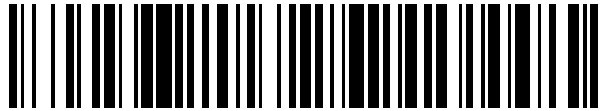


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 273**

51 Int. Cl.:

C08B 37/10 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2012 PCT/SE2012/051429**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13095277**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12859384 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2794666**

54 Título: **Uso de derivados de heparina químicamente modificada en drepanocitosis**

30 Prioridad:

19.12.2011 WO PCT/SE2011/051538

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

17.05.2018

73 Titular/es:

MODUS THERAPEUTICS AB (100.0%)

Sankt Eriksgatan 117

113 43 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

EKRE, HANS-PETER;

LEITGEB, ANNA;

WAHLGREN, MATS y

PIKAS, DAGMAR

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 668 273 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de derivados de heparina químicamente modificada en drepanocitosis

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a novedosas heparinas químicamente modificadas con baja actividad anticoagulante, a su uso en tratamiento, tal como en drepanocitosis.

Antecedentes de la invención

10 La heparina es un glucosaminoglucano (GAG, por sus siglas en inglés) natural que se sintetiza por y se almacena en forma intracelular en los denominados mastocitos en seres humanos y animales. De preparación industrial a partir de mucosa intestinal porcina, la heparina es un anticoagulante potente y se la ha usado clínicamente durante más de 60 años como fármaco de preferencia para la profilaxis y el tratamiento de trastornos tromboembólicos. Los efectos adversos potenciales principales del tratamiento con heparina son las complicaciones de hemorragias provocadas por sus propiedades anticoagulantes. La heparina es muy polidispersa y está compuesta por una población heterogénea de polisacáridos con pesos moleculares que varían entre 5 y 40 kDa, siendo el promedio de aproximadamente 15 a 18 kDa.

15 Las heparinas de bajo peso/masa molecular (HBPM) de acuerdo con la farmacopea europea 6.0 se definen como "sales de GAG sulfatados con una masa molecular promedio en masa de menos de 8 y para las que al menos 60 % de la masa total tiene una masa molecular de menos de 8 kDa." "Las heparinas de baja masa molecular muestran estructuras químicas diferentes en el extremo reductor o no reductor de las cadenas de polisacáridos." "La potencia es de no menos de 70 UI de una actividad del anti-factor Xa por miligramo calculada con referencia a la sustancia seca. La relación entre la actividad del anti-factor Xa y la actividad del anti-factor IIa no es de menos de 1,5." Las HBPM de uso clínico tienen pesos moleculares que varían entre 3 y 15 kDa con un promedio de entre aproximadamente 4 y 7 kDa. Producidas mediante una despolimerización/un fraccionamiento controlados de la heparina, las HBPM muestran propiedades farmacológicas y farmacocinéticas más favorables, inclusive una tendencia más baja a inducir hemorragias, una mayor biodisponibilidad y una semivida prolongada después de una inyección subcutánea. La heparina ejerce su actividad anticoagulante principalmente a través de la unión de alta afinidad al y la activación del inhibidor de serina proteasa, la antitrombina (AT). La unión es mediada por una secuencia de pentasacáridos específicos. La AT, un inhibidor fisiológico importante de la coagulación de la sangre, neutraliza los factores de coagulación activados formando un complejo estable con estos factores. La unión de la heparina provoca un cambio conformacional en la AT que aumenta significativamente la velocidad de inhibición de los factores de coagulación, lo que atenúa la coagulación de la sangre y la formación de coágulos de sangre.

20 La drepanocitosis (DC) es un trastorno hereditario que se debe a la homocigosis para la hemoglobina anómala, la hemoglobina S (HbS). Esta HbS anómala es provocada por la sustitución de una única base en el gen que codifica la subunidad de β -globina humana. Su alcance es mundial pero afecta principalmente a las personas que padecen malaria, en especial en África ecuatorial, pero también en el Mediterráneo, la India y el Oriente Medio. Los fenómenos vaso-oclusivos y la hemólisis son las marcas clínicas distintivas de la DC. La vaso-oclusión tiene como resultado episodios dolorosos recurrentes (a veces denominados crisis de células falciformes) y una variedad de complicaciones graves en el sistema orgánico, tales como infecciones secundarias, síndrome torácico agudo, accidente cerebrovascular y secuestro esplénico. La vaso-oclusión da cuenta del 90 % de las hospitalizaciones en niños con DC y, en definitiva, puede llevar a discapacidades permanentes y/o fallecimiento prematuro. A nivel molecular, la P-selectina es uno de los diversos objetivos que, según se demostró, es un receptor importante en la mediación de la adhesión de las células sanguíneas a la pared de los vasos como parte de acontecimientos que llevan a una vaso-oclusión.

25 El tratamiento actualmente dominante para tratar la DC incluye el uso de hidroxiurea (Ware y col., American Society of Hematology, 2009, páginas 62 a 65). Sin embargo, este tratamiento solo tiene una eficacia limitada e incluye una cantidad de efectos secundarios para los pacientes. Chaplin y col. (véase East Afr Med J. 1989; 66(9): 574-84) realizaron una prueba piloto con una dosis profiláctica diaria de heparina en cuatro pacientes con crisis de células falciformes y demostraron con éxito una reducción en el dolor y menos días de hospitalización. Qari y col. (Thromb. Haemost, 2007, 98, 392-6) describen un estudio clínico en el que se usó tinzaparina, un derivado de heparina de bajo peso molecular, que registró efectos beneficiosos del tratamiento, pero también varios casos de acontecimientos de hemorragia.

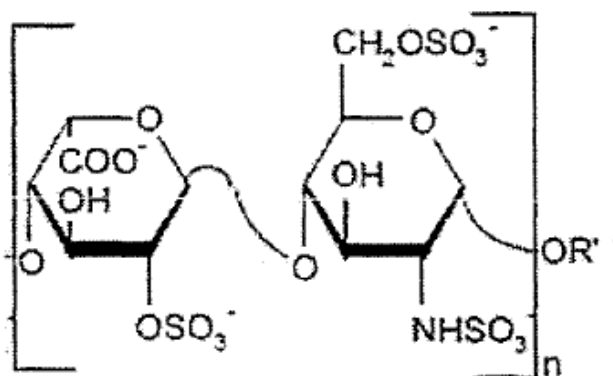
30 El documento WO 03/088980 sugiere un tratamiento oral con heparina o subfracciones de heparina para el tratamiento de vaso-oclusión (VOC) en DC.

