esparfosato Sódico; Esparsomicina; Hidrocloruro de Espirogermanio; Espiromustina; Espiropatino; Estreptonigrina; 20 Estreptozocina; Sulofenur; Talisomicina; Tecogalán Sódico; Tegafur; Hidrocloruro de Teloxantrona; Temoporfina; Tenipósido; Teróxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurina; Tirapazamina; Hidrocloruro de Topotecán; Citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Glucuronato de Trimetrexato; Triptorelina; Hidrocloruro de Tubulozol; Mostaza de Uracilo; Uredapa; Vapreotida; Verteporfina; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de 25 Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zeniplatino; Zinostatina; Hidrocloruro de Zorubicina.

Las composiciones de LMWH también se pueden enlazar a una molécula seleccionadora de dianas. Una molécula seleccionadora de dianas es cualquier molécula o compuesto que es específico para una célula o tejido particular y que se puede usar para dirigir la LMWH a la célula o tejido. Preferiblemente, la molécula seleccionadora de dianas es una molécula que interacciona específicamente con una célula cancerosa o un tumor. Por ejemplo, la molécula seleccionadora de dianas puede ser una proteína u otro tipo de molécula que reconoce e interacciona específicamente con un antígeno tumoral.

Los antígenos tumorales incluyen Melan-A/MART-1, Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina desaminasa (ADA), ciclofilina b, antígeno asociado a carcinoma colorrectal (CRC)-C017-1A/GA733, Antígeno 35 Carcinoembrionario (CEA) y sus epítopos inmunogénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, Antígeno Específico de la Próstata (PSA) y sus epítopos inmunogénicos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, Antígeno de Membrana Específico de la Próstata (PSMA), cadena zeta del receptor de células T/CD3, familia de MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, 40 MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia de GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia de MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, fetoproteína, E-cadherina, catenina, p120ctn, gp100^{Pmel117}, PRAME, NY-ESO-1, glicógeno fosforilasa cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1, CT-7, cdc27, proteína de Adenomatous polyposis coli (APC), fodrina, P1A, Conexina 37, 45 idiopato de Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos víricos tales como proteínas del virus del papiloma humano, familia de Smad de antígenos tumorales, Imp-1, antígeno nuclear codificado por el EBV (EBNA)-1, y c-erbB-2.

Para ejemplos de antígenos tumorales que se unen a moléculas de MHC clase I y MHC clase II, o a ambas, véanse las siguientes referencias: Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995; Traversari et al., J. Exp. Med. 176:1453-1457, 1992; 50 Chaux et al., J. Immunol. 163:2928-2936, 1999; Fujie et al., Int. J. Cancer 80:169-172, 1999; Tanzarella et al., Cancer Res. 59:2668-2674, 1999; van der Bruggen et al., Eur. J. Immunol. 24:2134-2140, 1994; Chaux et al., J. Exp. Med. 189:767-778, 1999; Kawashima et al., Hum. Immunol. 59:1-14, 1998; Tahara et al., Clin. Cancer Res. 5:2236-2241, 1999; Gaugler et al., J. Exp. Med. 179:921-930, 1994; van der Bruggen et al., Eur. J. Immunol. 24:3038-3043, 1994; Tanaka et al., Cancer Res. 57:4465-4468, 1997; Oiso et al., Int. J. Cancer 81:387-394, 1999; Herman et al., Immunogenetics 43:377-383, 1996; Manici et al., J. Exp. Med. 189:871-876, 1999; Duffour et al., Eur. J. Immunol. 29:3329-3337, 1999; Zorn et al., Eur. J. Immunol. 29:602-607, 1999; Huang et al., J. Immunol. 162:6849-6854, 1999; 55 Boël et al., Immunity 2:167-175, 1995; Van den Eynde et al., J. Exp. Med. 182:689-698, 1995; De Backer et al., Cancer Res. 59:3157-3165, 1999; Jäger et al., J. Exp. Med. 187:265-270, 1998; Wang et al., J. Immunol. 161:3596-3606, 1998; Aarnoudse et al., Int. J. Cancer 82:442-448, 1999; Guilloux et al., J. Exp. Med. 183:1173-1183, 1996; Lupetti et al., J. Exp. Med. 188:1005-1016, 1998; Wölfel et al., Eur. J. Immunol. 24:759-764, 1994; Skipper et al., J. Exp. Med. 183:527-534, 1996; Kang et al., J. Immunol. 155:1343-1348, 1995; Morel et al., Int. J. Cancer 83:755-759, 1999; Brichard et al., Eur. J. Immunol. 26:224-230, 1996; Kittlesen et al., J. Immunol. 160:2099-2106, 1998; Kawakami et al., J. Immunol. 161:6985-6992, 1998; Topalian et al., J. Exp. Med. 183:1965-1971, 1996; Kobayashi et

- al., Cancer Research 58:296-301, 1998; Kawakami et al., J. Immunol. 154:3961-3968, 1995; Tsai et al., J. Immunol. 158:1796-1802, 1997; Cox et al., Science 264:716-719, 1994; Kawakami et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6458-6462, 1994; Skipper et al., J. Immunol. 157:5027-5033, 1996; Robbins et al., J. Immunol. 159:303-308, 1997; Castelli et al., J. Immunol. 162:1739-1748, 1999; Kawakami et al., J. Exp. Med. 180:347-352, 1994; Castelli et al., J. Exp. Med. 181:363-368, 1995; Schneider et al., Int. J. Cancer 75:451-458, 1998; Wang et al., J. Exp. Med. 183:1131-1140, 1996; Wang et al., J. Exp. Med. 184:2207-2216, 1996; Parkhurst et al., Cancer Research 58:4895-4901, 1998; Tsang et al., J. Natl Cancer Inst 87:982-990, 1995; Correale et al., J Natl Cancer Inst 89:293-300, 1997; Coulie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7976-7980, 1995; Wölfel et al., Science 269:1281-1284, 1995; Robbins et al., J. Exp. Med. 183:1185-1192, 1996; Brändle et al., J. Exp. Med. 183:2501-2508, 1996; ten Bosch et al., Blood 88:3522-3527, 1996; Mandruzzato et al., J. Exp. Med. 186:785-793, 1997; Guéguen et al., J. Immunol. 160:6188-6194, 1998; Gjertsen et al., Int. J. Cancer 72:784-790, 1997; Gaudin et al., J. Immunol. 162:1730-1738, 1999; Chiari et al., Cancer Res. 59:5785-5792, 1999; Hogan et al., Cancer Res. 58:5144-5150, 1998; Pieper et al., J. Exp. Med. 189:757-765, 1999; Wang et al., Science 284:1351-1354, 1999; Fisk et al., J. Exp. Med. 181:2109-2117, 1995; Brossart et al., Cancer Res. 58:732-736, 1998; Röpke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14704-14707, 1996; Ikeda et al., Immunity 6:199-208, 1997; Ronsin et al., J. Immunol. 163:483-490, 1999; Vonderheide et al., Immunity 10:673-679, 1999. Estos antígenos, así como otros, se describen en la Solicitud PCT PCT/US98/18601.

La descripción siguiente de experimentos realizados es ilustrativa y no limitante del alcance de la invención reivindicada.

EJEMPLOS

20 Ejemplo 1: Secuenciación de los deca-sacáridos que contienen 3-O-sulfato con un sitio de unión a antitrombina III parcial.

Introducción:

La heparina y los glucosaminoglucanos de sulfato de heparano representan una clase importante de moléculas que interaccionan con y modulan la actividad de factores de crecimiento, enzimas, y morfógenos. De las muchas funciones biológicas para esta clase de moléculas, una de sus funciones más importantes es su interacción con antitrombina III (AT-III). La unión de AT-III a una secuencia específica del pentasacárido de heparina, que contiene un 3-O-sulfato extraño en una glucosamina N-sulfatada, 6-O-sulfatada, aumenta 1000 veces la capacidad de AT-III para inhibir proteasas específicas en la cascada de coagulación. De esta manera, los glucosaminoglucanos similares a la heparina (HLGAGs) juegan un papel biológico y farmacológico importante en la modulación de la coagulación de la sangre. Recientemente, se ha desarrollado una metodología de secuenciación (Solicitudes de Patente US n^{os} de Serie 09/557.997 y 09/558.137, presentadas el 24 de abril de 2000, de los mismos inventores, y Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) Science 286, 537-42.) para impulsar las relaciones de estructuración de esta clase importante de moléculas. Esta metodología combina un esquema de nomenclatura codificado por propiedades (PEN), para manipular el gran contenido de información (propiedades) de los HLGAGs, con la espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI-MS) y la degradación enzimática y química como restricciones experimentales para secuenciar rápidamente cantidades de picomoles de los oligosacáridos de HLGAG. Utilizando el enfoque de PEN-MALDI anterior, los autores de la presente invención han encontrado que la secuencia del deca-sacárido utilizada en este estudio es $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$ ($\pm$ DDD4-7). Los autores de la presente invención han confirmado sus propios resultados utilizando Secuenciación Integral de Glucanos y resonancia magnética nuclear unidimensional de protón. Adicionalmente, los autores de la presente invención han demostrado que este enfoque es flexible y es capaz de deducir información de secuencia a partir de una mezcla de oligosacáridos. Así pues, esta metodología hace posible tanto el análisis de otras secuencias extrañas en polisacáridos tales como heparina/sulfato de heparano con actividades biológicas importantes, al mismo tiempo que proporciona la base para el análisis estructural de este grupo farmacológicamente importante de heparina/sulfatos de heparano.

Métodos

Abreviaturas: HLGAG, glucosaminoglucanos similares a heparina; AT-III, antitrombina III; AT-10, deca-sacárido fraccionado de AT-III aislado por digestión parcial de heparina; IGS, Secuenciación Integral de Glucanos; PEN, nomenclatura codificada por propiedades; MALDI-MS, espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz; CE, electroforesis capilar; abreviaturas de las secuencias de HLGAG como sigue, I, ácido α -L-idurónico; G, ácido β -D-glucurónico; ΔU , ácido $\Delta^{4,5}$ -urónico; 2S, 3S, y 6S, sulfatación en 2-O, 3-O, o 6-O respectivamente; NS y NAC, N-sulfatación y N-acetilación de la glucosamina.

Materiales. El deca-sacárido AT-10 es el mismo sacárido utilizado en estudios previos (Rhomborg, A. J., Shriver, Z., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 12232-7 y Ernst, S., Rhomborg, A. J., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 4182-7). Los oligosacáridos se disolvieron en agua desionizada a concentraciones de 10-35 μ M. Las heparinasas I-III de *Flavobacterium heparinum* se purificaron como se ha descrito previamente. Las exoenzimas α -L-iduronato-2-O-sulfatasa, α -L-iduronidasa, β -D-glucuronidasa y N-acetilglucosamina-6-sulfatasa se adquirieron de Oxford Glycosciences. Una disolución acuosa al 40% de nitrito de

sodio se adquirió de Aldrich Chemical. Los estándares de disacáridos para el análisis de composición se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Análisis de la composición. El análisis de la composición de los oligosacáridos se completó por digestión exhaustiva de una muestra 30 μ M de AT-10 seguida por electroforesis capilar (CE) como se ha descrito previamente (Rhomborg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4176-81). De modo resumido, se añadieron a 1 nmol de oligosacárido 200 nM de heparinasas I, II y III en acetato de sodio 25 mM, NaCl 100 mM, y tampón de acetato de calcio 5 mM, de pH 7,0. Se dejó que la reacción transcurriera a 30°C durante una noche, y luego se analizó por CE en polaridad inversa con un tampón de paso de tris-fosfato 50 mM y sulfato de dextrano 10 μ M de pH 2,5.

Digestiones. Se diseñaron digestiones con heparinasa I cortas o exhaustivas. Para digestión corta, se incubó heparinasa 50 nM con el sustrato durante 10 minutos antes del análisis. Las digestiones exhaustivas se completaron con enzima 200 nM durante una noche. Las reacciones enzimáticas se realizaron por adición de 1 μ l de disolución de enzima en un tampón que contenía ovoalbúmina 10 μ M, sulfato de dextrano 1 μ M, acetato de calcio 5 mM y tampón de etilendiamina 10 mM a pH 7,0 a 4 μ l de disolución acuosa de sustrato; se dejó que la digestión transcurriera a la temperatura ambiente como se ha descrito anteriormente (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) *Science* 286, 537-42 y Rhomborg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4176-81). Se completó la escisión parcial con ácido nitroso utilizando una modificación de procedimientos publicados (Turnbull, J. E., Hopwood, J. J. y Gallagher, J. T. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2698-703). Las digestiones con exoenzimas se completaron simultánea o secuencialmente. Las concentraciones finales de enzima estaban comprendidas en el intervalo de 20-40 miliunidades/ml, y la digestión se llevó a cabo a 37°C.

Espectrometría de masas. Los análisis espectrales de masas se realizaron en un equipo PerSeptive Biosystems Voyager Elite de tiempo de vuelo con reflectrón en el modo lineal con extracción retrasada. Se prepararon muestras de los materiales digeridos tomando 0,5 μ l de la mezcla de reacción y añadiéndolos a 4,5 μ l de disolución matriz (12 mg/ml de ácido cafeico en acetonitrilo al 30%) que contenía un exceso molar de 2 veces del péptido básico (RG)₁₉R (masa calculada del ión (M+H)⁺ = 4226,8). La adición del péptido básico para formar específicamente quelatos con los oligosacáridos HLGAG y los parámetros de recogida de los espectros de masa permiten el análisis directo de la muestra sin necesidad de repurificación de la muestra (Rhomborg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4176-81). Las muestras se aplicaron por puntos sobre la diana y se recogieron los espectros de masas utilizando los parámetros reseñados previamente (Rhomborg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4176-81). Se observan en cada espectro de masas los iones (M+H)⁺ del péptido básico y el ión (M+H)⁺ de un complejo 1:1 péptido:sacárido, y se determina la masa del sacárido restando el valor *m/z* medido del ión (M+H)⁺ del péptido del correspondiente del complejo 1:1 (Juhasz, P. y Biemann, K. (1995) *Carbohydr Res* 270, 131-47). Todos los espectros en una placa se calibraron externamente utilizando un estándar de (RG)₁₉R y su complejo con un hexasacárido derivado con ácido nitroso de la secuencia l_{2s}H_{NS},_{6s}l_{2s}H_{NS},_{6s}l_{2s}Man_{6s} (masa calculada de 1655,4) con parámetros instrumentales idénticos. Esta metodología requiere sulfatación suficiente del sacárido para asegurar una complejación eficiente. Como tal, los sacáridos pequeños infrasulfatados (es decir, mono- y disacáridos) no se observan con esta metodología (Juhasz, P. y Biemann, K. (1995) *Carbohydr Res* 270, 131-47).

Secuenciación Integral de Glucanos. La secuenciación integral de glucanos (IGS) utilizando separación electroforética se llevó a cabo como se ha descrito (Turnbull, J. E., Hopwood, J. J. y Gallagher, J. T. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2698-703). Las condiciones de escisión parcial con ácido nitroso se modificaron utilizando HCL 25 mM y nitrito de sodio 2,5 mM y tiempos de parada de 5, 10, 20, 30, 120, y 240 minutos.

Espectroscopía de RMN ¹H. La espectroscopía RMN ¹H se realizó utilizando las condiciones descritas previamente (Nadkarni, V. D., Toida, T., Van Gorp, C. L., Schubert, R. L., Weiler, J. M., Hansen, K. P., Caldwell, E. E. y Linhardt, R. J. (1996) *Carbohydr Res* 290, 87-96). Se sometió AT-10 a cromatografía de intercambio iónico para separar las impurezas paramagnéticas. Una columna (1 cm x 10 cm) de AG 50W-X8 (Bio-Rad Japan, Tokio) se convirtió en la forma sódica por tratamiento con 5 ml de NaOH 0,1M y se lavó con agua durante 12 horas antes de su utilización. La muestra para los experimentos de RMN se aplicó a la columna, se eluyó con 20 ml de agua y se liofilizó. La muestra (~1 mg) se liofilizó luego tres veces a partir de 99,8% de D₂O (Merck, Alemania) y se disolvió en 0,5 ml de D₂O 100% (Aldrich Japan, Tokio) para espectroscopía de RMN en un tubo de 5 mm. La espectroscopía de RMN ¹H 1D de AT-10 se realizó en un espectrómetro JEOL GSX500A equipado con una sonda sintonizable de 5 mm en gradiente de campo a 298 K.

Resultados

Introducción a la Metodología de la Secuenciación

Se ha desarrollado recientemente una técnica de espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI-MS) que hace posible la determinación de la masa de oligosacáridos complejos de HLGAG (desde di- a deca-sacáridos) con una exactitud mejor que ± 1 Da (Juhasz, P. y Biemann, K. (1995) *Carbohydr Res* 270, 131-47 y Juhasz, P. y Biemann, K. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4333-7). Debido a la exactitud de la

medida resultante del peso molecular de los HLGAGs individuales, es posible una asignación única tanto de la longitud de un fragmento como del número y clase de sustituyentes, especialmente si el oligosacárido es un tetradecasacárido o más pequeño (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) Science 286, 537-42). Adicionalmente, MALDI-MS puede detectar fragmentos de oligosacáridos generados por degradación enzimática o química de un oligosacárido (Rhomborg, A. J., Shriver, Z., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 12232-7; Ernst, S., Rhomborg, A. J., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 4182-7; y Rhomborg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 4176-81). Finalmente, la sensibilidad de MALDI-MS es tal que pueden detectarse fácilmente cantidades tan pequeñas como 100 femtomoles de material.