Descripción de la invención

35 La presente invención se refiere a heparina químicamente modificada para su uso en el tratamiento de drepanocitosis. En el contexto de la presente invención, la actividad anticoagulante de la heparina se relaciona con la función clínica de potenciación de la inhibición de los factores de coagulación Xa e IIa (trombina) por medio de la AT. Se definirán otros términos en contextos relevantes en la siguiente descripción.

En un aspecto, la invención está dirigida a heparina químicamente modificada para su uso en el tratamiento de drepanocitosis que tiene una actividad de antifactor IIa de menos de 10 UI/mg, una actividad de antifactor Xa de hasta 10 UI/mg y un peso molecular promedio de entre alrededor de 6,5 y alrededor de 9,5 kDa, en la que las cadenas de polisacáridos:

- 5 (i) retienen al menos 90 % de los grupos sulfato de la heparina natural correspondiente;
- (ii) tienen una reducción en las secuencias de pentasacáridos químicamente intactas, lo que proporciona un efecto anticoagulante mediado por antitrombina, al compararlo con las cadenas de polisacáridos de la heparina natural; y
- 10 (iii) tienen una reducción en las unidades de ácido glucurónico y/o idurónico no sulfatado al compararlo con la heparina natural;
- en las que el disacárido predominante del polisacárido es un disacárido que tiene la estructura química:



- 15 en la que R' es un resto de treonato; y n es un número entero entre 2 y 25, de manera que comprende entre 2 y 25 unidades de disacáridos correspondientes a los pesos moleculares entre 1,2 y 15 kDa; y en la que la heparina químicamente modificada no tiene, en un espectro de RMN ¹H, señales no identificadas en los intervalos de 0,10-2,00 ppm, de 2,10-3,10 ppm y de 5,70-8,00 ppm mayores que 4 por ciento en comparación con la altura de la señal presente en la heparina natural a 5,42 ppm.

20 La heparina químicamente modificada para su uso en el tratamiento de drepanocitosis tiene entre 2 y 25 unidades de disacáridos correspondientes a los pesos moleculares de entre alrededor de 1,2 y alrededor de 15 kDa. Las heparinas químicamente modificadas tienen cadenas de polisacáridos con una reducción en las secuencias de pentasacáridos químicamente intactas responsables del efecto anticoagulante mediado por antitrombina (AT) al compararlo con las cadenas de heparina natural y tienen cadenas de polisacáridos con una reducción en los restos de ácido glucurónico e idurónico no sulfatados al compararlos con heparina natural.

25 Las heparinas químicamente modificadas para su uso en el tratamiento de drepanocitosis tienen cadenas de polisacáridos que se presentan predominantemente con entre 6 y 16 unidades de disacáridos con pesos moleculares entre 3,6 y 9,6 kDa. En este contexto, el término "predominantemente" tiene el significado de cadenas de polisacáridos "presentes con máxima frecuencia".

Un aspecto de la invención es que una heparina químicamente modificada tiene al menos 30 % de las cadenas de polisacáridos con un peso molecular de al menos 8 kDa.

30 La heparina químicamente modificada comprende cadenas terminadas con un resto de treonato. El resto de treonato es representado más abajo como un grupo terminal.

En un aspecto de la invención, entre 3 % y 15 % de las cadenas de polisacáridos de la heparina químicamente modificada tienen una masa molecular de al menos 15 kDa.

35 En un aspecto de la invención, entre 25 % y 47 % de las cadenas de polisacáridos de la heparina químicamente modificada tienen una masa molecular de al menos 9 kDa.

En un aspecto de la invención, entre 40 % y 60 % de las cadenas de polisacáridos de la heparina químicamente modificada tienen una masa molecular de al menos 7 kDa.

En un aspecto de la invención, entre 60 % y 80 % de las cadenas de polisacáridos de la heparina químicamente modificada tienen una masa molecular de al menos 5 kDa.

40 En un aspecto de la invención, 85 % de las cadenas de polisacáridos de la heparina químicamente modificada tienen una masa molecular de al menos 3 kDa.

En un aspecto de la invención, 95 % de las cadenas de polisacáridos de la heparina químicamente modificada tienen una masa molecular de al menos 2 kDa.

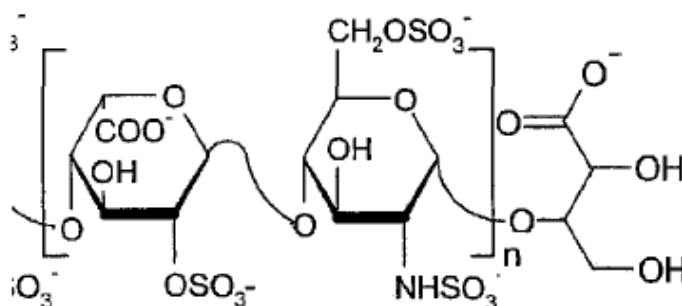
5 En aun otro aspecto, las heparinas químicamente modificadas de la invención para su uso en el tratamiento de drepanocitosis tienen una distribución de polisacáridos y su masa molecular correspondiente expresada como % del peso acumulativo de acuerdo con la tabla:

Masa molecular, kDa	Peso acumulativo, %
>15	3-15
>9	25-47
>7	40-60
>5	60-80
>3	>85
>2	>95

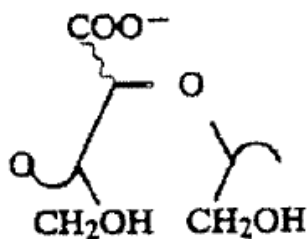
En aun otro aspecto, las heparinas químicamente modificadas de la invención para su uso en el tratamiento de drepanocitosis tienen una distribución de polisacáridos y su masa molecular correspondiente expresada como % del peso acumulativo de acuerdo con la tabla:

Masa molecular, kDa	Peso acumulativo, %
>15	3-15
>10	18-38
>9	25-47
>8	30-55
>7	40-60
>6	50-72
>5	60-80
>4	72-86
>3	>85
>2	>95

10 Las heparinas químicamente modificadas para su uso en el tratamiento de drepanocitosis tienen cadenas de polisacáridos con el disacárido representado más abajo como la estructura predominante con un resto de treonato terminal. El disacárido predominante tiene un peso molecular de alrededor de 600 Da. (n es un número entero de 2-25).