Además de la técnica experimental MALDI-MS, se desarrolló una nomenclatura codificada por propiedades (PEN) para representar las 32 unidades de disacáridos utilizando un sistema de codificación hexadecimal (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) Science 286, 537-42). El desarrollo de PEN es necesario para manipular el gran contenido de información (propiedades) de los HLGAGs. Cada uno de los números hexadecimales se deduce basándose en una lógica interna que se manifiesta en sí misma en términos de la distribución de los sulfatos en una unidad de bloque de construcción particular y no está asignado de modo aleatorio simplemente para identificar cada unidad de disacárido. Este sistema es importante para los HLGAGs en el sentido de que permite la manipulación rápida de secuencias utilizando operaciones matemáticas o binarias simples, proporcionando con ello un instrumento de manipulación del gran contenido de información de los polisacáridos complejos. Adicionalmente, la diversidad estructural inherente en los HLGAGs surge necesariamente de las diferencias de propiedades (localización de los grupos sulfato y acetato cargados) haciendo de este modo del PEN un esquema de asignación natural para los HLGAGs. Esto está en contraste directo con los códigos alfabéticos utilizados para representar los nucleótidos del ADN y los aminoácidos o proteínas que sirven como meros identificadores y no codifican información alguna (propiedades) y no capturan por tanto la heterogeneidad química de estos biopolímeros.

El sistema de codificación hexadecimal comprende los alfanuméricos 0-9 y A-F. Dado que la unidad de disacárido tiene 4 posiciones, a saber, 2-O, N-, 3-O y 6-O que pueden modificarse, es inmediato asignar cada una de las cuatro posiciones de dígitos binarios del código hexadecimal a una de estas posiciones químicas. Adicionalmente, dado que existen únicamente dos modificaciones posibles en cada posición (2-O, 3-O y 6-O pueden estar sulfatados o libres, y la posición N puede estar sulfatada o acetilada *), el uso de un sistema binario captura estas modificaciones como estados simples encendidos o apagados. Por ejemplo, si, en una unidad de disacárido dada, la posición 2-O está sulfatada, entonces se le asigna el valor binario de 1. Inversamente, si la posición 2-O en un disacárido dado no está sulfatada, entonces se le asigna el valor binario de 0.

* Existen algunas secuencias de HLGAG raras con posición N-no sustituida, que pueden justificarse en el sistema PEN por adición de bits suplementarios. Sin embargo, en los estudios de los autores de esta invención, los experimentos iniciales que incluían análisis de composición (véase más adelante) no mostraban la presencia de disacáridos que contuvieran amina libre.

Para identificar un disacárido con un carácter alfanumérico, se han asignado las 4 posiciones binarias de la manera siguiente: se asignó la posición 2-O a la posición binaria situada más a la izquierda, seguido por las posiciones 6-O, 3-O y N- en este orden. En cada caso, como se ha reseñado anteriormente, se utilizó el código binario 1 para representar posiciones sulfatadas y se utilizó 0 para representar posiciones no sulfatadas en el caso de 2-O, 6-O y 3-O, y acetilación en el caso de la posición N.

Para codificar el estado isomérico del ácido urónico (a saber, ácido idurónico frente a ácido glucurónico), se designaron las unidades de disacáridos como +/- . De este modo, es posible asignar los códigos hexadecimales positivos a las unidades que contienen ácido idurónico, y los códigos hexadecimales negativos a las unidades que contienen ácido glucurónico. Así, las unidades de disacáridos con el mismo código hexadecimal pero signos opuestos poseen el mismo patrón de sulfatación, difiriendo únicamente en el estado isomérico del ácido urónico. La Tabla 1 reseña el uso de PEN para las unidades de disacáridos presentes en este estudio.

Tabla 1: Derivación de PEN para las unidades de disacáridos utilizadas en este estudio

I/G	2X	6X	3 X	N X	HE X	DISACC	MASS
0	0	1	0	0	4	I-H _{NAC,6S}	459,4
0	0	1	0	1	5	I-H _{NS,6S}	497,4
0	1	1	0	1	D	I _{2S} -H _{RS,6S}	577,5
1	0	1	0	1	-5	G-H _{H8,6S}	497,4
1	0	1	1	1	-7	G-H _{HS,3S,6S}	577,4

El código hexadecimal derivado para las unidades de disacáridos existentes en AT-10 se muestra en la Tabla 1. La columna 1 es la posición binaria que codifica el estado isomérico del ácido urónico. Las columnas 2 a 5 codifican las modificaciones en las posiciones 2-O, 6-O, 3-O y N- de la unidad de disacárido. La columna 6 muestra los códigos hexadecimales representados por los dígitos binarios en las columnas 2 a 5. La columna 7 muestra la unidad de disacárido representada por el código en la columna 6. La columna 8 muestra las masas teóricas calculadas de la unidad de disacárido presente internamente en una secuencia. Para las modificaciones químicas o enzimáticas de estos disacáridos, se utiliza la nomenclatura siguiente: ácido urónico con un enlace insaturado $A^{4-5}(\Delta U) = \pm$; unidad de disacárido del extremo reductor con una etiqueta másica = L ; unidad de disacárido con un anillo de anhidromanosa de cinco miembros = 5 .

De este modo, la estrategia para la asignación de secuencias de los oligosacáridos de HLGAG por PEN-MALDI implica esencialmente las etapas siguientes. En primer lugar, se utiliza MALDI-MS del oligosacárido intacto para asignar la longitud y el número total de sulfatos y acetatos presentes en el oligosacárido. Se utiliza luego el análisis de la composición para determinar el número y tipo de los bloques de construcción de los disacáridos. Con esta información, se construye una lista maestra de todas las secuencias posibles que contienen dichas unidades de disacárido. De esta manera, no se excluye secuencia alguna del análisis, por extraña que pueda ser una secuencia dada. La masa de fragmentos de oligosacáridos generados por digestión enzimática o degradación química se aplica como restricciones experimentales, y se eliminan las secuencias que no satisfacen estas restricciones. De manera iterativa, moviéndose desde las restricciones experimentales a la lista maestra de secuencias posibles cada vez menor, puede llegarse rápidamente a una solución de secuencia única utilizando un mínimo de material. Es importante que pueden utilizarse caminos múltiples utilizando restricciones experimentales separadas para converger en una sola secuencia, asegurando la exactitud de la asignación.

Análisis de AT-10

AT-10 y todos los oligosacáridos derivados del mismo por tratamiento enzimático o químico se detectan con MALDI-MS como complejos no covalentes con el péptido básico (RG)₁₉R (Rhombert, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 4176-81 y Juhasz, P. y Biemann, K. (1995) Carbohydr Res 270, 131-47). Utilizando esta metodología, se observan dos especies, un ión (M+H)⁺ de (RG)₁₉R y un ión (M+H)⁺ para el complejo péptido:sacárido. La masa molecular de un oligosacárido se obtiene restando el valor (M+H)⁺ del péptido del valor (M+H)⁺ del complejo 1:1 sacárido:péptido. La Tabla 2 enumera todos los fragmentos observados en este estudio, sus valores de masa calculados y derivados experimentalmente, y la estructura deducida de los fragmentos después de la asignación de secuencias de AT-10. La Figura 1 muestra que el componente principal de AT-10 tiene un valor *m/z* de 6999,3. Cuando se resta el valor *m/z* del péptido protonado, se encuentra que el valor experimental para la masa de este oligosacárido es 2770,2, que puede asignarse de forma única a un deca-sacárido con 13 sulfatos y 1 grupo acetato. El espectro de masas de AT-10 indica la presencia de otra especie (a la que se hace referencia en lo sucesivo como el contaminante) de masa 2690,1 (después de restar la contribución del péptido), que corresponde a un oligosacárido con 12 sulfatos y 1 grupo acetato.

Tabla 2: Valores *m/z* para los picos en los espectros de masas y sus estructuras deducidas

(M+H) ⁺ del complejo	Sacárido (observado)	Estructura deducida	Masa (calculada)
6999,3	2770,2	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS1]_{,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ (Fig.1)	2769,3
6919,2	2690,1	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS2]_{,6S}I/GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ (Fig.1)	2689,2
6899,6	2673,0	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS3]_{,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}$ (Fig.4)	2672,2
6435,8	2209,2	$I_{2S}H_{NS}[RS4]_{,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ (Fig. 4)	2209,8
6419,7	2192,2	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS5]_{,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ (Fig.2a)	2191,8
6339,8	2113,2	$I_{2S}H_{NS}[RS6]_{,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}$ (Fig.4)	2112,7
5899,9	1671,4	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS7]_{,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}d^*$ (etiquetada másicamente, Fig. 2c)	1670,4
5859,8	1633,2	$I_{2S}H_{NS}[RS8]_{,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ Fig. 4)	1632,3
5842,1, 5842,2, 5843,6	1614,6, 1614,4, 1615,1	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS9]_{,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ (Fig. 2a,b,c)	1614,3
5383,1, 5382,5	1155,6, 1154,0	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS10]_{,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ (Fig. 2a,c)	1154,9
5301,7	1073,9	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS11]_{,6S}I/GH_{NS,6S}$ (Fig. 2b)	1074,9

(M+H) ⁺ del complejo	Sacárido (observado)	Estructura deducida	Masa (calculada)
5284,5	1057,9	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS12]_{,6S}I_{2S}Man_{6S}$ (Fig.4)	1057,8
5241,5	1013,8	$IH_{NAC,6S}Man_{3S,6S}d$ (etiquetada másicamente, Fig. 3)	1013,9
5186,5	958,8	$IH_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}$ (Fig. 3)	957,8
5007,8	780,8	$H_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}$ (Fig. 3)	780,7
4805,2, 4805,3, 4805,2	577,7, 577,5, 576,7	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS13]_{,6S}$ (Fig. 2a,b,c)	577,5
* d- representa la etiqueta másica de semicarbazida ($\Delta = 56,1$ daltons)			

En la columna 1 se muestra el valor de m/z del complejo protonado 1:1 del sacárido y el péptido básico (RG)₁₉R. La columna 2 muestra la masa observada del sacárido obtenida restando el valor del péptido protonado observado en el espectro del complejo protonado 1:1. Las estructuras químicas deducidas de los sacáridos para los picos correspondientes en los espectros de masas se muestran en la columna 3. En la columna 4 se muestran las masas teóricas calculadas para las estructuras deducidas. Obsérvese que la masa observada (col. 2) está siempre dentro de ± 1 Dalton de la masa calculada (col. 4).

El análisis de composición utilizando CE indica la presencia de cuatro bloques de construcción disacáridos, que corresponden a $\Delta U_{2S}-H_{NS,6S}$ ($\pm D$), $\Delta U-H_{NAC,6S}$ (± 4), $\Delta U-H_{NS,6S}$ (± 5), y $\Delta U-H_{NS,3S,6S}$ (± 7), en la relación relativa de 2,90:1,00:1,05:0,15, respectivamente. Así, el análisis de composición de esta muestra confirmó que existen dos especies, una principal (~85%) y la otra menos importante (~15%). AT-10 tiene que ser un deca-sacárido que consiste en los bloques de construcción $\Delta U_{2S}-H_{NS,6S}$ ($\pm D$), $\Delta U-H_{NAC,6S}$ (± 4), y $\Delta U-H_{NS,3S,6S}$ (± 7) en una relación de 3:1:1. Juntos, los datos de CE y MALDI-MS se utilizaron para construir una lista maestra de posibles secuencias para AT-10. Los autores de la invención han encontrado que existen 320 secuencias que pueden justificar los datos de CE y MS (Tabla 2). Estas 320 secuencias constituyen la lista maestra de la que se eliminaron secuencias sobre la base de las restricciones experimentales hasta convergencia en una solución única.

Adicionalmente, el análisis de composición confirmó que existe un contaminante presente que era estructuralmente similar a AT-10, excepto por la presencia de $\Delta U-H_{NS,6S}$ (± 5). A partir de los datos de CE, se determinó que la composición del contaminante era $\Delta U_{2S}-H_{NS,6S}$ ($\pm D$), $\Delta U-H_{NAC,6S}$ (± 4), $\Delta U-H_{NS,3S,6S}$ (± 7), y $\Delta U-H_{NS,6S}$ (± 5) en la relación relativa de 2:1:1:1 por resta sucesiva.

Una vez construida la lista maestra de posibilidades de secuencia, se utilizó una combinación de PEN-MALDI, IGS (Turnbull, J. E., Hopwood, J. J. y Gallagher, J. T. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96, 2698-703), y análisis de RMN para secuenciar AT-10 y analizar luego la secuencia del contaminante.

Secuenciación de AT-10 por MALDI-MS

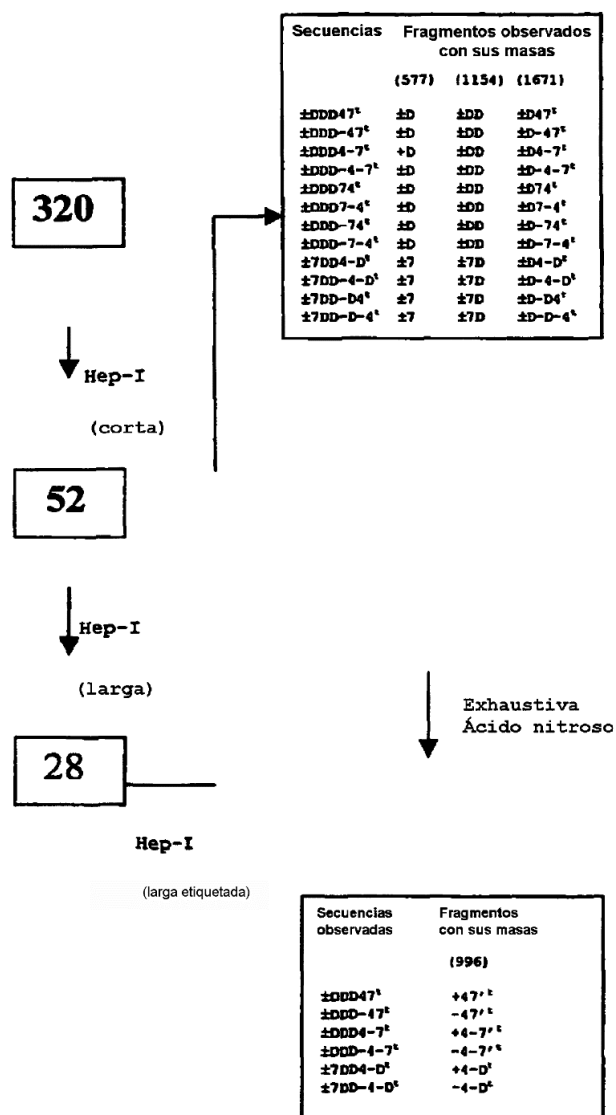
De la lista de 320 secuencias posibles generadas a partir de los datos de composición, se han utilizado una serie de restricciones experimentales, que incluyen el uso de heparinasa I y ácido nitroso, respectivamente, para asignar la secuencia de AT-10.

La digestión corta (incompleta) de AT-10 con la heparinasa I da como resultado cinco fragmentos de masa molecular 577,7, 1073,9, 1155,6, 1614,6 y 2192,2 (Figura 2a). El fragmento con masa 577,7 corresponde a $\pm D$. El fragmento de 1155,6 corresponde a un tetrasacárido hexasulfatado que debe tener una de las estructuras siguientes: $\pm DD$, $\pm D-D$, $\pm D7$, $\pm D-7$, $\pm 7D$, o $\pm 7-D$. El fragmento con 1614,6 corresponde a un hexasacárido heptasulfatado y monoacetilado, y el fragmento con 2192,2 corresponde a un octasacárido decasulfatado y monoacetilado. El último pico, a 1073,9, fue asignado inequívocamente al contaminante (véase más adelante para análisis). Cuando se investigó la lista de 320 secuencias respecto a estos fragmentos formados por digestión simulada con heparinasa I, se redujo la lista a 52 secuencias (Tabla 2).

La tasa de escisión del sustrato por heparinasa I depende del tamaño (Linhardt, R. J., Turnbull, J. E., Wang, H. M., Loganathan, D. y Gallagher, J. T. (1990) Biochemistry 29, 2611-7). Para identificar la totalidad de los enlaces sulfatados en 2-O que contenían iduronato en AT-10, se trató con heparinasa I en condiciones que dieron como resultado la escisión completa de todos los enlaces susceptibles. En estas condiciones, el hexasacárido y el tetrasacárido, del contaminante, se mantenían intactos (Figura 2b). Sin embargo, el tetrasacárido hexasulfatado (masa de 1155,6 de la Figura 2a) se escindió. Por tanto, este sacárido tiene la secuencia $\pm DD$. De las 52 asignaciones de secuencia posibles para AT-10, únicamente 28 pueden satisfacer los datos de la digestión exhaustiva con heparinasa I.

A continuación, se trató AT-10 con semicarbazida para producir una semicarbazona en la posición anomérica. De esta manera se introdujo una etiqueta másica ($\Delta = 56,1$) para diferenciar fragmentos derivados del extremo reductor en oposición al extremo no reductor. El tratamiento con heparinasa I de AT-10 etiquetado produjo cinco fragmentos (Figura 2c). A partir de una comparación de AT-10 no derivatizado tratado con heparinasa I (Figura 2a), el hexasacárido heptasulfatado y monoacetilado aparece etiquetado y por tanto tiene que derivarse del extremo reductor de AT-10. La aplicación de esta restricción a las 28 secuencias restantes elimina todas ellas excepto 12 (Tabla 3).

Tabla 3: Convergencia de la secuencia de AT-10



La estrategia por etapas utilizada para secuenciar la muestra de decaacárido se presenta en la Tabla 3. La aplicación de restricciones experimentales para eliminar las secuencias de la lista maestra de 320 * secuencias se utilizó para converger hacia la secuencia final. En los recuadros de la izquierda se muestra el número de secuencias que satisfacían las restricciones experimentales. Los recuadros a la derecha muestran las secuencias que satisfacen las restricciones experimentales junto con los posibles fragmentos formados para las masas representadas entre paréntesis en la parte superior de la tabla.

* Para obtener todos los decaacáridos posibles con la composición de 3 $\pm$ Ds, necesitamos un +4 y un +7 para disponer las unidades de disacárido anteriores de todas las maneras posibles, a fin de formar un decaacárido. Asimismo, cada unidad de disacárido puede ser un + o un - correspondiente a iduronato o glucuronato. El número de secuencias posibles = 5C_3 (disposición de 3Ds en 5 posiciones) * 2C_1 (disposición de las 4 en las dos posiciones restantes) * 2^4 (para justificar el + o - en todas las posiciones excepto el extremo no reductor, dado que el sacárido se deriva de heparinasa) = $10 \cdot 2 \cdot 16 = 320$.

La inspección de las 12 secuencias restantes en la Tabla 3 indica que la diferencia principal estriba en la identidad del hexasacárido del extremo reductor. Por esta razón, por degradación de AT-10 con ácido nitroso y utilización juiciosa de las exoenzimas, se determinó la secuencia del tetrasacárido del extremo reductor. En primer lugar, se trató exhaustivamente con ácido nitroso AT-10 etiquetado, y fueron fácilmente detectables dos especies (Figura 3).

La primera, con una masa de 1013,8, corresponde a un tetrasacárido de anhidromanosa etiquetado con cuatro sulfatos y un acetato. La otra, con una masa de 958,8, corresponde al mismo tetrasacárido que está sin etiquetar. Ambos podrían asignarse a una de las secuencias siguientes: ± 47 , $\pm 4-7$, $\pm 4-D$. Así, sobre la base de esta información, pudieron eliminarse la mitad de las secuencias posibles, dejando únicamente 6 soluciones de secuencia posibles para AT-10 (Tabla 3).

Para asignar de forma única el estado isomérico de las dos unidades de disacárido en el extremo reductor de AT-10, se utilizaron las restricciones experimentales siguientes: se incubó el producto de digestión exhaustiva con ácido nitroso con la enzima exolítica α -iduronidasa, que corta específicamente el ácido idurónico en el extremo no reductor. Un desplazamiento en el espectro de 178,0 confirmó el ácido urónico como 4 y su estado isomérico como +, es decir, $\text{IH}_{\text{NAC},6\text{S}}$ o +4. Únicamente 3 secuencias podrían proporcionar los fragmentos observados, a saber, $\pm 7\text{DD4-D}$, $\pm \text{DDD4-7}$, $\pm \text{DDD47}$.

Para diferenciar entre estas tres últimas alternativas e identificar el disacárido del extremo reductor, el producto tratado con iduronidasa se trató primeramente con 6-O-sulfatasa y N-desacetilasa a fin de separar la hexosamina, dejando únicamente el disacárido del extremo reductor. El tratamiento de esta muestra con β -glucuronidasa dio como resultado la degradación a monosacáridos. Esto identificó el disacárido del extremo reductor como -7 ($\text{G}_{\text{HNS},3\text{S},6\text{S}}$). Por tanto, la secuencia deducida del deca-sacárido fraccionado de AT-III es $\pm \text{DDD4-7}$ ($\Delta\text{U}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{IH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$). Debe observarse el hecho de que esta secuencia no está de acuerdo con la asignación de secuencia para un deca-sacárido producido de manera idéntica (Toida, T., Hileman, R. E., Smith, A. E., Vlahova, P. I. y Linhardt, R. J. (1996) J Biol Chem 271, 32040-7). Por esta razón, los autores de la invención trataron de confirmar su asignación de secuencia utilizando otras metodologías analíticas.

Secuenciación de AT-10 por IGS

Se secuenció también AT-10 utilizando la técnica recientemente establecida, Secuenciación Integral de Glucanos (IGS), que emplea una separación electroforética de los sacáridos etiquetados en el extremo reductor con un fluoróforo. La escisión parcial con ácido nitroso y digestión con exoenzimas del sacárido produce una escalera de la cual puede deducirse la secuencia. De acuerdo con los datos de PEN-MALDI, el análisis electroforético de la muestra etiquetada con fluoróforo produjo un solo deca-sacárido principal, pero adicionalmente, era también evidente el contaminante más pequeño. Los productos de la escisión parcial con ácido nitroso fueron deca-, octa-, hexa-, y tetrasacáridos, sin que se observara producto disacárido alguno. Este resultado define las posiciones de todos los restos NS y NAC, con un solo disacárido acetilado en N en la posición próxima al extremo reductor. Los desplazamientos en gel debidos al tratamiento de estos productos con combinaciones diferentes de exoenzimas demostraron restos iduronato en 3 posiciones, 2 de las cuales estaban sulfatadas en 2-O, y la presencia en tres posiciones de restos glucosamina sulfatados en 6-O. El extremo no reductor estaba claramente sulfatado en 2-O, pero la confirmación de la presencia de un 6-O-sulfato en el resto glucosamina del extremo no reductor y los detalles del patrón de sulfatación en el monosacárido del extremo reductor no se obtuvieron en este análisis. Este dato define la estructura de AT-10 como $\Delta\text{U}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{IH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NAC/NS},\pm 3\text{S},\pm 6\text{S}}$. Este dato, deducido de un enfoque de secuenciación independiente, es totalmente coherente con el análisis de PEN-MALDI.

Análisis de la secuencia del contaminante de AT-10

Los datos del espectro de masa también pueden usarse conjuntamente con el análisis de la composición de CE para llegar a una secuencia propuesta para el contaminante 12-sulfatado y 1-acetilado de AT-10. Como se ha indicado arriba, la digestión con heparinasa I (Figura 2a) proporcionó un pico para m/z de 1073,9 que corresponde a un tetrasacárido pentasulfatado ($\pm D\pm 5$, $\pm 7\pm 5$, o $\pm 5\pm 7$), que es asignable únicamente al contaminante.

Este fragmento tetrasacárido no se derivaba del extremo reductor del contaminante, dado que no se encontró en ningún caso un sacárido marcado que contuviera ± 5 . Adicionalmente, una digestión con heparinasa I del deca-sacárido etiquetado sitúa 4-7 en el extremo reductor, tanto para el contaminante como para AT-10. Para localizar la posición del tetrasacárido D5 o D-5 observado en la digestión con heparinasa I, se trató el deca-sacárido con iduronato 2-O antes del tratamiento con heparinasa I. En estas condiciones, la masa del tetrasacárido pentasulfatado se reducía en 80 Da (desde una masa de 1073,9 a 993,9, resultante de la pérdida de sulfato). Por tanto, este tetrasacárido tiene que derivarse del extremo no reductor del contaminante. En conjunto, esta información sugiere que la secuencia del contaminante es $\pm D5\text{D4-7}$ o $\pm D-5\text{D4-7}$.

La asignación para AT-10 y el contaminante se confirmó cuando el deca-sacárido se degradó incompletamente con ácido nitroso (Figura 4). Se observa claramente AT-10 con una anhidromanosa en el extremo reductor (masa de 2673,0) así como fragmentos resultantes de la escisión con ácido nitroso (masas de 2209,2, 2113,2 y 1633,2) de AT-10. Adicionalmente, puede obtenerse únicamente una especie con masa 1057,9 a partir de $\Delta\text{U}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{I}_{2\text{S}}\text{Man}_{6\text{S}}$, proporcionando una firma única de masa del extremo no reductor de AT-10. De forma importante, todas las especies podrían asignarse a AT-10 o al contaminante.

Interpretación del espectro de RMN de AT-10

El espectro de RMN de AT-10 se muestra en la Figura 6. Coherentemente con el análisis de los autores de la invención, las señales pequeñas de α H-1, α H-2 y α H-3 de $H_{NS,3S,6S}$ (a 5,45, 3,45 y 4,50 ppm, respectivamente) permiten asignar la unidad del monosacárido del extremo reductor como $H_{NS,3S,6S}$. En este caso, el protón anomérico de resto $H_{NS,3S,6S}$ del extremo reductor tiene que dividirse en configuraciones α y β . La configuración α del protón anomérico del resto H_{NS} es dominante (~95%) en los disolventes próticos, tales como óxido de deuterio, basándose en el efecto anomérico. Adicionalmente, pudo detectarse la presencia de dos restos I_{2S} . De forma interesante, las señales anoméricas de los dos I_{2S} , que resuenan usualmente alrededor de 5,20 ppm, estaban desplazadas. Esto es muy probablemente consecuencia de un cambio en la conformación del resto interno I_{2S} de 1C_4 a 2S_0 . Asimismo, pudo confirmarse que el oligosacárido contiene tres $H_{NS,6S}$ y un solo resto G no sulfatado basándose en los valores de integración de los protones H-2 de $H_{NS,6S}$ y los restos G observados a 3,28 y 3,38 ppm, respectivamente. La presencia de una sola señal N-acetil-metilo del resto $H_{NAC,6S}$ a 2,1 ppm demuestra claramente que el oligosacárido contiene un solo resto $H_{NAC,6S}$. La presencia de señales correspondientes a los protones H-6 de los restos H_{NY} sulfatados en 6-O (Y = Ac o S) aproximadamente a 4,3 y 3,9 ppm, confirma que todos los restos H_{NY} del oligosacárido están O-sulfatados en C-6. En conjunto, estos datos permiten la asignación de secuencia de la especie principal en la muestra de AT-10 como $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$.

Sumario

Se ha demostrado en este ejemplo que pueden utilizarse varias técnicas analíticas rigurosas para converger en la estructura de un oligosacárido de HLGAG complejo. Adicionalmente, se demostró que la asignación de secuencias utilizando los dos procedimientos de secuenciación, a saber, IGS y PEN-MALDI, es la misma. Esto es sumamente evidente en el tratamiento parcial y exhaustivo del deca-sacárido con ácido nitroso (Figura 3). De forma importante, de nuestro análisis se hace ahora posible asignar las secuencias siguientes a los deca, octa, hexa, y tetrasacáridos observados por la electroforesis en gel y MALDI-MS, es decir, DDD4-7, DD4-7, D4-7, y un tetrasacárido 4-7 resistente al ácido nitroso. En el ejemplo que sigue, se exploraron las consecuencias funcionales de un sitio de unión a AT-III parcialmente intacto y la acción enzimática de las heparinasas frente al sitio de unión a AT-III.

Adicionalmente, se demostró que el enfoque de PEN-MALDI es suficientemente sensible y discriminador para permitir a los autores de la invención determinar la información de secuencia para una mezcla de oligosacáridos. Es esencial subrayar el hecho de que la convergencia a una solución única para AT-10 utilizando PEN-MALDI es posible utilizando restricciones experimentales ortogonales múltiples (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) Science 286, 537-42), minimizando así la dependencia de una sola restricción experimental, por ejemplo la escisión con ácido nitroso. Finalmente, el ejemplo presentado ilustra el valor de PEN-MALDI para obtener información definitiva de secuencia para oligosacáridos biológica y farmacológicamente relevantes.

Ejemplo 2: Escisión del sitio de unión a antitrombina III en la heparina por las heparinasas, y su implicación en la generación de heparina de peso molecular bajo

Introducción:

La heparina ha sido utilizada como anticoagulante clínico durante más de 50 años, lo que la convierte en uno de los agentes farmacológicos más eficaces conocidos. Gran parte de la actividad de la heparina puede atribuirse a su capacidad para unirse a la antitrombina III (AT-III). La heparina de peso molecular bajo (LMWH), derivada de heparina por su ruptura controlada, mantiene gran parte de la actividad antitrombótica de la heparina sin muchos de sus graves efectos secundarios. La significación clínica de LMWH ha puesto de manifiesto la necesidad de comprender y desarrollar medios químicos o enzimáticos para generarla. Las herramientas enzimáticas principales utilizadas para la producción de heparina de peso molecular bajo son las heparinasas de *Flavobacterium heparinum*, específicamente las heparinasas I y II. Utilizando compuestos modelo pentasacáridos y hexasacáridos, se ha demostrado que las heparinasas I y II, pero no la heparinasa III, escinden el sitio de unión a AT-III. Adicionalmente, se demuestra en esta memoria que la sulfatación en 3-O de la glucosamina en el extremo reductor de un enlace glicosídico imparte resistencia a la escisión por las heparinasas I, II y III. Finalmente, se examinan las consecuencias biológicas y farmacológicas de un oligosacárido de heparina. Se demuestra que un oligosacárido de este tipo carece de algunos de los atributos funcionales de HLGAG que contienen un sitio de AT-III intacto.

Métodos:

Materiales. Penta 1 y 2 fue un obsequio generoso del Dr. Robert Rosenberg, Department of Biology, MIT. Se generó Hexa 1 utilizando digestión de heparina con heparinasa I (Ernst, S., Langer, R., Cooney, C. L. y Sasisekharan, R. (1995) Crit Rev Biochem Mol Biol 30, 387-444). La heparina se adquirió de Celsus Laboratories (Cincinnati, OH), y se calcularon las concentraciones molares de los lotes basándose en un peso molecular medio de 13.000 Da. La enoxaparina se adquirió de Avantis Pharmaceuticals, (Chicago, IL).

Digestiones. Se completaron las digestiones con heparinasa I como se ha descrito (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) Science 286, 537-42 y Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y

Biemann, K. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 4176-81). Las reacciones con heparinasa II o III se completaron esencialmente del mismo modo a la temperatura ambiente en ovalbúmina 10 μ M, sulfato de dextrano 1 μ M, y etilendiamina 10 mM, pH 7,0. Las digestiones cortas se completaron con enzima 50 nM durante 10 minutos, mientras que las digestiones exhaustivas se completaron con enzima 200 nM durante una noche. Los espectros de masas se recogieron utilizando los parámetros arriba indicados (véase también Shriver, Z., Raman, R., Venkataraman, G., Drummond, K., Turnbull, J., Toida, T., Linhardt, R., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 2000 Sep 12; 97(19):10359-64), y se calibraron externamente utilizando señales para (RG)₁₉R protonado y su complejo con un hexasacárido derivado con ácido nitroso de la secuencia I₂S₁H_{NS,6S} I₂S₁H_{NS,6S} I₂S₁Man_{6S}.

Experimentos de titulación por fluorescencia en equilibrio. Las titulaciones de AT-III humana con el decaacárido AT-10 o heparina se completaron a 25°C utilizando una máquina Fluorolog 2 (Spex Instruments) (Meagher, J. L., Beechem, J. M., Olson, S. T. y Gettins, P. G. (1998) J Biol Chem 273, 23283-9 y Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. y Olson, S. T. (1998) J Biol Chem 273, 7478-87). Las medidas se completaron en fosfato de sodio 20 mM, que contenía EDTA 0,1 mM y 0,1% de PEG 8.000, ajustado a pH 7,4 o 6,0. Con el tampón de pH 7,4, se añadió cloruro de sodio a una concentración final de 100 mM.

Los espectros de emisión por fluorescencia se recogieron desde 300 a 400 nm con una longitud de onda de excitación de 280 nm y un tiempo de integración de 5 s. Resumidamente, los experimentos de titulación se condujeron como sigue - se añadieron partes alícuotas de decaacárido o heparina a una disolución 1 μ M de AT-III, se dejó que la disolución alcanzara el equilibrio durante un minuto, y se recogió un espectro de emisión. Se añadieron partes alícuotas sucesivas de sacárido y se ajustó la señal de fluorescencia para dar cuenta de la dilución de la proteína.