15 De acuerdo con otro aspecto de la invención, las heparinas químicamente modificadas para su uso en el tratamiento de drepanocitosis comprenden restos de escisión de glicol con la estructura química:



Los restos de escisión de glicol aparecen en cadenas de polisacáridos de heparinas químicamente modificadas, como resultado de los procesos de oxidación y reducción, tal como se ha analizado con anterioridad en el contexto con el procedimiento y la etapa de hidrólisis específica. Estos también pueden ser considerados como indicativos de la eficiencia de la etapa de despolimerización (hidrólisis) descrita con anterioridad. Se hace referencia además a la patente de Estados Unidos n.º 4.990.502 para una referencia de la aparición de restos de escisión de glicol. El resto de escisión de glicol representado proviene de la oxidación y de la reducción de ácido glucurónico y ácido idurónico no sulfatados.

La heparina químicamente modificada para su uso en el tratamiento de drepanocitosis tiene un espectro de RMN ¹H en el intervalo entre 5,0 y 6,5 ppm que cumple con un espectro de RMN ¹H de heparina natural por la ausencia de cualquier señal de protón con una magnitud superior a 0,1 % (mol).

Se espera que las heparinas químicamente modificadas para su uso en el tratamiento de drepanocitosis cumplan con las normas de heparina actualmente aceptadas al tener un espectro de RMN ¹H que cumple con el criterio de aceptación de la heparina establecido por EDQM, Consejo Europeo, 2012, por ejemplo al no tener ninguna señal no identificada mayor que 4 por ciento en comparación con la altura de la señal de heparina en 5,42 ppm en los intervalos 0,10-2,00 ppm, 2,10-3,10 ppm y 5,70-8,00 ppm.

La heparina químicamente modificada para su uso en el tratamiento de drepanocitosis tiene cadenas de polisacáridos que retienen al menos el 90 % de los grupos sulfato de una heparina natural correspondiente. En otros términos, las heparinas químicamente modificadas de acuerdo con la invención tienen una pérdida de grupos sulfato de alrededor de un grupo sulfato por unidad de disacárido de 100 unidades de disacáridos, correspondiente a una pérdida de grupos sulfato de menos del 1 % del contenido total de sulfato, al suponer que la heparina contiene, en promedio, 2,4 grupos sulfato por unidad de disacárido y que existe un grupo sulfato por ácido idurónico, I2S y 2 grupos sulfato para la variante de glucosamina predominante, GlcNS.

En un aspecto de la invención, la heparina químicamente modificada para su uso en el tratamiento de drepanocitosis puede ser útil para tratamientos previamente desvelados como en asociación con regiones de heparina diferentes del sitio de unión a la AT. Entre los ejemplos se incluyen, pero sin limitaciones, áreas tales como el tratamiento de inflamación, el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, la reparación tisular, el accidente cerebrovascular, la prevención y el tratamiento del choque, en especial el choque septicémico y la prevención del avance de la metástasis.

Un aspecto de la invención es una heparina químicamente modificada para su uso en el tratamiento de crisis algidas en drepanocitosis (crisis vaso-oclusivas). Las heparinas químicamente modificadas desveladas en el presente documento pueden ser útiles para la prevención o para el tratamiento de efectos oclusivos de células sanguíneas falciformes, provocados por los efectos de una adhesión anómala en la sangre. Las heparinas químicamente modificadas de acuerdo con la invención tienen una afinidad de unión por la P-selectina comparable con la de la heparina.

Un aspecto de la invención es una heparina químicamente modificada como la desvelada en el presente documento, como un tratamiento adicional al manejo del dolor y al tratamiento con hidroxiurea.

En aun otro aspecto de la invención, una heparina químicamente modificada como la desvelada en el presente documento puede administrarse de forma simultánea o secuencial en el sentido de un tratamiento auxiliar con un medicamento efectivo contra la drepanocitosis o complicaciones de la drepanocitosis.

En el presente documento se describe un procedimiento para el tratamiento de la drepanocitosis que comprende la administración a un paciente que necesita dicho tratamiento, de una cantidad terapéuticamente eficaz de una heparina químicamente modificada como la descrita en el presente documento. En un aspecto, el procedimiento comprende el tratamiento de crisis vaso-oclusivas.

Aun otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende una heparina químicamente modificada como la descrita en el presente documento, junto con un vehículo farmacéutica y farmacológicamente aceptable. En aun otro aspecto de la invención puede administrarse una composición farmacéutica como la descrita en el presente documento por vía sistémica mediante la administración parenteral, tal como mediante inyección subcutánea o intravenosa. En aun otro aspecto puede administrarse una composición farmacéutica como la descrita en el presente documento por vía oral. Para la administración parenteral pueden incorporarse los compuestos

5 activos en una solución o suspensión, que también contienen uno o más adyuvantes tales como diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicol, glicerol, propilenglicol u otros disolventes sintéticos, agentes antibacterianos, antioxidantes, agentes quelantes, tampones y agentes para ajustar la osmolalidad. La preparación parenteral puede administrarse en ampollas, viales, jeringas precargadas o desechables también para autoadministración, o como dispositivos de infusión, tal como para infusión intravenosa o subcutánea. Las heparinas químicamente modificadas de acuerdo con la invención pueden administrarse por vía subcutánea y con herramientas de autoadministración adecuadas, tales como inyectores.