Medidas biológicas de la actividad de decaacárido. La actividad anticoagulante *in vitro* se determinó como se ha descrito previamente (Hoppensteadt, D. A., Jeske, W. P., Walenga, J. M., Fu, K., Yang, L. H., Ing, T. S., Herbert, J. M. y Fareed, J. (1999) Thromb Res 96, 115-24 y Dietrich, C. P., Paiva, J. F., Castro, R. A., Chavante, S. F., Jeske, W., Fareed, J., Gorin, P. A., Mendes, A. y Nader, H. B. (1999) Biochim Biophys Acta 1428, 273-83), de acuerdo con la farmacopea de los Estados Unidos de América. Los ensayos de inhibición de la generación de trombina (FIIA) y factor Xa (FXa) se completaron esencialmente como se ha descrito. De manera resumida, el decaacárido AT-10, Enoxaparina LMWH o el pentasacárido sintético de unión a AT-III (Penta 1) utilizado en este estudio se disolvió en disolución salina estéril a las concentraciones designadas. Se añadió a esta muestra un volumen igual de plasma deficiente en fibrinógeno, diluido en relación 1:8 en Tris-HCl 100 mM (pH 8,5). En una muestra separada, se añadió la misma concentración de oligosacárido de heparina y actina en una relación 1:1 a Spectrozyme TH o FXa. De esta manera, se midió la generación intrínseca de IIa y Xa. Adicionalmente, para justificar la inhibición de la trombina y la generación extrínseca de FXa, se diluyó tromboplastina C en relación 1:6 con Spectrozyme TH o FXa. Para todas las muestras, la densidad óptica se midió a 405 nm y los resultados se expresan como % de inhibición comparada con un control de disolución salina sin suplemento. Para estos ensayos, el reactivo trombina (Fibrindex) se obtuvo de Ortho Diagnostic Systems, Inc. (Raritan, NJ), y el factor Xa se obtuvo de Enzyme Research (South Bend, IN). Spectrozyme TH y FXa se obtuvieron de American Diagnostica (Greenwich, CT).

Se utilizaron también datos de sangre completa para determinar la actividad anticoagulante de AT-10. Los ensayos de tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT) y tiempo de protrombina (PT) se condujeron de manera similar a como se ha dado a conocer previamente (Dietrich, C. P., Paiva, J. F., Castro, R. A., Chavante, S. F., Jeske, W., Fareed, J., Gorin, P. A., Mendes, A. y Nader, H. B. (1999) Biochim Biophys Acta 1428, 273-83). El reactivo APTT se obtuvo de Organon Teknika (Durham, NC), y el reactivo HepTest se obtuvo de Haemachem (St. Louis, MO).

Resultados:

Acción enzimática de las heparinasas frente al sitio de unión a AT-III: Previamente, se investigó la especificidad por el sustrato de las heparinasas I y II frente a AT-10 (Rhomborg, A. J., Shriver, Z., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) Proc Natl Acad Sci U S A 95, 12232-7 y Ernst, S., Rhomborg, A. J., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95,4182-7). Estos estudios, sin embargo, se llevaron a cabo suponiendo una estructura publicada (Toida, T., Hileman, R. E., Smith, A. E., Vlahova, P. I. y Linhardt, R. J. (1996) J Biol Chem 271, 32040-7). Teniendo en cuenta la estructura recientemente determinada de AT-10 descrita en esta memoria (véase también Shriver, Z., Raman, R., Venkataraman, G., Drummond, K., Turnbull, J., Toida, T., Linhardt, R., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 2000 Sep 12; 97(19):10359-64), se examinó de nuevo la acción enzimática de las heparinasas I, II y III frente a los oligosacáridos que contienen un sulfato en posición 3-O que es importante para la unión a AT-III con afinidad alta. Para estos estudios, se utilizaron tres oligosacáridos, dos pentasacáridos (Penta 1 y Penta 2, Figura 5) y un hexasacárido (Hexa 1, Figura 5). Debe observarse el hecho de que los pentasacáridos se derivan por síntesis, mientras que Hexa 1 se deriva por tratamiento de heparina con heparinasa I. Como resultado, al contrario que Penta 1 o Penta 2, Hexa 1 contiene un ácido $\Delta^{4,5}$ -urónico en el extremo no reductor. Adicionalmente, Penta 1 y Penta 2 difieren uno de otro únicamente por la presencia (Penta 1) o ausencia (Penta 2) de un sulfato en posición 3-O en el resto glucosamina interno (Figura 5). La estrategia empleada en esta memoria implica esencialmente tratamiento de cada uno de los sacáridos con heparinasa I, II o III, respectivamente, en condiciones de digestión exhaustivas, seguido de la identificación de los productos resultantes

por espectrometría de masas. La masa calculada de los sustratos sacáridos y los productos, su identidad, y la masa observada se enumeran en la Tabla 4.

Tabla 4: Estructuras químicas y valores m/z de los oligosacáridos de HLGAG

(M+H) ⁺ del complejo	Sacárido (masa)	Estructura química	Masa (calculada)
5842,0	1615,2	$\Delta U_{2S}H_{NS[RS14],6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$	1614,3
5735,1	1508,3	$H_{NS[RS15],6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$	1508,2
5655,1	1428,3	$H_{NS[RS16],6S}GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$	1428,1
5316,3	1089,5	$\Delta UH_{NS[RS17],6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$	1088,9
5266,3, 5264,2	1036,5, 1036,1	$\Delta UH_{NAC[RS18],6S}GH_{NS,3S,6S}$	1036,9
5064,1	837,3	<u>$H_{NS,6S}GH_{NS,6S}$</u>	<u>836,7</u>
5143,4, 5144,0	916,7, 917,3	$H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$	916,8
4818,0, 4818,0, 4818,7, 4818,7	591,3, 591,3, 591,9, 592,0	$\Delta U_{2S}H_{NS[RS19],6S,OMe}$	591,5
4807,2, 4805,9	577,4, 577,8	$\Delta U_{2S}H_{NS[RS20],6S}$	577,5

- 5 En la columna 1 de la tabla 4 se muestra el valor m/z del complejo protonado 1:1 del sacárido y el péptido básico (RG)₁₉R. La columna 2 muestra la masa observada del sacárido obtenido restando la masa del péptido básico protonado del complejo protonado 1:1. Las estructuras químicas de los sacáridos para los picos correspondientes en los espectros de masas se muestran en la columna 3. La columna 4 muestra las masas teóricas calculadas para las estructuras químicas. Obsérvese que la masa observada está comprendida dentro de ± 1 Da de la masa calculada.
- 10 En el caso de Penta 1, únicamente las heparinasas I y II, pero no la heparinasa III, escinden el oligosacárido en un trisacárido pentasulfatado de masa 916,7 y un disacárido trisulfatado de masa 591,3 (Figura 6), lo que es indicativo de la escisión en el enlace glicosídico que contiene I_{2S} (enlace A.2 en la Figura 5). Los datos presentados en la Figura 6 muestran que los enlaces que contienen 3-O son resistentes a la escisión por heparinasa I, II o III. Esta resistencia parece ser independiente de la longitud. Sobre la base de la comprensión previa de la estructura de AT-10 (Toida, T., Hileman, R. E., Smith, A. E., Vlahova, P. I. y Linhardt, R. J. (1996) J Biol Chem 271, 32040-7), se informó que la heparinasa II podría escindir un sacárido que contenga sulfato en posición 3-O con la condición de que tuviese la longitud suficiente (Rhomborg, A. J., Shriver, Z., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 12232-7). Teniendo en cuenta la estructura recién determinada para el deca-sacárido AT-10 (véase también Shriver, Z., Raman, R., Venkataraman, G., Drummond, K., Turnbull, J., Toida, T., Linhardt, R., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 2000 Sep 12; 97(19):10359-64), así como los datos presentados en la Figura 6, tienen que reinterpretarse los hallazgos previos, y en esta memoria se llega a la conclusión de que la heparinasa II no escinde los enlaces con una glucosamina sulfatada en la posición 3-O próxima al extremo reductor. Adicionalmente, la resistencia de este enlace a la acción de las heparinasas I, II y III es debida totalmente a la presencia de un sulfato en posición 3-O como se muestra por el tratamiento con heparinasa I, II y III de Penta 2 (Figura 7). En este caso, todas las heparinasas escinden eficientemente el sustrato. Como en el caso de Penta 1, la heparinasa I escinde en el enlace que contiene I_{2S}, produciendo un trisacárido de masa 837,3 y un disacárido de masa 591,9 (escisión en el enlace B.2 en la Figura 5). Inversamente, tanto heparinasa II como heparinasa III escinden en el enlace no sulfatado que contiene G, escindible fácilmente ahora (enlace B.1 en la Figura 5). La heparinasa III escinde únicamente este enlace, dando un tetrasacárido de masa 1428,3 y un monosacárido (no observado). La heparinasa II escinde en los enlaces B.2 y B.1, reduciendo Penta 2 a un monosacárido y dos disacáridos, uno de los cuales se observa y tiene una masa de 592,0 (Figura 7).

Para explorar adicionalmente la especificidad por el sustrato de las heparinasas hacia los sacáridos sulfatados en 3-O, se utilizó Hexa 1, un hexasacárido derivado de heparinasa I que contiene sulfato en posición 3-O (Figura 8). Se seleccionó también Hexa 1 como sustrato para este estudio debido a que representa un truncamiento en el extremo no reductor de AT-10 y contiene el mismo resto GH_{NS,3S,6S} en el extremo reductor. Se encontró que Hexa 1 es sensible a la escisión por las heparinasas II y III, pero no a la escisión por la heparinasa I. Debe observarse que la escisión de Hexa 1 por heparinasa II o III no tiene lugar en el enlace que contiene G sino más bien en el enlace que contiene I (escisión en C.1 pero no en C.2 en la Figura 5). En el caso de la escisión por heparinasa II, los productos son un tetrasacárido de masa 1036,5 y un disacárido de masa 577,4. Para la escisión con heparinasa III, se observan los mismos productos, es decir, un tetrasacárido de masa 1036,1 y un disacárido de masa 577,8. Estos resultados confirman la opinión de los autores de la invención de que los enlaces con un sulfato en 3-O próximo al extremo reductor están protegidos contra la acción de las heparinasas, incluyendo la heparinasa II. Con el tratamiento de Hexa 1 tanto por heparinasa II como por heparinasa III, se forma un tetrasacárido resistente a las

heparinasas, con la secuencia $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$. El hecho de que este tetrasacárido es resistente a la escisión ulterior con heparinasa es coherente con observaciones previas (Yamada, S., Yoshida, K., Sugiura, M., Sugahara, K., Khoo, K. H., Morris, H. R. y Dell, A. (1993) *J Biol Chem* 268,4780-7). Coherentemente también con la especificidad por el sustrato conocida de la heparinasa I, Hexa 1, que no contiene enlaces $\text{I}_{2\text{S}}$, no es escindido por esta enzima.

A la vista de estos estudios, es evidente ahora que las heparinasas I y II pueden escindir el sitio de AT-III en el enlace $\text{H}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}$, en el que el enlace fácilmente escindible se designa con una flecha (A.2 de Penta 1 y B.2 de Penta 2, Figura 5). Adicionalmente, con la estructura de nueva asignación para AT-10, se encuentra que los enlaces con un sulfato en posición 3-O en la glucosamina del extremo reductor, a saber, $\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, no son escindibles por las heparinasas II o III (A.1 de Penta 1 y B.1 de Penta 2, Figura 5). Adicionalmente, se encuentra que esta inhibición es debida enteramente a la modificación inusual de sulfato en posición 3-O. Finalmente, considerado junto con los estudios previos de los autores de la invención de la acción enzimática de la heparinasa I, la estructura de AT-10 refuerza el hecho de que la heparinasa I actúa de una manera exolítica y progresiva sobre los oligosacáridos de heparina/heparano (Ernst, S., Rhomberg, A. J., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4182-7).

Unión de AT-III al decaesacárido AT-10: El análisis de la secuencia de AT-10 de los autores de la invención comunicado en esta memoria y en Shriver, Z., Raman, R., Venkataraman, G., Drummond, K., Turnbull, J., Toida, T., Linhardt, R., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000 Sep 12; 97(19):10359-64 reveló que este decaesacárido no contiene una secuencia de pentasacárido de unión a AT-III intacta sino que contiene en su lugar únicamente la unidad de trisacárido del extremo no reductor. Los autores de la invención trataron de extender esta asignación de secuencia y proporcionar un contexto funcional a este resultado midiendo la afinidad de unión a AT-III de AT-10. A pH 7,4, $I = 0,15$, AT-10 tiene muy poca afinidad por AT-III (Figura 9). Inversamente, en las mismas condiciones, la heparina de la mucosa intestinal porcina se unía a AT-III con un valor K_D aparente de 36 nM. Para medir exactamente la afinidad de AT-10 por AT-III, se completó la titulación en su lugar a pH 6,2, condiciones que se sabe favorecen la unión de AT-III a los sacáridos. En estas condiciones, AT-10 se unió AT-III con un valor K_D aparente de 0,8 μM , mientras que el valor K_D para la heparina de longitud total disminuyó hasta 10 nM. EL valor K_D medido para AT-10 es comparable con sacáridos similares que tienen un extremo reductor truncado, con valores K_D medidos de 0,3-2 μM (Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. y Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). Así pues, los resultados de los experimentos de titulación son coherentes con que AT-10 contenga una secuencia de unión del pentasacárido a AT-III parcialmente intacta (Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. y Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). Las tres unidades de sacárido en el extremo no reductor de la secuencia del pentasacárido, a saber, $\text{H}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, son fundamentalmente responsables de la unión del estado nativo de AT-III, mientras que la unidad de disacárido del extremo reductor, $\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}$, que está ausente en AT-10, es importante para la unión de la AT-III activa, alterada conformacionalmente. El valor K_D medido para AT-10 (0,8 μM a pH 6,0, $I = 0,05$) es ~ 100 veces mayor que el de la heparina de longitud total, lo que confirma que AT-10 no contiene una secuencia de pentasacárido de AT-III intacta. La disminución en la afinidad de AT-III observada por AT-10 no puede deberse simplemente a una cuestión de tamaño dado que, en estudios previos, se ha demostrado que el pentasacárido sólo tiene una afinidad similar a la de la heparina de longitud total (Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. y Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). Una vez medida la interacción de unión entre AT-III y el decaesacárido, se trató a continuación de definir las consecuencias funcionales de un oligosacárido de HLGAG que contenga únicamente un sitio de unión parcial a AT-III.

Actividad biológica de AT-10: Como podría esperarse para un oligosacárido que no contiene un sitio de AT-III intacto, la actividad biológica de AT-10 es menor que la de la enoxaparina (utilizada aquí como ejemplo de una LMWH) o la del pentasacárido, Penta 1 (Figura 10). Coherentemente con el mecanismo conocido de inhibición mediada por la heparina de la actividad de trombina por AT-III, ni el decaesacárido ni el pentasacárido tienen actividad anti-IIa importante (Figura 10a). En el caso del pentasacárido, esta falta de actividad es debida enteramente a que su tamaño es insuficiente para actuar como molde para la formación de un complejo de AT-III/IIa. Para el decaesacárido, esta restricción de tamaño es también una explicación probable (dado que estudios bioquímicos rigurosos han implicado que oligosacáridos con al menos 18 unidades de monosacárido son importantes para la formación eficiente del complejo) (Petitou, M., Herault, J. P., Bernat, A., Driguez, P. A., Duchaussoy, P., Lormeau, J. C. y Herbert, J. M. (1999) *Nature* 398, 417-22), aunque la falta de un sitio de AT-III intacto puede contribuir también a su reducida actividad anti-IIa.

Estos resultados se confirman y amplían examinando la actividad anti-Xa de los tres utilizando factor Xa de suero (Figura 10b) o factor Xa purificado (Figura 10c). Como se ha expuesto anteriormente, la inhibición del factor Xa por AT-III requiere unión del motivo pentasacárido sólo concomitante con un cambio conformacional en AT-III. En el ensayo anti-Xa, tanto enoxaparina como el pentasacárido tienen actividad notablemente mayor que el decaesacárido. Los valores de CI_{50} de enoxaparina y el pentasacárido sintético son 66 nM y 39 nM, respectivamente, mientras que el de AT-10 es diez veces mayor a 280 nM. Estos valores son coherentes con la menor afinidad de AT-10 por AT-III en comparación con heparina, que se determinó en los experimentos de titulación por fluorescencia de AT-III (Figura 9). Que el decaesacárido posee actividad anti-Xa no es sorprendente, dado que la unidad del trisacárido no reductor (presente en el decaesacárido) es fundamentalmente responsable de la unión inicial de heparina a AT-III. Se espera que la unidad de disacárido del extremo reductor, es decir, $\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}$ (ausente en AT-10) se una a la antitrombina III

alterada conformacionalmente, estabilizándola. Las medidas de HepTest (Figura 10d) proporcionan resultados similares, a saber, que enoxaparina y el pentasacárido tienen actividad significativamente mayor que el decaesacárido AT-10. Consideradas como un todo, las actividades anti-IIa y anti-Xa del decaesacárido comparado con el pentasacárido y la enoxaparina están satisfactoriamente de acuerdo con los experimentos de titulación de AT-III así como con la farmacología conocida del mecanismo de la heparina de la inhibición de la cascada de coagulación.