10 Las composiciones farmacéuticas que comprenden una heparina químicamente modificada como la descrita en el presente documento pueden comprender combinaciones de uno o varios vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables. Los vehículos o excipientes pueden ser un material sólido, semisólido o líquido que puede servir como un vehículo para la sustancia activa. Las composiciones pueden administrarse en una dosis única cada 24 horas durante un período de 1-30 días, de preferencia de 1-10 días. La dosis puede estar entre 0,5-6 mg/kg de peso corporal administrada, ya sea por vía intravenosa cada 6 u 8 horas, o 1-4 veces al día administrada por vía subcutánea. Una dosis única estimada es 25-100 mg/d de GAG modificados, pero puede ser de hasta 1 g o más. La dosis está relacionada con la forma de administración. Las composiciones farmacéuticas descritas pueden comprender, además, agentes adicionales adecuados para tratar drepanocitosis con tratamientos suplementarios o complementarios de la forma descrita en la sección anterior.

20 Un uso terapéutico específico de las heparinas químicamente modificadas de acuerdo con la presente invención es el tratamiento de la DC. Las heparinas químicamente modificadas de la invención evitarán o tratarán los efectos oclusivos de la DC provocados por los efectos de adhesión anómala en la sangre. Asimismo, en el tratamiento de la DC puede combinarse un tratamiento que incluya las heparinas de la invención con otros tratamientos adecuados para tratar la DC, ya sea administrados de forma simultánea o administrados de forma auxiliar a las heparinas químicamente modificadas. Los tratamientos complementarios preferentemente alivian la DC o sus complicaciones secundarias a través de otros medios de mecanismo diferentes de las heparinas químicamente modificadas y pueden incluir la administración de agentes usados comúnmente para el tratamiento de la DC.

25 La invención se extiende, además, a cualquier uso para producir agentes para el tratamiento de la ACD con las heparinas químicamente modificadas descritas.

30 En resumen, la invención deriva, en general, de la comprensión de que una heparina modificada necesitaría retener una cantidad suficiente de los grupos sulfato incluidos en la forma natural, con el fin de ejercer una actividad terapéutica que no se relaciona con los efectos anticoagulantes, por ejemplo, la inhibición de la selectina así como también otros efectos biológicos que dependen de la heparina.

Descripción detallada y de ejemplos de la invención

35 Un aspecto de la invención es una heparina químicamente modificada para su uso en el tratamiento de drepanocitosis con la denominación común internacional (DCI) *sevuparin sodium*, también conocida como DF02. Estas expresiones son usadas de forma indistinta y conservan el mismo significado.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un ejemplo representativo de la secuencia de heparina.

La Figura 2 muestra la estructura de la unidad de pentasacáridos en la heparina necesaria para su unión a la AT.

40 La Figura 3 muestra un esquema de la síntesis de la heparina químicamente modificada DF02 de acuerdo con la invención.

La Figura 4 muestra la estructura predominante de la DF02.

La Figura 5 demuestra cómo un derivado de heparina de acuerdo con la invención es capaz de inhibir la adhesión de SS RBC a las células endoteliales tratadas con IL-13 e histamina.

45 Las Figuras 6A y 6B presentan gráficos de muestras de casos de adhesión cuantificados en múltiples esfuerzos de cizalla.

La Figura 7 demuestra la inhibición de acontecimientos de adhesión con el tratamiento de DF02 de acuerdo con la presente invención.

Las Figuras 8A y 8B demuestran una comparación de la inhibición de acontecimientos de adhesión con el tratamiento de DF02 de acuerdo con la presente invención, y la tinzaparina HBPM comercial.

50 La Figura 9 presenta gráficos de muestras del efecto posterior al tratamiento con DF02 de acuerdo con la presente invención, en comparación con la tinzaparina HBPM.

Ejemplo 1

Tanto la heparina como la HBPM están compuestas por la repetición de unidades de disacáridos que contienen un resto de ácido urónico (ácido D-glucurónico o L-idurónico, AU) y una fracción de D-glucosamina (GlcN) que está N-sulfatada o bien N-acetilada. Estos restos de carbohidratos pueden estar además O-sulfatados, en las posiciones C-6 y C-3 en el caso de la glucosamina y en la posición C-2 del AU. La estructura de la heparina es variable respecto de la distribución del AU y de los restos de sulfato; la Figura 1 muestra una secuencia parcial representativa (que también ilustra el modo de numerar los átomos de carbono en un resto de monosacárido). La Figura 2 muestra la secuencia única de pentasacáridos distribuida dentro de polímeros de heparina, lo que es fundamental para la unión a la AT. Se ha demostrado que varias características estructurales de esta secuencia son fundamentales para la interacción de la heparina con la AT. Es de destacar que uno de los dos restos de AU presentes en esta secuencia de pentasacáridos está sulfatado constantemente en la posición C-2, mientras que los grupos hidroxilo tanto en C-2 como en C-3 de la otra fracción urónica están sin sustituir.

Descripción detallada del procedimiento de fabricación de heparinas químicamente modificadas de acuerdo con la invención

La Figura 3 muestra de forma esquemática la fabricación de una heparina químicamente modificada de acuerdo con la presente invención, en adelante denominada DF02, mientras que las secciones siguientes describen las etapas de fabricación.

Se prepara la sustancia a partir de heparina de sodio. La preparación implica la oxidación selectiva de restos de ácido urónico no sulfatado en heparina mediante periodato, inclusive la fracción de ácido glucurónico en la secuencia de pentasacáridos que se une a la AT. La ruptura de la estructura de este resto anula la interacción de alta afinidad con la AT y, en consecuencia, el efecto anticoagulante (medido como a-FXa o a-FIIa, véanse las Tablas 4 y 5). La reducción y el tratamiento con ácido posteriores tienen como resultado la escisión del polímero en los sitios que han sido oxidados con periodato. Juntas, estas manipulaciones conducen a una pérdida de actividad anticoagulante junto con una adecuada despolimerización de la cadena de heparina.