En resumen, se demuestra en este ejemplo que las heparinasas I y II escinden el sitio de unión a AT-III dejando atrás la unidad de trisacárido en el extremo reductor del oligosacárido. Se demuestra también que la heparinasa III no escinde el sitio de AT-III debido a la presencia de un sulfato en posición 3-O en el resto glucosamina interno. Así pues, la utilización de las heparinasas I o II para la generación de LMWHs requiere precauciones extremas para asegurar la retención de los sitios de antitrombina III intactos en los fragmentos de LMWH. De hecho, los resultados presentados en esta memoria demuestran que las heparinasas I o II pueden ser agentes ideales para la neutralización de dosis farmacológicas de heparina.

Ejemplo 3: Desarrollo de un método de análisis de la composición, y caracterización estructural de las heparinas:

Introducción:

Para purificar UFH e identificar sus componentes, se digirió exhaustivamente UGH y se analizó utilizando electroforesis capilar y espectrometría de masas MALDI. La electroforesis capilar (CE) es un método muy sensible con elevado poder de resolución para el análisis de la composición de disacáridos de las heparinas. Se desarrolló un método de análisis de la composición (CAM) que utiliza CE para cuantificar los bloques de construcción de disacáridos de UFH y LMWH. Este método utiliza menos de un microgramo de heparina, es eficiente en tiempo (cada operación de CE tiene una duración de 25 minutos), es independiente de la concentración, y es sumamente reproducible. Una ventaja de este método es su eficacia como proceso de control de calidad que puede ayudar a minimizar la variación lote a lote en la composición de LMWH diferente.

Así pues, se ha utilizado CE en combinación con espectrometría de masas MALDI fuera de línea para identificar un tetrasacárido único en la digestión exhaustiva de UFH, y LMWH. Este tetrasacárido, que forma parte del dominio de pentasacárido de unión a AT-III de los glucosaminoglucanos, es resistente a la degradación ulterior con heparinasa I, II, o III. Se demuestra a continuación la utilización de este tetrasacárido único en la medida directa de la actividad anticoagulante mediada por anti-factor Xa de la heparina.

Métodos

Productos químicos y materiales: UFH se adquirió de Celsus Laboratories (Cincinnati, OH), y se calcularon las concentraciones molares de los lotes sobre la base de un peso molecular medio de 13.000 Da. Los estándares de disacáridos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las heparinasas I y III son heparinasas recombinantes. La heparinasa II procede de *Flavobacterium heparinum*, purificada como se ha descrito previamente. (Shriver et al. Journal of Biological Chemistry 1998,273,22904-22912.).

Análisis de la composición: UFH se sometió a despolimerización exhaustiva con un cóctel de enzimas que consiste en Heparinasa I, Heparinasa II, y Heparinasa III. Se digirieron 9 µl de UFH de concentración 10 µg/µl en H₂O con 1 µl de cóctel de enzimas que consiste en 100 nM de cada una de heparinasa I, II, y III en acetato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 100 mM, tampón de acetato de calcio 5 mM, pH 7,0 durante 12 h a 37°C. La muestra para CE se preparó diluyendo 1 µl de la digestión con 9 µl de H₂O. Las muestras se analizaron por CE en polaridad invertida con un tampón de pasada de tris/fosfato 50 mM, sulfato de dextrano 10 µM, pH 2,5. Se inyectaron 57 nl de cada muestra en la CE, y los tiempos de ejecución fueron de 25 minutos. Cada muestra se digirió por duplicado, y el experimento se repitió dos veces para cada muestra, dando como resultado cuatro lecturas por muestra. Se recogieron la totalidad de los 8 picos resultantes, y la pureza de las muestras recogidas se comprobó reinyectando en CE, midiéndose sus masas por espectrometría de masas MALDI fuera de línea. La identidad de los picos 1-7 se confirmó ulteriormente haciendo coincidir sus tiempos de migración con el de los disacáridos estándar comercialmente disponibles. Por ejemplo, el espectro de CE del pico 1 se recogió del análisis de CE de la digestión enzimática total de UFH y se generó un espectro de masas MALDI del pico 1. Los espectros de masas se recogieron utilizando parámetros como los reseñados previamente, y se calibraron externamente utilizando señales para (RG)₁₉R protonado y su complejo con un hexasacárido derivado de ácido nitroso de la secuencia I₂S_{HNS,6S} I₂S_{HNS,6S} I₂S_{Man6S}.

Resultados

Como se observa en la Figura 11A, se ven ocho picos en el espectro de CE. Cada uno de los picos etiquetados 1 a 8 tiene un tiempo de migración idéntico en las diferentes muestras. Después de la recogida de cada pico y la comparación de la pureza de cada muestra reinyectando en CE, se midió su masa por espectrometría de masas MALDI fuera de línea. El pico 1 tiene la misma masa que el disacárido de heparina trisulfatado ΔU_{2S,HNS,6S}. El ΔU_{2S,HNS,6S} comercial de Sigma tiene el mismo tiempo de migración que el pico 1 en condiciones de CE idénticas. Esto identifica el pico 1 como ΔU_{2S,HNS,6S}. De manera similar, se establecieron las identidades de los siete picos de 2 a 7 en la digestión de análisis de la composición de UFH. Los resultados se muestran las Figuras 3A y 3B - 6A y 6B.

La identidad de cada pico se confirmó ulteriormente haciendo coincidir su tiempo de migración con el de disacáridos estándar comercialmente disponibles. Los picos 2, 3, y 4 son disacáridos disulfatados, y los picos 5, 6 y 7 son disacáridos monosulfatados.

5 Se generó una traza de la CE y del espectro de masas MALDI del pico 2. Este pico tiene la misma masa que $\Delta U_{2S,HNS}$. Asimismo, el $\Delta U_{2S,HNS}$ comercial de Sigma tiene el mismo tiempo de migración que el pico 2 en condiciones de CE idénticas. Esto confirma que el pico 2 es $\Delta U_{2S,HNS}$.

Se generó una traza de la CE y del espectro de masas MALDI del pico 3. Dicho pico tiene la misma masa que $\Delta U_{HNS,6S}$. Asimismo, el $\Delta U_{HNS,6S}$ comercial de Sigma tiene el mismo tiempo de migración que el pico 3 en condiciones de CE idénticas. Esto confirma que el pico 3 es $\Delta U_{HNS,6S}$.

10 Se generó una traza de la CE del pico 5. Tiene la misma masa que ΔU_{HNS} . Asimismo, el ΔU_{HNS} comercial de Sigma tiene el mismo tiempo de migración que el pico 5 en condiciones de CE idénticas. Esto confirma que el pico 5 es ΔU_{HNS} .

15 Se generó una traza de la CE del pico 6. Tiene la misma masa que $\Delta U_{2S,HNAC}$. Asimismo, el $\Delta U_{2S,HNAC}$ comercial de Sigma tiene el mismo tiempo de migración que el pico 6 en condiciones de CE idénticas. Esto confirma que el pico 6 es $\Delta U_{2S,HNAC}$.

Se generó una traza de la CE del pico 7. Tiene la misma masa que $\Delta U_{HNAC,6S}$. Asimismo, el $\Delta U_{HNAC,6S}$ comercial de Sigma tiene el mismo tiempo de migración que el pico 7 en condiciones de CE idénticas. Esto confirma que el pico 7 es $\Delta U_{HNAC,6S}$.

20 Además de los siete disacáridos, se identificó también un tetrasacárido (pico 8) en la digestión exhaustiva de heparina con heparinasa I, II, y III. Se aisló este tetrasacárido, y se determinó su masa por espectrometría de masas MALDI. Tenía el mismo tiempo de migración en CE que el tetrasacárido $\Delta U_{HNAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ que formaba parte del deca-sacárido $\Delta U_{2S,HNS,6S}I_{2S,HNS,6S}I_{2S,HNS,6S}I_{HNAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, cuya estructura se determinó previamente. Esto condujo a la confirmación del pico 8 como el tetrasacárido $\Delta U_{HNAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Este pico es resistente a la degradación ulterior con las heparinasas I, II, o III.

25 Además de los picos 1-8, había una pequeña cantidad de disacáridos no sulfatados que migraban de modo mucho más lento que los sacáridos sulfatados, como se muestra en la Figura 11B. Se estima que los disacáridos no sulfatados constituyen <2% de UFH como se muestra en la tabla 5 (más adelante).

30 La Figura 12 muestra la traza de CE de la digestión exhaustiva del pentasacárido de AT-10 $\Delta U_{2S,HNS,6S} \Delta U_{2S,HNS,6S} \Delta U_{2S,HNS,6S} I_{HNAC,6S} GH_{NS,3S,6S}$. El tetrasacárido 8 en la digestión exhaustiva de la heparina tiene la misma masa, y el mismo tiempo de migración que $\Delta U_{HNAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Esto confirma el pico 8 como $\Delta U_{HNAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$.

Ejemplo 4: Respuesta a UV de los disacáridos 1-7

Introducción

35 Se determinó el factor de respuesta (RF) a UV de cada uno de los disacáridos (1-7) para identificar ulteriormente los componentes de los disacáridos procedentes de la digestión exhaustiva. El RF para un disacárido se define como la cantidad de dicho disacárido en ng que proporciona la misma respuesta que un ng de $\Delta U_{2S,HNS,6S}$.

Métodos

Determinación del factor de respuesta: Se calculó RF para los diferentes disacáridos midiendo la respuesta a UV de 57 ng de cada disacárido y normalizándolo con el de $\Delta U_{2S,HNS,6S}$ como se muestra en la tabla 5.

Resultados

40 Cada uno de los siete disacáridos (1-7) tiene un grado diferente de respuesta a UV a A_{232} . Se disponía de una cantidad insuficiente del tetrasacárido 8 ($\Delta U_{HNAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$) para permitir la medida de la absorbancia de UV a A_{232} para este tetrasacárido. Es de esperar que los tetrasacáridos tengan menor absorbancia de UV a A_{232} que los disacáridos, y por tanto se ha supuesto que $\Delta U_{HNAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ tiene la misma respuesta que el menos sensible de los disacáridos, a saber, 1 ($\Delta U_{2S,HNS,6S}$).

45

Tabla 5

Compuesto	Respuesta por 57 ng de disacáridos	Factor de respuesta (RF)
1 ($\Delta U_{2S}, H_{NS,6S}$)	10421,1	1
2 ($\Delta U_{2S}, H_{NS}$)	13551,45	0,769
3 ($\Delta U_{HNS,6S}$)	14595,3	0,714
4 ($\Delta U_{2S}, H_{NAC,6S}$)	13551,45	0,769
5 ($\Delta U, H_{NS}$)	23956,35	0,435
6 ($\Delta U_{2S}, H_{NAC}$)	32363,55	0,322
7 ($\Delta U, H_{NAC,6S}$)	22903,35	0,455
8 ($\Delta U_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$)	10421,1 (suposición)	1

En la tabla 5, se calculó el factor de respuesta (RF) para los picos 1-8. La segunda columna da la absorbancia UV a 232 nm para la inyección de 57 nl de concentración 1 ng/nl, es decir, 57 ng de los disacáridos (1-7) comerciales estándar. No pudo medirse la absorbancia UV a 232 nm para la concentración conocida de 8 por falta de disponibilidad de muestra en cantidad suficiente. Se supone que 8 tiene la misma respuesta que la del menos sensible de los 7 disacáridos, a saber, 1. La tercera columna da el RF para cada uno de los siete picos, definiéndose el RF para un disacárido como la fracción de un ng del mismo que proporciona la misma respuesta que un ng de 1 ($\Delta U_{2S}, H_{NS,6S}$).

5 Ejemplo 5: Determinación de los sacáridos no sulfatados en la heparina

Introducción

Aunque la heparina se ha clasificado como un glucosaminoglucano sulfatado, contiene una cantidad menor de sacáridos no sulfatados. Se llevaron a cabo procedimientos para determinar la cantidad de sacáridos no sulfatados en la heparina. Después de esta determinación, puede utilizarse el valor RF calculado para los picos 1-8 para estimar el % en peso de los bloques de construcción sulfatados de heparina a partir de la AUC medida por CE.

Métodos

Un peso conocido de heparina sometida a digestión exhaustiva con el cóctel de enzimas se inyectó en la CE. El área bajo la curva (AUC) medida para los picos 1-8 en la figura 11 se convierte en el peso de sacáridos sulfatados utilizando la respuesta para cantidades conocidas de los picos 1-8. La diferencia entre la cantidad total de sacáridos de heparina inyectada en la CE, y la cantidad total de disacáridos y tetrasacáridos sulfatados, da la cantidad de sacáridos no sulfatados en la digestión completa de UFH. Multiplicando el % de AUC relativo por el RF se obtiene la concentración relativa corregida o el % de AUC relativo de los picos 1-8 en términos de $\Delta U_{2S}, H_{NS,6S}$.

Resultados

La tabla 6 muestra la estimación de los sacáridos no sulfatados en la heparina. Como se muestra en la tabla 6, se determinó que los sacáridos no sulfatados constituyen menos del 2% de la heparina. Los sacáridos no sulfatados no se tienen en cuenta en la construcción de la tabla de análisis de la composición de la heparina como se explica más adelante. La columna 1 de la tabla 7 da el valor de AUC medido para los picos 1-8. La columna 2 da el % relativo de

AUC. Multiplicando el % relativo de AUC por el RF se obtiene la concentración relativa corregida o el % relativo de AUC de los picos 1-8 en términos de $\Delta U_{2S, H_{NS, 6S}}$. Éstos se normalizan luego para obtener el % en peso de los picos de disacáridos 1-7 y el pico de tetrasacárido 8. Como se demuestra en esta memoria, la construcción de esta tabla de análisis de composición es independiente de la concentración o del peso de la digestión de heparina analizado por la CE.

Tabla 6

Compuesto	AUC	Respuesta por 57 ng de muestra	Cantidad de sacárido en ng
1 ($\Delta U_{2S, H_{NS, 6S}}$)	7294,5	10421,1	39,9
2 ($\Delta U_{2S, H_{NS}}$)	1040,8	13551,45	4,4
3 ($\Delta U_{H_{NS, 6S}}$)	1437,9	14595,3	5,3
4 ($\Delta U_{2S, H_{NAC, 6S}}$)	379,3	13551,45	1,6
5 ($\Delta U, H_{NS}$)	685,1	23956,35	1,7
6 ($\Delta U_{2S, H_{NAC}}$)	502,9	32363,55	0,9
7 ($\Delta U, H_{NAC, 6S}$)	482,3	22903,35	1,1
8 ($\Delta U_{H_{NAC, 6S} GH_{NS, 3S, 6S}}$)	184,7	10421,1 (suposición)	1
Cantidad total de los sacáridos sulfatados de 1-8			55,9
Cantidad de sacáridos no sulfatados			57-55,9 = 1,1 ng (1,9%)

La tabla 6 muestra una estimación de la cantidad de sacáridos no sulfatados en la digestión exhaustiva de UFH con las heparinasas I, II, y III. Los picos 1-7 se muestran como disacáridos conocidos, como se explica en las Figuras 2-6. El pico 8 es el tetrasacárido $\Delta U_{H_{NAC, 6S} GH_{NS, 3S, 6S}}$ que es resistente a la degradación ulterior por las heparinasas I, II o III. La segunda columna da el área bajo la curva (AUC) medida para cada uno de los picos para una inyección de 57 nl de concentración 1 ng/nl de la digestión del análisis de composición de UFH. La tercera columna da la absorbancia UV a 232 nm para la inyección de 57 nl de concentración 1 ng/nl de cada uno de los 7 disacáridos comerciales estándar (1-7). La columna 4 da el peso de los diversos sacáridos sulfatados en ng. La diferencia entre su suma (55,9 ng) y la cantidad de heparina inyectada ($57 \times 1 = 57$ ng) da la cantidad de sacáridos no sulfatados presentes en la digestión del análisis de composición de UFH.

Ejemplo 6: Comprobación de la instrumentación y terminación de la digestión

Introducción

Para comprobar la reproducibilidad del instrumento y averiguar si la digestión del análisis de composición es realmente completa a las concentraciones de enzima utilizadas, se digirieron por duplicado muestras de UFH y se analizaron dos veces por CD. Los resultados se compararon entonces para determinar si existía variabilidad entre los experimentos.

Métodos

Se digirió UFH como se describe en el Ejemplo 1A, métodos con 1 μ l o 5 μ l de cóctel de enzimas (EC). Cada muestra se digirió por duplicado, y cada digestión se analizó dos veces por CE.

Resultados

- 5 La comparación del análisis duplicado de la misma muestra (UFH 1/1 con UFH 1/2, UFH 2/1 con UFH 2/2, y UFH 3/2 con UFH 3/2) indica que existe una reproducibilidad instrumental satisfactoria. La comparación de UFH 1/1 o UFH 1/2 con UFH 2/1 o UFH 2/2 demuestra que existe una variación mínima de experimento a experimento. La comparación de UFH digerida con 1 μ l de EC con UFH digerida con 5 μ l de EC ilustra que el aumento de la cantidad de enzima no cambia apreciablemente el perfil de disacáridos. Esto confirma que se consigue una digestión exhaustiva utilizando 1 μ l de EC como se muestra en la Figura 11. El análisis de composición de LMWH realizado por CE de acuerdo con el protocolo reseñado en la Figura 11 y la tabla 7 puede utilizarse para comparar rigurosamente diferentes lotes de LMWH.