Con posterioridad se eliminan aditivos, impurezas y subproductos mediante repetidas precipitaciones con etanol, filtración y centrifugaciones. Después se obtiene la sustancia en forma de polvo mediante secado al vacío y calor. La sustancia farmacéutica DF02 se disuelve en un tampón acuoso estéril para dar el medicamento, destinado a su administración intravenosa o subcutánea.

Oxidación de ácidos glucurónico e idurónico (restos), eliminación de la actividad anticoagulante

Se disuelve una cantidad de alrededor de 3000 gramos de heparina en agua purificada para obtener una solución del 10-20 % p/v. Se ajusta el pH de esta solución a 4,5-5,5. Con posterioridad, se agrega el metaperiodato de sodio (NaIO₄) a la solución del procedimiento; la cantidad de periodato es del 15-25 % del peso de la heparina. Se ajusta nuevamente el pH a 4,5-5,5. Se cubre el reactor para proteger la reacción de la luz. Se hace reaccionar la solución del procedimiento durante 22-26 horas con agitación constante y se mantiene la temperatura a 13-17 °C. Se mide el pH al final del período de reacción y se registra.

Finalización de la reacción de oxidación y eliminación de los compuestos que contienen yodo

Se agrega etanol (95-99,5 %) a la mezcla de reacción durante un período de 0,5-1 hora, con agitación cuidadosa y a una temperatura de 20-25 °C. El volumen de etanol a ser agregado se encuentra en el intervalo de 1- 2 volúmenes de etanol por volumen de solución del procedimiento. Luego, se deja precipitar y sedimentar la heparina oxidada durante 15-20 horas, después de lo cual se decanta y se desecha el licor madre.

Después, se disuelve el sedimento en agua purificada para obtener una solución del procedimiento del 15-30 % p/v. Luego, se agrega NaCl para obtener una concentración de 0,15-0,30 mol/litro en la solución del procedimiento. La agitación continúa durante otra 0,5-1 hora mientras que se mantiene la temperatura a 20-25 °C. Con posterioridad, se agregan 1,0-2,0 volúmenes de etanol (95-99,5 %) por volumen de solución del procedimiento a esta solución con agitación cuidadosa durante un período de 0,5-1 hora. Esto precipita el producto de la solución. Esta precipitación continúa durante >1 hora.

Reducción de ácidos glucurónico/idurónico oxidados

Una vez decantado y desechado el licor madre, se disuelve el sedimento agregando agua purificada hasta obtener una concentración de la solución del procedimiento del 15-30 % p/v. Mientras se mantiene la temperatura a 13-17 °C, se ajusta el pH de la solución a 5,5-6,5. Luego, se agrega una cantidad de 130-150 gramos de borohidruro de sodio a la solución y se disuelve, el pH aumentará de inmediato a un pH de 10-11 y la reacción continúa durante 14-20 horas. Se registra el pH de la solución, tanto antes como después de este período de reacción. Tras este tiempo de reacción, se agrega un ácido diluido con lentitud para ajustar el pH a un valor de 4, lo que degrada el borohidruro de sodio restante. Después de mantener un pH de 4 durante 45-60 minutos, se ajusta el pH de la solución en 7 con una solución diluida de NaOH.

Hidrólisis ácida para lograr la despolimerización de las cadenas de polisacáridos

5 Se agrega ácido diluido a la solución hasta obtener un pH de 3,5 (intervalo aceptable 3,2-3,8). Se mantiene la temperatura a 50-55 °C mientras se agita la solución durante 3 horas +/- 10 minutos. Luego, se agrega una solución diluida de NaOH hasta obtener un pH de 7,0 y se enfría la solución de la reacción hasta una temperatura de 13-17 °C. Luego, se agrega cloruro de sodio (NaCl) hasta obtener una concentración de 0,2-0,3 mol/litro.

Purificación del producto, eliminación de los aditivos y de las impurezas del procedimiento, agregado de contraiones y filtración

10 Luego, se agrega un volumen de la solución del procedimiento a 1,5-2,5 volúmenes de etanol (95-99,5 %) seguido de centrifugación a >2000 G, y a <20 °C durante 20-30 minutos, después de lo cual se decanta y se desecha el sobrenadante.

15 Luego, se disuelve la pasta del producto resultante obtenida por centrifugación en agua purificada para obtener una concentración de producto del 10-20 % p/v. Luego, se agrega NaCl para obtener una concentración de 0,20-0,35 mol/litro. Además, se agregan 1,5-2,5 volúmenes de etanol (95-99,5 %) por volumen de solución del procedimiento que precipita el producto de la solución. Sigue una centrifugación a >2000 G y a <20 °C durante 20-30 minutos, después de lo cual se decanta y se desecha el sobrenadante.

20 Después, se agrega la pasta restante a agua purificada para que se disuelva. La concentración del producto estaría ahora en el intervalo del 10-20 % p/v. Se ajusta el pH de la solución del producto a 6,5-7,5. Luego, se filtra la solución para eliminar cualquier partícula. Después, se agregan 1,5-2,5 volúmenes de etanol (95-99,5 %) en un volumen de solución del procedimiento. Sigue una centrifugación a >2000 G y a <20 °C durante 20-30 minutos, después de lo cual se decanta y se desecha el sobrenadante.

Reducción del tamaño y del contenido de agua de la pasta del precipitado

25 Luego, se carga un reactor de vidrio con etanol, con un volumen de 2 litros. Mientras se agita el etanol, se agrega la pasta del precipitado. La agitación mecánica solidifica la pasta y se reemplaza el agua presente con el etanol, dando una suspensión de partículas homogénea. Se interrumpe la agitación tras 1-2 horas, después de lo cual se dejan sedimentar las partículas, para luego decantar el licor madre. Se repite este procedimiento dos veces. Se aísla el precipitado en un filtro de polipropileno (PP). Se repite este procedimiento otras dos veces. Después de eliminar el exceso de líquido, se hacen pasar las partículas a través de un tamiz para obtener partículas de un tamaño menor y uniforme.