Tabla 7

Compuesto	AUC	% Relativo de AUC	Factor de respuesta (RF)	Concentración relativa corregida	% en peso
1 ($\Delta U_{2S, H_{NS, 6S}}$)	7294,5	60,7	1	60,7	70,9
2 ($\Delta U_{2S, H_{NS}}$)	1040,8	8,7	0,769	6,7	7,8
3 ($\Delta U_{H_{NS, 6S}}$)	1437,9	12,0	0,714	8,6	10,0
4 ($\Delta U_{2S, H_{NAC, 6S}}$)	379,3	3,2	0,769	2,5	2,9
5 ($\Delta U, H_{NS}$)	685,1	5,7	0,435	2,5	2,9
6 ($\Delta U_{2S, H_{NAC}}$)	502,9	4,2	0,322	1,4	1,6
7 ($\Delta U, H_{NAC, 6S}$)	482,3	4,0	0,455	1,8	2,1
8 ($\Delta U_{H_{NAC, 6S} GH_{NS, 3S, S}}$)	184,7	1,5	1	1,5	1,8

- 15 La tabla 7 muestra los valores para el Análisis de la Composición para UFH. Se midió el área bajo la curva (AUC) para cada pico del espectro de CE de UFH digerida con el cóctel de enzimas como se muestra en la Figura 11. Se utilizó el factor de respuesta calculado para cada sacárido como se muestra en la tabla 6 para calcular su concentración relativa corregida en la digestión enzimática. La última columna da el porcentaje en peso de cada uno de los bloques de construcción de UFH. Los sacáridos no sulfatados, que constituyen <2% de UFH, no se tienen en cuenta en la construcción de esta tabla de análisis de composición. Como se demuestra en esta memoria, la construcción de esta tabla de análisis de composición mostrada por este método es independiente de la concentración o del peso de la digestión de heparina analizada por la CE.

Ejemplo 7: Determinación de la eficiencia de la acción anticoagulante anti-factor Xa de la heparina mediada por AT-III: Correlación entre $I_{H_{NAC, 6S} GH_{NS, 3S, 6S}}$ y la actividad anti-Xa

Introducción

- 25 La cuantificación del tetrasacárido $\Delta U_{H_{NAC, 6S} GH_{NS, 3S, 6S}}$ por CAM tiene un papel adicional en la estimación de la eficacia de la acción anticoagulante anti-factor Xa de la heparina mediada por AT-III. $\Delta U_{H_{NAC, 6S} GH_{NS, 3S, 6S}}$ forma

parte del pentasacárido de unión a AT-III. La cuantificación de $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ es una medida de la determinación de la cantidad de pentasacárido que se une a AT-III presente en la heparina, y por tanto ayuda a la medida directa de la anticoagulación mediada por el anti-factor Xa de la heparina que es dependiente del dominio del pentasacárido de unión a AT-III de la heparina.

5 Métodos

Se fraccionó UFH por tamaños mediante una columna de exclusión de tamaños P10. Se realizó el análisis de composición sobre las fracciones resultantes para estimar su contenido de $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Estas fracciones se ensayaron también respecto a su actividad anti-factor Xa.

Resultados

- 10 Una gráfica de actividad anti-factor Xa de diferentes fracciones en función de su $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ da como resultado una línea recta con $r = 0,91$, como se muestra en la Figura 11. Esto indica que la acción anticoagulante mediada por el anti-factor Xa de las heparinas puede medirse directamente por su contenido de $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Los datos se presentan también en la Tabla 8.

Tabla 8

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
	$\Delta U_{2S,H_{NS,6S}}$	$\Delta U_{2S,H_{NS}}$	$\Delta U_{H_{NS,6S}}$	$\Delta U_{2S,H_{NAC,6S}}$	$\Delta U_{H_{NS}}$	$\Delta U_{2S,H_{NAC}}$	$\Delta UH_{NAC,6S}$	$\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$
UFH 1/1 1 μ l EC	70,9	7,8	10,0	2,9	2,9	1,6	2,1	1,8
UFH 1/2 1 μ l EC	71,0	7,7	10,2	3,0	2,8	1,5	2,0	1,8
UFH 2/1 1 μ l EC	71,5	7,5	10,1	2,9	2,7	1,5	2,1	1,7
UFH 2/2 1 μ l EC	71,3	7,5	10,3	2,8	2,8	1,5	2,0	1,8
UFH 3/1 5 μ l EC	72,0	7,3	10,0	2,8	2,8	1,6	1,8	1,7
UFH 3/2 5 μ l EC	72,2	7,5	9,9	2,7	2,7	1,6	1,7	1,7

- 15 La tabla 8 muestra un análisis de composición de UFH realizado por CE de acuerdo con el protocolo reseñado en la Figura 11, y la tabla 7 puede utilizarse para comparar rigurosamente diferentes lotes de LMWH. Se digirió UFH con 1 μ l o 5 μ l de cóctel de enzimas (EC). Cada muestra se digirió por duplicado, y cada digestión se analizó por duplicado mediante CE. En todas las muestras, los picos de los sacáridos 1-8 tenían el mismo tiempo de migración. La comparación de los análisis duplicados de la misma muestra (UFH 1/1 con UFH 1/2, UFH 2/1 con UFH 2/2, y UFH 3/1 con UFH 3/2) demuestra que existe una reproducibilidad instrumental satisfactoria. La comparación de UFH 1/1 o UFH 1/2 con UFH 2/1 o UFH 2/2 demuestra que existe una variación mínima de experimento a experimento. La comparación de UFH digerida con 1 μ l de EC con UFH digerida con 5 μ l de EC ilustra que el aumento de la cantidad de enzima no cambia apreciablemente el perfil de disacáridos, lo que demuestra que se alcanza una digestión exhaustiva utilizando 1 μ l de EC como se representa en la Figura 11.

Ejemplo 8: Generación de fracciones de LMWH y caracterización de la actividad biológica

Métodos

Se prepararon las fracciones de LMWH MS 57-1 a MS 57-4 y MS 59-1 a MS 59-4 tratando UFH con 200 μ g de heparinasa III (como se ha descrito arriba) y haciendo pasar el producto resultante a través de una columna P10.

- 30 Se prepararon las fracciones de LMWH MS56-1 a MS56-4 tratando UFH con 1000 μ g de heparinasa III, y haciendo pasar el producto resultante a través de una columna P10.

Se generaron las fracciones de LMWH MS60-1 a MS60-3, y MS55-1 a MS55-4 tratando la Fracción 2 con 200 μ g de heparinasa III, y haciendo pasar el producto resultante a través de una columna P10.

Se prepararon las fracciones de LMWH MS66-1 y MS66-2 tratando la Fracción 2 con 1000 μ g de heparinasa III, y haciendo pasar el producto resultante a través de una columna P10.

La Fracción 1 es la heparina de peso molecular alto que se precipita por tratamiento de UFH con acetato de bario a la temperatura ambiente, como se describe en la referencia de Volpi arriba descrita.

Tabla 9 Generación de Heparina de MW/Carga/Propiedades biológicas seleccionadas

Método	Muestra	Peso. (mg)	MW medio	PD	anti-Xa UI/mg	anti-IIIa UI/mg	Xa/IIa	% en peso de 1	% en peso de 8	% en peso de 2	% en peso de 3	% en peso de 4	% en peso de 5	% en peso de 6	% en peso de 7
UFH, 200 µg HepIII, P10	Fracción 2	300	<8000		400,0	75	5,3	70,0	4,5	7,8	11,1	3,2	2,4	1,4	0
	Fracción 1	150	8000-14,000		106,6	54,5	2,0	87,2	0	9,0	1,6	0,4	1,8	0	0
	MS57-1	130	8743 ± 177	1,1	292,9	72,3	4,0	77,8	3,5	3,0	10,7	1,4	0,3	0,2	3,0
	MS57-2	140	6010 ± 138	1,1	186	33,33	5,6	75,5	3,5	4,0	10,7	1,6	0,5	0,4	3,8
	MS57-3	60	3000-5000		70,8	0		73,9	2,8	4,9	10,2	1,8	1,2	0,6	5,0
	MS57-4	10	<3000		42,6	0		73,9	1,5	4,4	10,0	13	2,0	0,9	0,4
	MS59-1	130	8800		255	29,2	8,7	73,1	4,3	5,8	11,5	2,5	0	0,5	2,4
	MS59-2	130	6500		255	54,5	4,7	77,8	3,8	3,2	10,3	1,3	0,4	0,3	3,4
UFH, 1000 µg HepIII, - P10	MS59-3	70	3000-5000		54	0		75,3	2,3	4,6	10,2	1,9	0,8	0,8	3,8
	MS59-4	30	< 3000		15	0		71,3	1,9	5,7	9,4	1,9	1,8	2,0	6,2
	MS56-1	60	9204 ± 192	1,2	261,4	50	5,2	78,8	4,7	3,3	9,3	1,7	0,2	0,3	2,2
	MS56-2	40	6000 ± 146	1,2	123,8	75	1,7	70,7	3,8	7,0	10,5	2,8	1,2	1,0	2,9
	MS56-3	100	3000-5000		126,9	36,4	3,5	76,4	3,0	4,1	11,0	1,5	0,5	0,3	3,6
	MS56-4	80	< 3000	31	0	78,7	0	5,0	12,0	2,1	0	0	0		
	MS60-1	110	7224 ± 139	1,2	347,4	58,33	6,0	68,8	5,0	6,0	13,1	2,8	0,4	0,5	3,0
	MS60-2	140	5736 ± 238	1,1	353,6	75	1,5	69,9	3,8	6,2	13,0	2,1	0,8	0,7	3,8
	MS60-3	140	< 5000		51	0		65,9	0	5,7	12,7	2,2	3,7	1,7	8,4
	MS55-1	140	6505 ± 100	1,1	335	60,0	5,6	68,6	6,5	5,5	13,9	3,3	0,3	0,3	2,1
	MS55-2	130,0	5964 ± 87	1,1	201,2	54,6	3,7	74,4	4,9	3,7	11,3	2,6	0	0	3,5

Método	Muestra	Peso. (mg)	MW medio	PD	anti-Xa UI/mg	anti-Ila UI/mg	Xa/Ila	% en peso de 1	% en peso de 8	% en peso de 2	% en peso de 3	% en peso de 4	% en peso de 5	% en peso de 6	% en peso de 7
Facción 2, 1000 µg HepIII, P10	MS55-3	50.0	3000-5000		11,6	0		76,1	2,3	4,4	9,8	1,7	0,8	0,6	4,2
	MS55-4	30	<3000		15,6	0		73,4	0	5,0	9,8	2,0	1,8	1,0	6,5
	MS66-1	150	6470 ± 142	1,2	250,1	100	2,5	75,0	3,6	7,5	8,6	8,6	3,8	1,0	0,3
	MS66-2	150	5592 ± 159	1,1	206,0	20,8	6,0	74,0	3,6	7,8	9,2	3,4,	1,1	1,0	0,2

La Fracción 2 es la segunda fracción de un MW inferior que se precipita manteniendo la heparina tratada con acetato de bario a 4°C. Esta es la fracción utilizada de acuerdo con los métodos de la invención.

5 Se midieron los perfiles de absorción subcutánea e *in vivo* de MS55-2. El perfil de absorción de MS55-2 se comparó con el de la LMWH disponible comercialmente, Ardeparina, y Enoxaparina. Se ensayó también la actividad anti-Xa de las diversas especies de heparina en cuanto a su actividad biológica *in vitro*.

Resultados:

La tabla 9 proporciona el análisis de composición y funcional de las preparaciones de LMWH producidas de acuerdo con la invención y de la fracción de control 1. La tabla enumera el MW, la actividad *in vitro*, y la composición de las diversas fracciones.

10 MS55-2 mostró farmacocinética muy similar a la de Enoxaparina, como resulta evidente en las fases de absorción y eliminación comparables, así como en T_{max} . La biodisponibilidad y las concentraciones de los picos eran comparables entre las tres LMWHs ensayadas mediante inyección subcutánea. Cuando se administra por la ruta IV, la actividad inicial anti-Xa es mucho mayor para MS55-2 en comparación con Ardeparina. De nuevo, la biodisponibilidad entre las dos LMWHs era prácticamente idéntica. Tanto Ardeparina como MS55-2 mostraron una
15 disminución exponencial en la actividad anti-Xa, y por tanto la eliminación sigue farmacocinética de primer orden.

Se observó que la actividad anti-Xa de MS55-2 era 205 UI/mg. Esta es mayor que la de las LMWHs tales como Enoxaparina (135 UI/mg), Ardeparina (93 UI/mg) que están disponibles actualmente en los Estados Unidos de América. Los resultados se muestran también en la Figura 13.

20 Se considera que la memoria descriptiva escrita que antecede es suficiente para permitir que un experto en la técnica lleve a la práctica la invención. La presente invención no debe considerarse limitada en alcance por los ejemplos proporcionados, dado que los ejemplos tienen por objeto servir como simple ilustración de un aspecto de la invención, y otras realizaciones funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en esta memoria, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción que antecede, y caen dentro del alcance de las reivindicaciones
25 adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar una muestra, que comprende las etapas de:

aplicar un método de separación a heparina en la muestra para producir un polisacárido modificado que tiene un componente de firma;

5 evaluar cuantitativamente el componente de firma en la muestra; y

comparar la heparina en la muestra con una base de datos de referencia de polisacáridos de tamaño idéntico como la heparina, en el que los polisacáridos de la base de datos de referencia también se han sometido al mismo método de separación que la heparina en la muestra, para analizar de ese modo la muestra;

en el que el componente de firma es:

10 (a) un tetrasacárido del dominio de unión a AT-III de heparina;

(b) un tetrasacárido del dominio de unión a FGF de heparina;

(c) $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$;

(d) $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$;

(e) $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; o

15 (f) $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el método de separación es:

(a) cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC);

(b) cromatografía de permeación en gel (GPC); o

(c) electroforesis capilar (CE).

20 3. Un método para analizar una muestra, que comprende las etapas de:

aplicar una restricción experimental a heparina en la muestra para producir un polisacárido modificado que tiene un componente de firma, en el que la restricción experimental es digestión enzimática;

evaluar cuantitativamente el componente de firma en la muestra; y

25 comparar la heparina en la muestra con una base de datos de referencia de polisacáridos de tamaño idéntico como la heparina, en el que los polisacáridos de la base de datos de referencia también se han sometido a la misma restricción experimental que la heparina en la muestra, para analizar de ese modo la muestra;

en el que el componente de firma es:

(a) un tetrasacárido del dominio de unión a AT-III de heparina;

(b) un tetrasacárido del dominio de unión a FGF de heparina;

30 (c) $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$;

(d) $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$;

(e) $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; o

(f) $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$.

4. El método de la reivindicación 3, en el que la digestión enzimática es:

35 (a) con una exoenzima; o

(b) con una endoenzima.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la comparación proporciona un análisis de composición de la heparina de muestra.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra es:

- (a) un producto farmacéutico;
- (b) un producto de grado farmacéutico regido por la USP;
- (c) un producto comercial; o
- (d) una muestra de heparina de bajo peso molecular (LMWH).

5 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente de firma es:

- (a) $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
- (b) $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
- (c) $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; o
- (d) $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$.

10 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se determina la cantidad del componente de firma.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la evaluación cuantitativa implica identificar y cuantificar al menos dos componentes de firma.

15 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la evaluación cuantitativa se calcula determinando:

- (a) el área bajo la curva (AUC) cuando la muestra se procesa mediante electroforesis capilar;
- (b) el factor de respuesta (RF); o
- (c) la cantidad relativa porcentual de cada fracción presente en la muestra.

20 11. El método de la reivindicación 10, en el que la cantidad relativa porcentual de cada fracción presente en la muestra se determina mediante la ecuación:

$$PRA = RF \times AUC_{\%R}$$

en la que PRA = cantidad relativa en porcentaje de cada fracción, RF = factor de respuesta, $AUC_{\%R}$ = AUC relativa en porcentaje $[(100 \times AUC_C)/AUC_T]$, AUC_C = área bajo la curva para un componente, y AUC_T = la suma del área bajo la curva para todos los componentes.

25 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la base de datos de referencia se incorpora en un medio legible por ordenador.

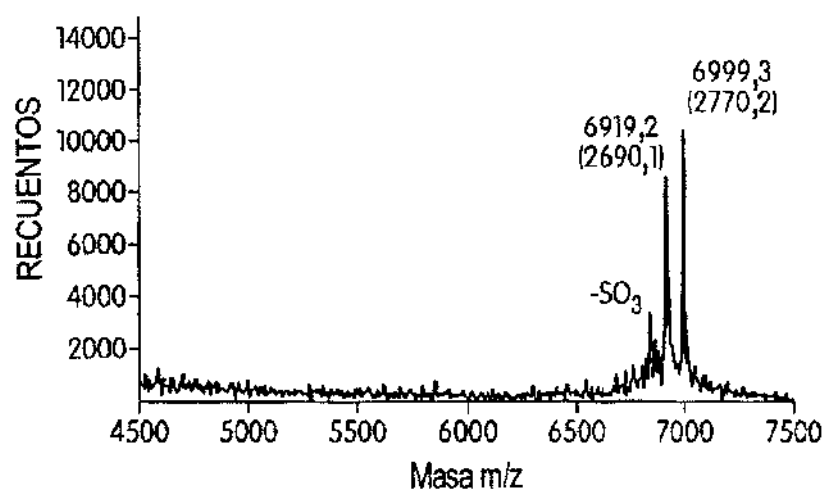


Fig. 1

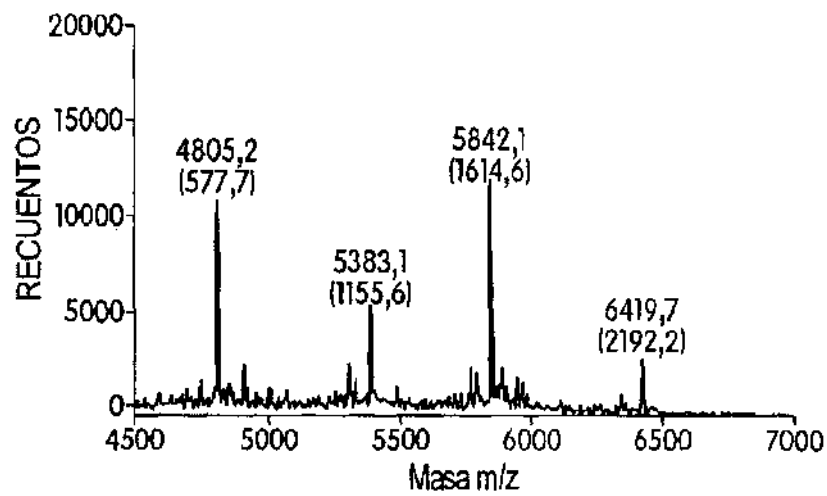


Fig. 2A

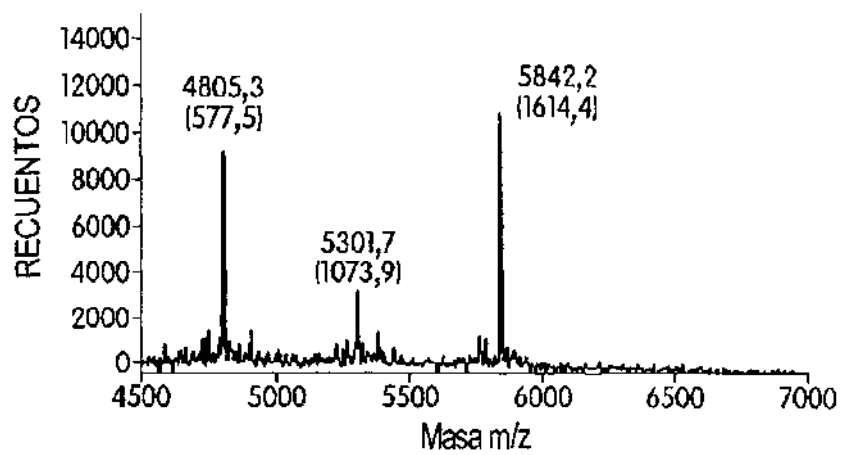


Fig. 2B

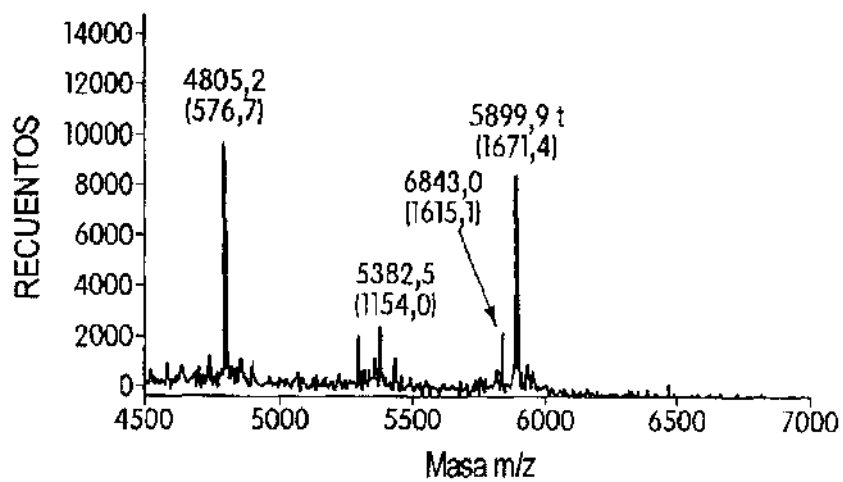


Fig. 2C

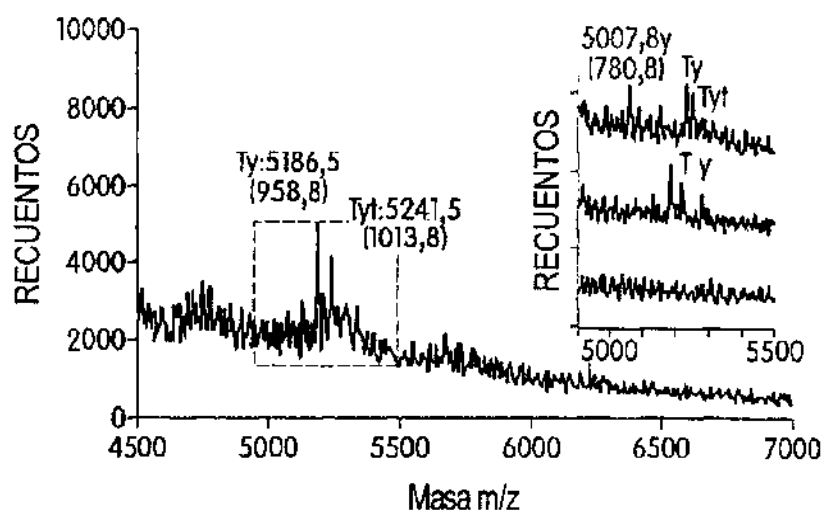


Fig. 3

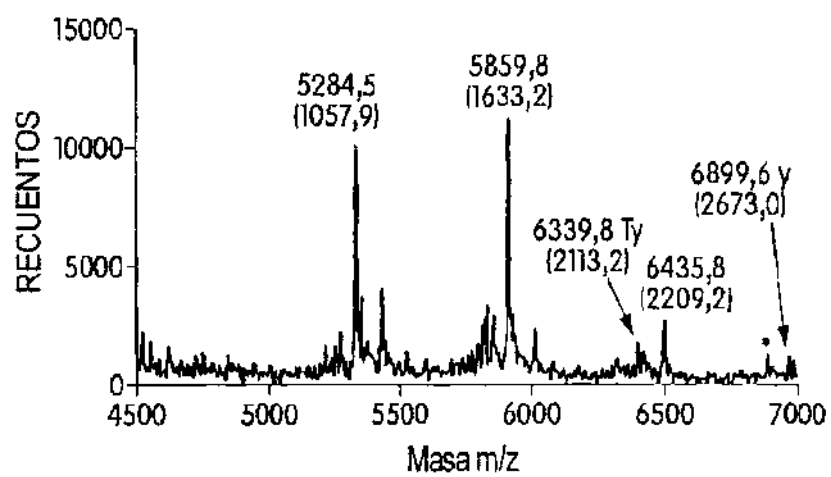
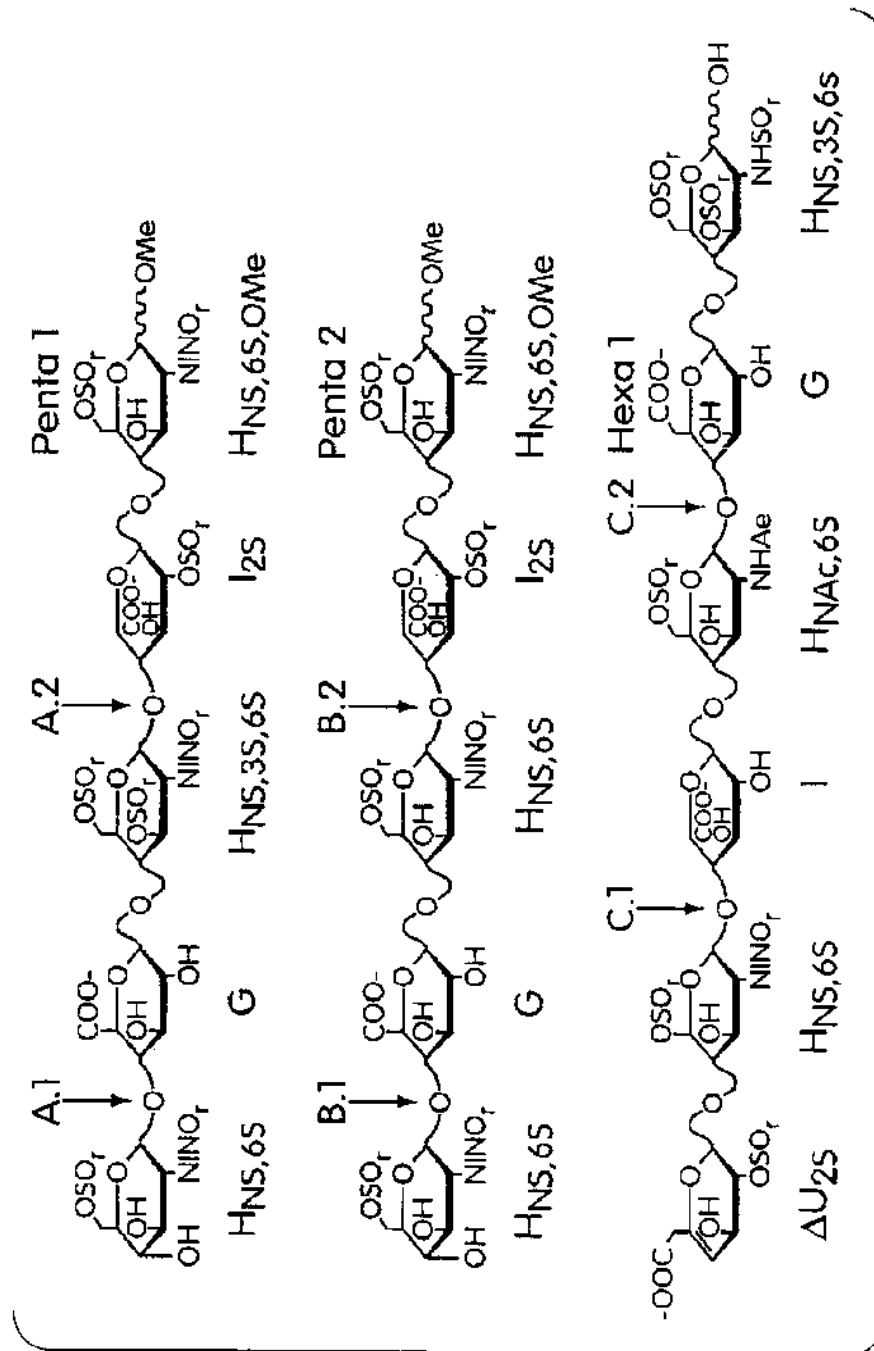