Secado al vacío

30 Se distribuye el producto de manera uniforme sobre dos bandejas previamente pesadas y se las coloca en un armario de vacío. Se reduce la presión con una bomba de vacío, se registra la presión realmente obtenida y se calientan las bandejas a 35-40 °C llevando un registro constante de la temperatura. Se hace pasar una corriente de nitrógeno por la secadora en ese momento mientras se mantiene la presión baja en la secadora. Cuando se obtiene un peso constante, es decir que ya no se advierte ninguna evaporación, se considera finalizado el secado. El producto seco se dispensa, envasa y protege contra la humedad. Se lleva a cabo el almacenamiento en un área seca a una temperatura de 20-25 °C.

40 El producto fabricado de esta manera puede ser preparado como un medicamento mediante un procedimiento aséptico convencional, como una solución que comprenda 150 mg/ml de agente activo de heparina químicamente modificada y fosfato de Na de 15 mM, pH 6-8. El medicamento obtenido de esta manera es destinado a su administración intravenosa o subcutánea. La heparina químicamente modificada resultante, DF02, es una forma despolimerizada de heparina con un peso molecular promedio proyectado de 6,5-9,5 kDa y esencialmente sin actividad anticoagulante.

45 La DF02 tiene una distribución de tamaño de polímeros de polisacáridos con un intervalo para n de 2-25, correspondientes a los pesos moleculares de 1,2-15 kDa. El tamaño predominante es 6-16 unidades de disacáridos correspondientes a los pesos moleculares de 3,6-9,6 kDa.

50 Mediante ensayos prácticos puede descubrirse que la reacción de la preparación de la heparina oxidada en solución alcalina da origen a cadenas demasiado cortas, o que carecen del grado adecuado de sulfatación, para la función farmacéutica óptima de la heparina resultante. Además, mediante ensayos prácticos, puede demostrarse que el tratamiento de la preparación de heparina en una solución con un pH de menos de 1, conduce a una desulfatación del producto, y esto da origen a una heparina químicamente modificada con un efecto farmacológico no tan óptimo.

Tabla 1. Distribución de polisacáridos y su masa molecular correspondiente en DF02 (varios lotes) como % de peso acumulativo.

Masa molecular, kDa	Peso acumulativo, %
>15	3-15
>10	18-38
>9	25-47
>8	30-55
>7	40-60
>6	50-72
>5	60-80
>4	72-86
>3	>85
>2	>95

El valor correspondiente para el peso molecular promedio en peso, Mw, se encuentra en el intervalo de 6,5-9,5 kDa.

- 5 Tabla 2 Distribución de polisacáridos y su masa molecular correspondiente en DF02 como % de peso acumulativo para un lote individual.

Masa molecular, kDa	Peso acumulativo, %
>15	6,4
>10	22,6
>9	28,8
>8	36,3
>7	45,2
>6	55,3
>5	66,2
>4	77,1
>3	87,2
>2	95,6

El valor correspondiente para el peso promedio del peso molecular, Mw, es de 7,4 kDa.

Ejemplo 2

- 10 El Ejemplo 2 representa una versión modificada del procedimiento de fabricación de acuerdo con el Ejemplo 1. Se han modificado ciertos parámetros del procedimiento, tales como las temperaturas del procedimiento, con el fin de evitar cualquier despolimerización no específica en la parte inicial del procedimiento.

Oxidación de ácidos glucurónico e idurónico (restos), eliminación de la actividad anticoagulante

- 15 Se disuelve una cantidad de alrededor de 3000 gramos de heparina en agua purificada para obtener una solución del 10-20 % p/v. Se ajusta el pH de esta solución a 4,5-5,5. Con posterioridad, se agrega el metaperiodato de sodio (NaIO₄) a la solución del procedimiento; la cantidad de periodato es del 15-25 % del peso de la heparina. Se ajusta nuevamente el pH a 4,5-5,5. Se cubre el reactor para proteger la reacción de la luz. Se hace reaccionar la solución del procedimiento durante 22-26 horas bajo agitación constante y se mantiene la temperatura a 13-17 °C, mientras se baja la temperatura a alrededor de 5 °C durante las últimas dos horas. Se mide el pH al final del período de
20 reacción y se registra.

Finalización de la reacción de oxidación y eliminación de los compuestos que contienen yodo

5 Se agrega etanol (95-99,5 %) a la mezcla de reacción durante un período de 0,5-1 hora, con agitación cuidadosa y a una temperatura de alrededor de 5 °C. El volumen de etanol a ser agregado está en el intervalo de 1-2 volúmenes de etanol por volumen de solución del procedimiento. Luego, se deja precipitar y sedimentar la heparina oxidada durante 15-20 horas, después de lo cual se decanta y se desecha el licor madre.

10 Después, se disuelve el sedimento en agua purificada para obtener una solución del procedimiento del 15-30 % p/v. Luego, se agrega NaCl para obtener una concentración de 0,15-0,30 mol/litro en la solución del procedimiento. La agitación continúa durante otra 0,5-1 hora mientras que se mantiene una temperatura de alrededor de 5 °C. Con posterioridad, se agregan 1,0-2,0 volúmenes de etanol (95-99,5 %) por volumen de solución del procedimiento a esta solución con agitación cuidadosa durante un período de 0,5-1 hora. Esto precipita el producto de la solución. Esta precipitación continúa durante >1 hora.

Reducción de ácidos glucurónico/idurónico oxidados

Esta etapa se lleva a cabo de acuerdo con el Ejemplo 1.

Hidrólisis ácida para lograr la despolimerización de las cadenas de polisacáridos

15 Esta etapa se lleva a cabo de acuerdo con el Ejemplo 1, con la diferencia de que puede extenderse el tiempo de procedimiento alrededor de dos horas antes de aumentar el pH a 7,0 con NaOH.

Las etapas adicionales del procedimiento para lograr un medicamento que comprenda, por ejemplo, 150 mg/ml de agente activo de heparina químicamente modificada son idénticas a las etapas descritas en el Ejemplo 1.

20 Al llevar a cabo las etapas del procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 2 se obtiene una heparina químicamente modificada con una distribución de peso molecular de polisacáridos que se demuestra en la Tabla 1 del Ejemplo 1.