Fig. 4



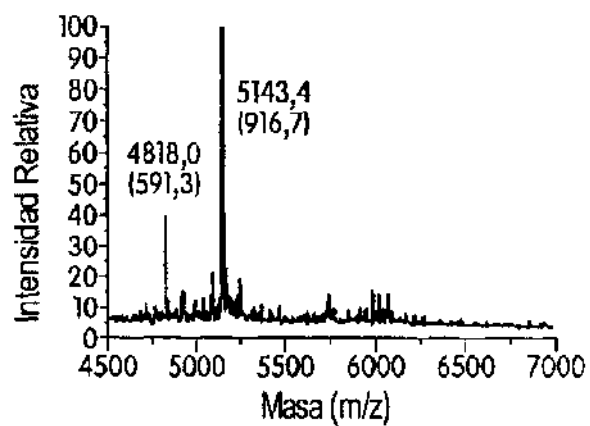


Fig. 6A

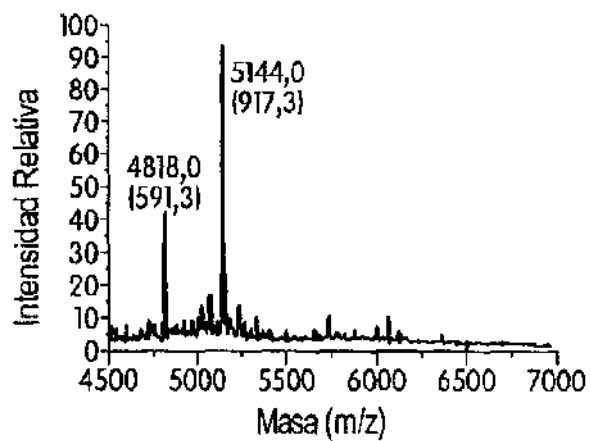


Fig. 6B

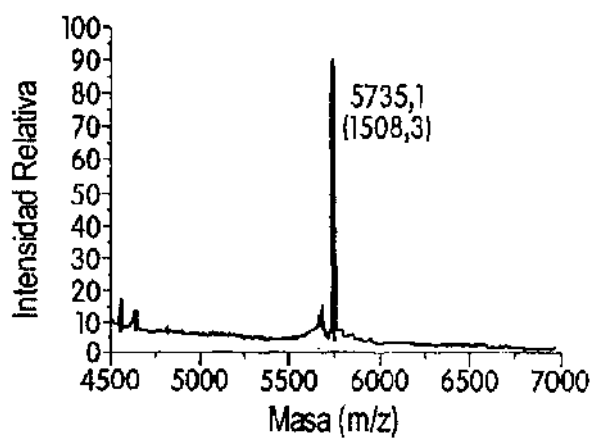


Fig. 6C

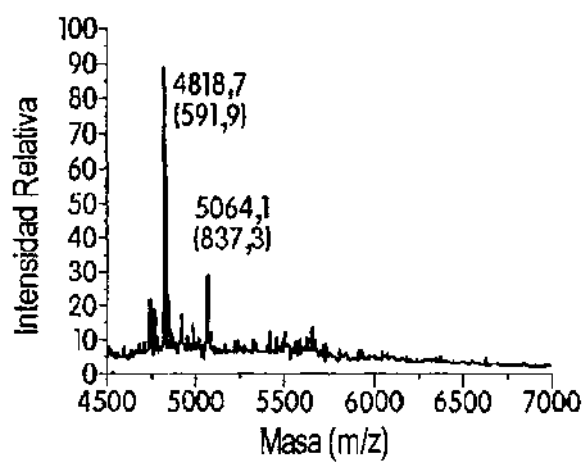


Fig. 7A

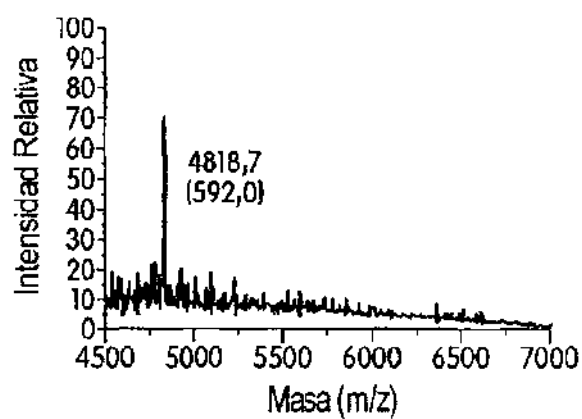


Fig. 7B

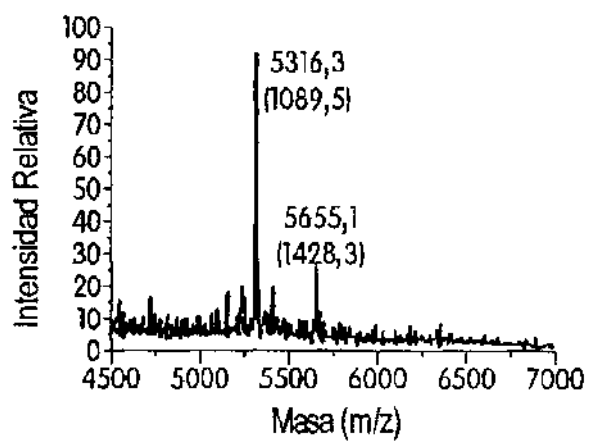


Fig. 7C

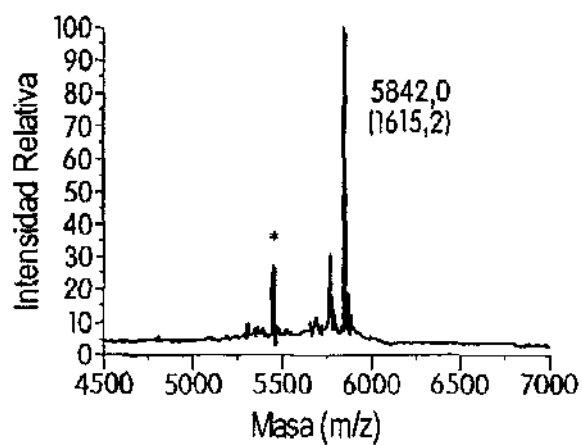


Fig. 8A

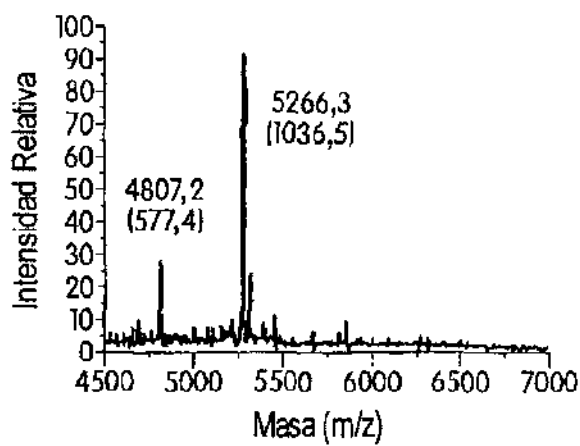


Fig. 8B

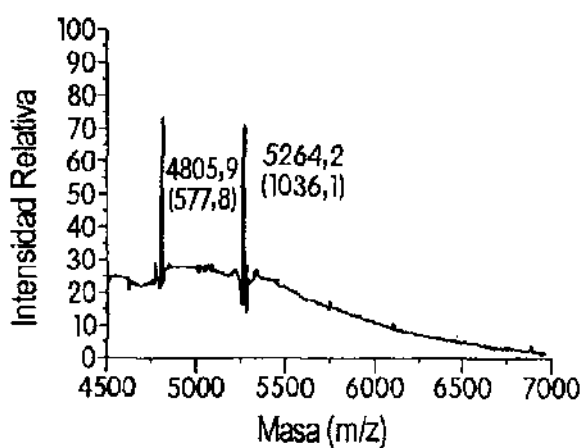


Fig. 8C

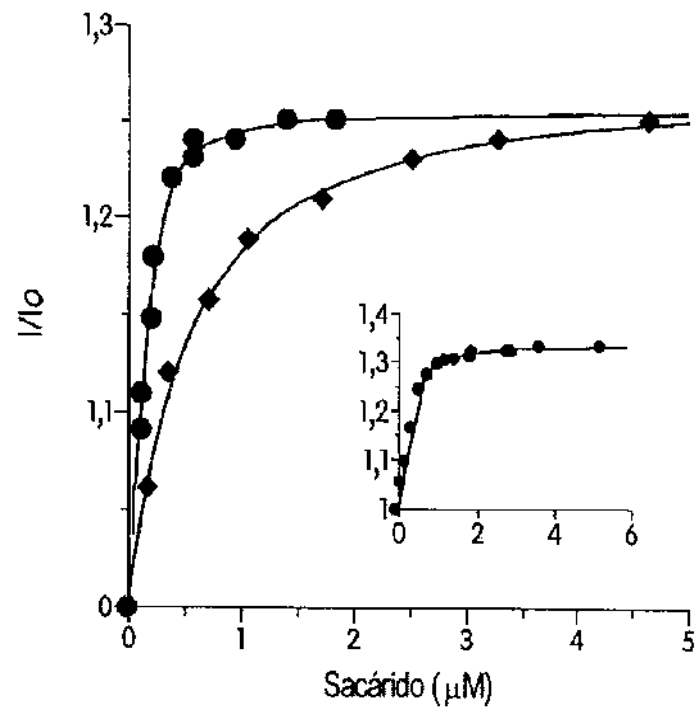


Fig. 9

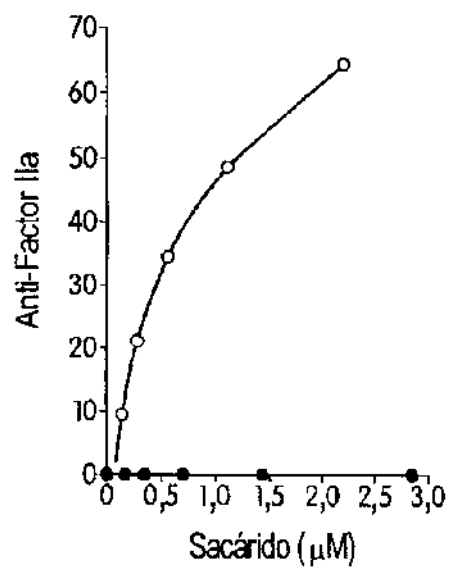


Fig. 10A

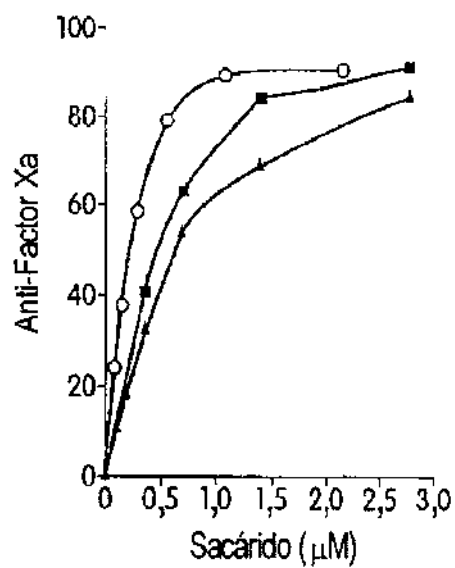


Fig. 10B

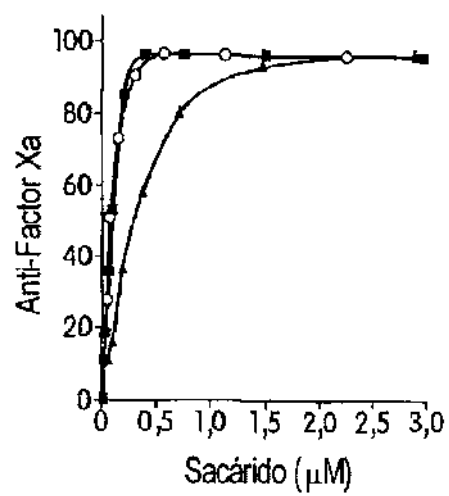


Fig. 10C

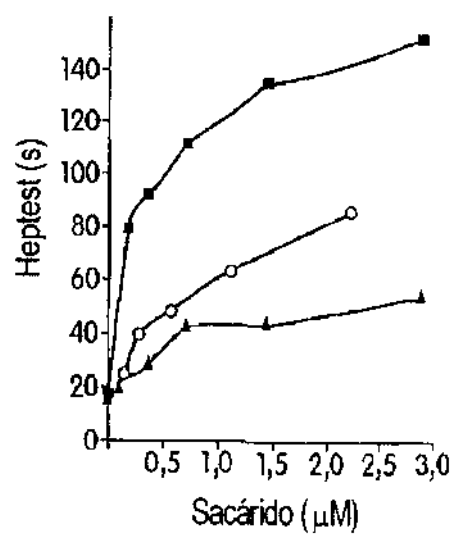


Fig. 10D

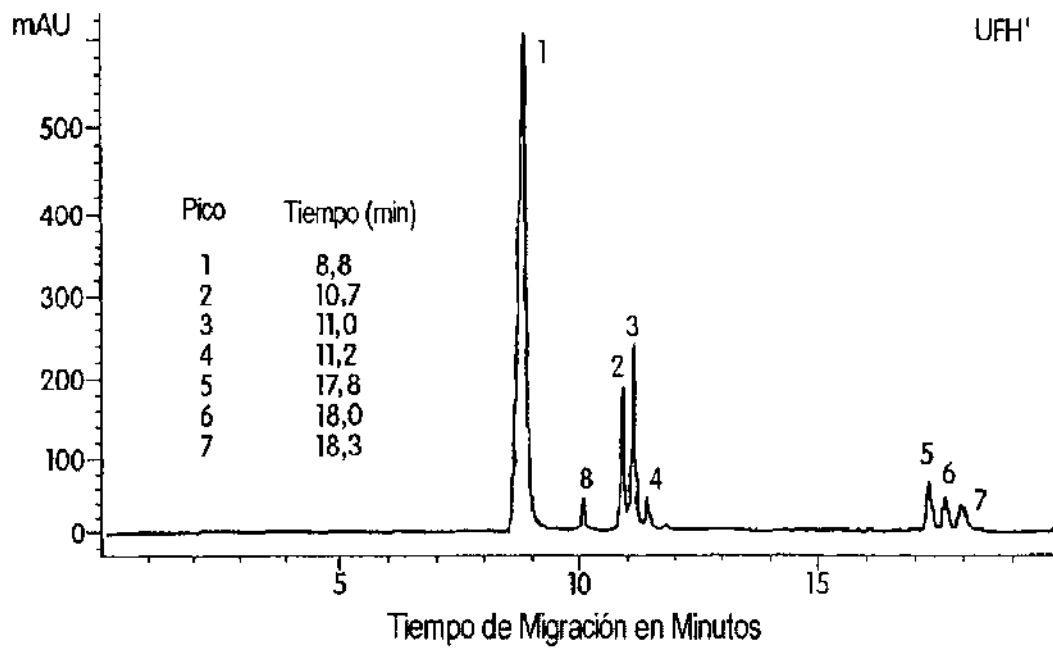


Fig. 11A

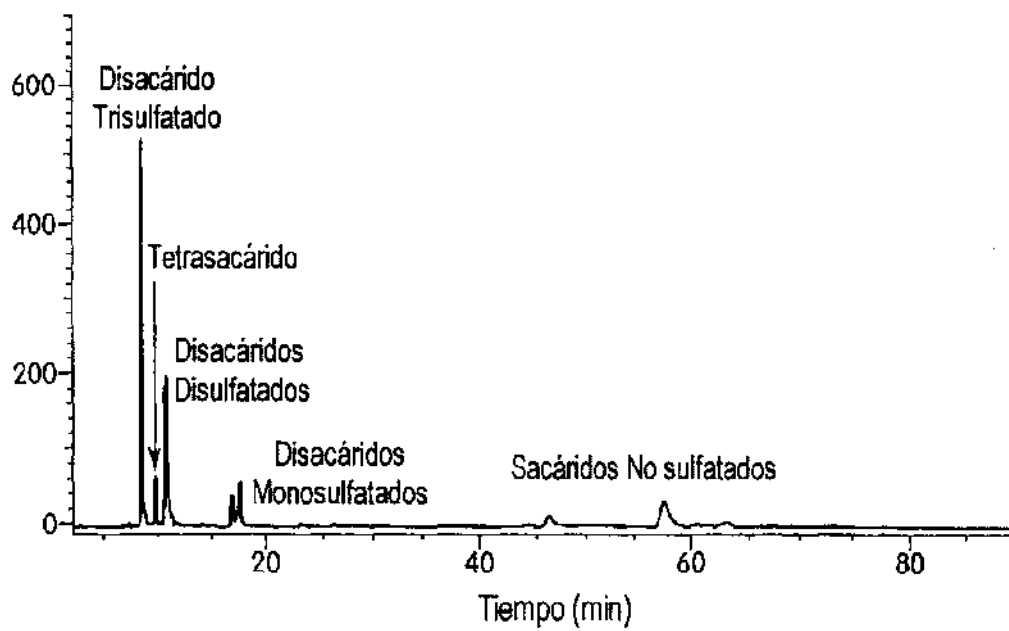


Fig. 11B

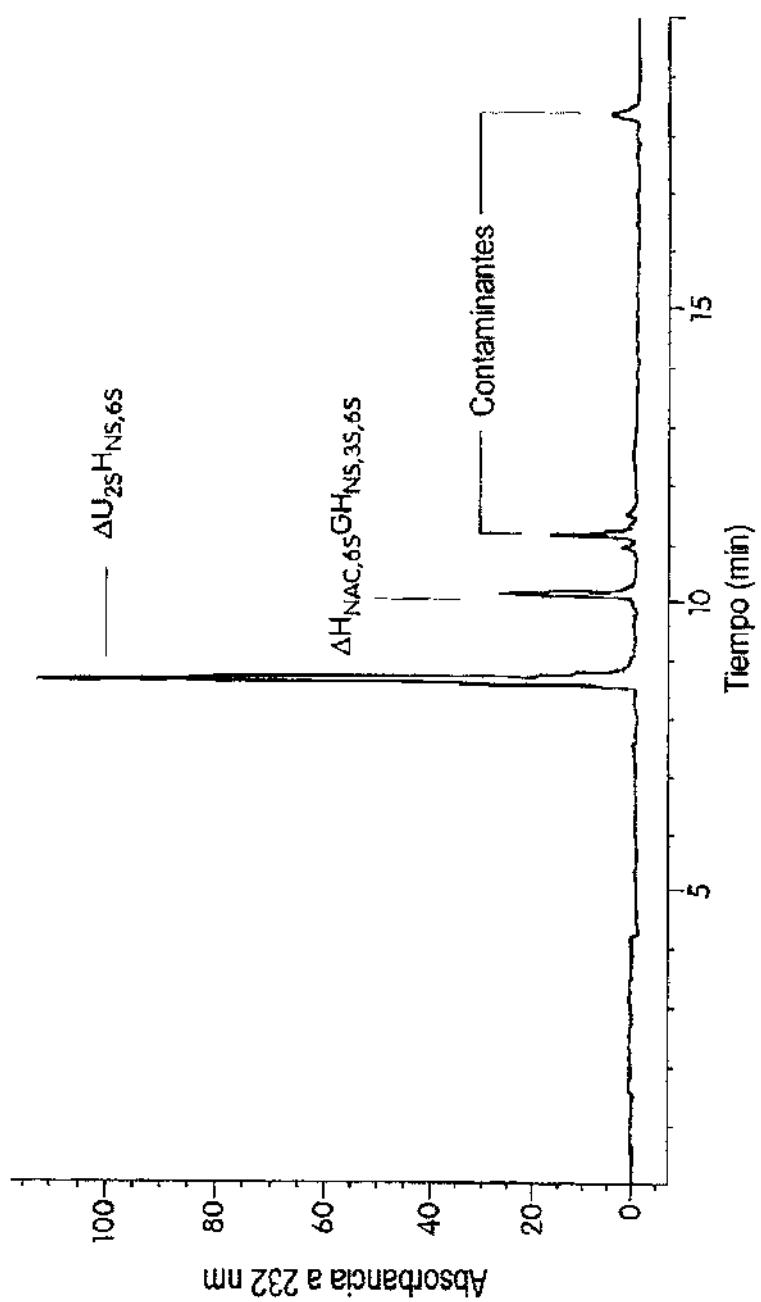


Fig. 12

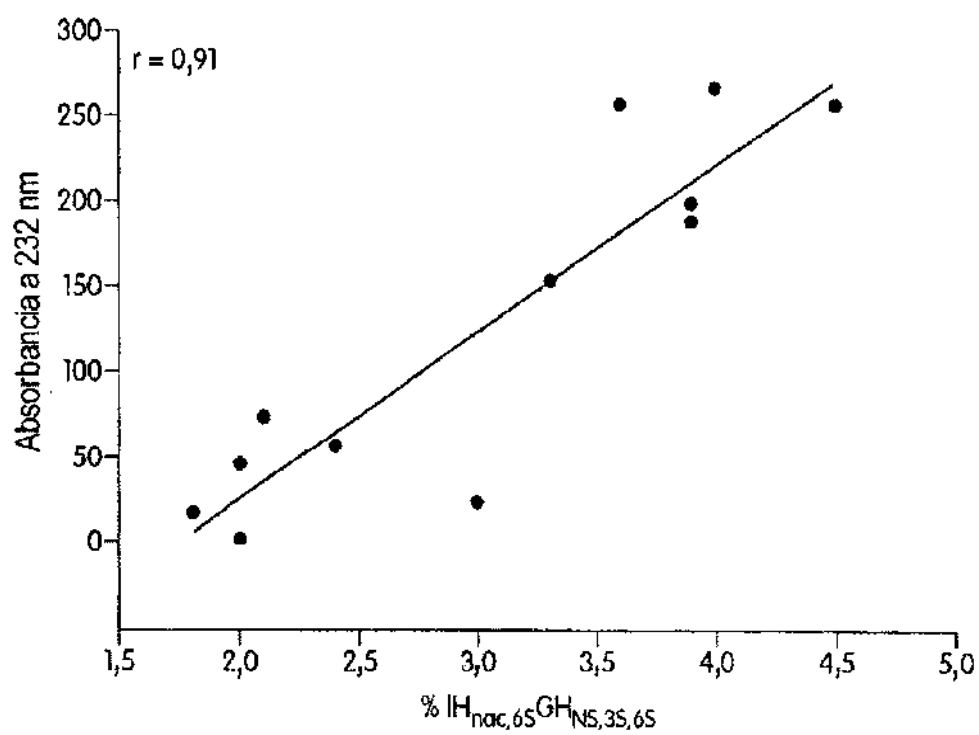


Fig. 13