Ejemplo 3

El Ejemplo 3 representa otro procedimiento para fabricar heparinas químicamente modificadas de acuerdo con la invención modificadas al someter directamente la solución del procedimiento que llega de la etapa de oxidación a un agente reductor fuerte, antes de introducir cualquier etapa de precipitación.

Oxidación de ácidos glucurónico e idurónico (restos), eliminación de la actividad anticoagulante

25 Se disuelve una cantidad de alrededor de 3000 gramos de heparina en agua purificada para obtener una solución del 10-20 % p/v. Se ajusta el pH de esta solución a 4,5-5,5. Con posterioridad, se agrega el metaperiodato de sodio (NaIO₄) a la solución del procedimiento; la cantidad de periodato es del 15-25 % del peso de la heparina. Se ajusta nuevamente el pH a 4,5-5,5. Se cubre el reactor para proteger la reacción de la luz. Se hace reaccionar la solución del procedimiento durante 22-26 horas con agitación constante y se mantiene la temperatura a 13-17 °C. Se mide el pH al final del período de reacción y se registra.

Reacción de ácidos glucurónico/idurónico oxidados y eliminación de compuestos que contienen yodo oxidante

35 Mientras se mantiene la temperatura a 13-17 °C, se ajusta el pH de la solución a 5,5-6,5. Luego, se agrega una cantidad de 130-180 gramos de borohidruro de sodio a la solución y se disuelve, el pH aumentará de inmediato a un pH de 10-11 y la reacción continúa durante 14-20 horas. Se registra el pH de la solución, tanto antes como después de este período de reacción. Tras este tiempo de reacción, se agrega ácido diluido con lentitud para ajustar el pH a un valor de 4, lo que degrada/neutraliza el borohidruro de sodio restante. Después de mantener un pH de 4 durante 45-60 minutos, se ajusta el pH de la solución en 7 con una solución diluida de NaOH.

Retirada de compuestos que contienen yodo

40 Se agrega etanol (95-99,5 %) a la mezcla de reacción durante un período de 0,5-1 hora, con agitación cuidadosa y a una temperatura de 20-25 °C. El volumen de etanol a ser agregado se encuentra en el intervalo de 1-2 volúmenes de etanol por volumen de solución del procedimiento. Luego, se deja precipitar y sedimentar la heparina oxidada y posteriormente reducida durante 15- 20 horas, después de lo cual se decanta y se desecha el licor madre.

45 Después, se disuelve el sedimento en agua purificada para obtener una solución del procedimiento del 15-30 % p/v. Luego, se agrega NaCl para obtener una concentración de 0,15-0,30 mol/litro en la solución del procedimiento. La agitación continúa durante otra 0,5-1 hora mientras que se mantiene una temperatura de 15-25 °C. Con posterioridad, se agregan 1,0-2,0 volúmenes de etanol (95-99,5 %) por volumen de solución del procedimiento a esta solución con agitación cuidadosa durante un período de 0,5-1 hora. Esto precipita el producto de la solución. Esta precipitación continúa durante >1 hora.

50

Hidrólisis ácida para lograr la despolimerización de las cadenas de polisacáridos

Una vez decantado y desechado el licor madre, se disuelve el sedimento agregando agua purificada hasta obtener una concentración de la solución del procedimiento del 15-30 % p/v.

- 5 Se agrega ácido diluido a la solución hasta obtener un pH de 3,0. Se mantiene la temperatura a 50-55 °C mientras se agita la solución durante entre 5 y 10 horas. El avance de la despolimerización puede seguirse con un análisis en procedimiento del peso molecular, mediante GPC-HPLC para determinar el tiempo real de reacción requerido. Luego, se agrega una solución diluida de NaOH hasta obtener un pH de 7,0 y se enfría la solución de la reacción hasta una temperatura de 13-17 °C. Luego, se agrega cloruro de sodio, NaCl, hasta obtener una concentración de 0,2-0,3 mol/litro. Como alternativa, con el fin de controlar de manera similar el peso molecular promedio, puede agregarse el ácido diluido para obtener un pH de 3,5, pero para lograr un nivel comparable de hidrólisis, el tiempo del procedimiento se extiende de 5 a 8 a 9 horas, en donde ambas alternativas rinden un peso molecular promedio que se mantiene dentro del intervalo de especificación de 6,5 y 9,5 kDa.

Las etapas restantes del procedimiento para lograr un medicamento que comprenda, por ejemplo, 150 mg/ml de agente activo de heparina químicamente modificada son idénticas a las etapas descritas en el Ejemplo 1.

- 15 Al llevar a cabo las etapas del procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 3 se obtiene una heparina químicamente modificada con una distribución de peso molecular de polisacáridos que se demuestra en la Tabla 1 del Ejemplo 1.

Tabla 3. Intensidad de las señales presentes en los espectros de RMN ¹H comparado con la heparina en el intervalo de 5 a 6,5 ppm

Lote producido de acuerdo con:	Intensidad de las señales %			
	6,14 ppm	6,00 ppm	5,94 ppm	5,90 ppm
Ejemplo 1	1,0	1,0	6,0	1,0
Ejemplo 2	5,1	1,7	0	2,3
Ejemplo 3 lote 1	0	0	0	0
Ejemplo 3 lote 2	0	0	0	0
Ejemplo 3 lote 3	0	0	0	0
Heparina	0	0	0	0

- 20 La Tabla 3 es un resultado de estudios comparativos de los espectros de RMN ¹H en el intervalo de 5,0 a 6,5 ppm de heparinas químicamente modificadas producidas de acuerdo con los Ejemplos 1 a 3.

- 25 La Tabla 3 confirma que una heparina químicamente modificada fabricada mediante el procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 3 da como resultado un espectro de RMN ¹H con ausencia de señales inesperadas en el intervalo de 5,90 ppm a 6,14 ppm equivalente al de la heparina. Estas señales muestran una correlación con estructuras de doble enlace parcialmente insaturadas que contienen glucosaminas, que pueden sufrir otras modificaciones químicas y contribuir a la decoloración del producto. En otros términos, el procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 3 no da como resultado restos no identificados o estructuras que son inesperadas en los espectros de protón de heparinas convencionales o de heparina de bajo peso molecular.

- 30 Con el fin de confirmar que los procedimientos de acuerdo con la invención contribuyen a retener un nivel deseado de cadenas de polisacáridos sulfatados, se realizaron pruebas con un electrodo de medición de sulfato en muestras de líquido del procedimiento de la etapa de hidrólisis ácida, es decir, en muestras de líquido del procedimiento no sometidas a las etapas directamente posteriores de tratamiento y purificación hasta un producto de heparina químicamente modificada. Los resultados muestran niveles de sulfato liberado (perdido) a partir de los polisacáridos generalmente inferiores a 1500 ppm. En otros términos, las pruebas confirman que los procedimientos inventivos inducen a una pérdida de grupos sulfato que no excede un grupo sulfato por unidad de sacárido de 100 unidades de sacárido. Las heparinas químicamente modificadas de acuerdo con la invención contienen un grupo sulfato por ácido idurónico, I2S y 2 grupos sulfato para la variante de glucosamina predominante, GlcNS. En consecuencia, las heparinas químicamente modificadas de acuerdo con la invención retienen al menos un 90 % de grupos sulfato correspondientes a la heparina.

- 40 La heparina químicamente modificada producida de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 3 y sometida a tratamiento para dar un producto exhibe una absorbancia muy baja a 400 nm (solución al 10 %). Los valores de absorbancia varían entre 0,02 UA y 0,04 UA para un producto cuando se somete al procedimiento que incluye la hidrólisis a pH de 3,5 o 3,0, respectivamente. Los valores bajos de absorbancia confirman que se minimizan los

efectos de cualquier despolimerización no específica asociados con la decoloración de reacciones secundarias de Maillard (medidas como absorbancia a 400 nm) y que se espera una estabilidad adecuada de los productos de heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención.

Ejemplo 4

5 Efectos antihemostáticos y de anticoagulación

Se realizaron estudios de los efectos sobre los parámetros de coagulación y sobre la hemorragia después del tratamiento con DF02 en ratas Sprague-Dawley macho, adultas y jóvenes. También se estudiaron la heparina y una preparación de HBPM (Fragmin) para su comparación. Los siguientes son los procedimientos de las pruebas:

10 Quince minutos después de la aplicación de la dosis i.v. del objeto de prueba, se les practicó a las ratas una incisión longitudinal en la sección media dorsal de la cola. La incisión tenía 9 mm de longitud y 1 mm de profundidad y se unificó usando un dispositivo de plantilla. Se dejó sangrar la incisión hasta que se detuvo la hemorragia. Se midió el tiempo durante el cual se pudo observar un sangrado visible, de hasta 25 minutos. Cuanto mayor era el tiempo de sangrado, más pronunciados fueron los efectos anticoagulantes del agente administrado.

15 *Rata adulta*

Cuarenta minutos después de la aplicación de la dosis, se sacrificaron las ratas por hemorragia terminal. Se preparó plasma estabilizado con citrato a partir de la sangre. Se almacenó el plasma en alícuotas de 1 o 0,5 ml a -70 °C hasta el análisis de TTPa y TP.

Se realizaron pruebas con los compuestos siguientes (cada uno en grupos de 8 ratas) en ratas adultas:

- 20
- Solución salina: (control negativo)
 - Heparina: 0,7, 1,5, 3,5 y 7,0 mg/kg
 - Fragmin: 1,5, 3,5, 7,0 y 35 mg/kg
 - DF02: 3,5, 7,0, 35, 70, 105, 210, 350 y 700 mg/kg

Rata joven

25 Se realizaron pruebas con los compuestos y dosis siguientes (cada uno en grupos de 8 ratas) en ratas jóvenes de 14 ±1 días de vida.

2. Solución salina: (control negativo)
3. DF02: 7,0, 35, 70 y 105 mg/kg

30 Los parámetros de tiempo de sangrado y coagulación tal cual se midieron en animales adultos revelaron que DF02 ejerce un efecto anticoagulante reducido en ratas (véase la Tabla a continuación). La potencia de DF02 fue menor que la de los anticoagulantes heparina y Fragmin, que tuvieron ambos efectos profundos relacionados con la dosis sobre todos los parámetros investigados. Sin embargo, el efecto de DF02 en TP fue demasiado débil como para permitir estimaciones comparativas con los otros tratamientos.

35 Los parámetros de tiempo de sangrado y coagulación establecidos en animales jóvenes indican que DF02 ejerce un efecto anticoagulante reducido también en ratas jóvenes. El cambio en los parámetros de tiempo de sangrado y coagulación en las ratas jóvenes es de la misma magnitud que en ratas adultas. Al igual que en las adultas, el efecto de DF02 en TP fue débil también en las ratas jóvenes.

Las dosis equipotentes estimadas respecto de los efectos sobre el tiempo de sangrado y TTPa, normalizadas en comparación con heparina, se muestran en la Tabla 3 siguiente.

40 Tabla 3

	DF02	Heparina	Fragmin
Tiempo de sangrado	30-50	1	5
TTPa	30-40	1	5

Las Tablas 4 y 5 siguientes muestran los datos que demuestran la actividad inherente de DF02 sobre los parámetros de anticoagulación en la sustancia farmacéutica y el medicamento, respectivamente. El medicamento es la formulación de DF02 en 150 mg/ml en tampón fosfato, para uso clínico.

45 Los valores medidos en DF02 producido sobre la actividad del anti-factor IIa y del anti-factor Xa muestran que la actividad es menor de 10 UI/mg.

Tabla 4

	DF02	Heparina	Fragmin
Tiempo de sangrado	30-50	1	5
TTPa	30-40	1	5

La Tabla 5 siguiente muestra las actividades anticoagulantes específicas de DF02 mediante ensayos de anti-factor Xa y de anti-factor IIa.

5

Tabla 5

Sustancia farmacéutica		Resultados de lote		
Propiedad	Procedimiento	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Actividad anticoagulante de FIIa	Farmacopea europea (ensayo cromogénico)	4,6 UI/mg	5,0 UI/mg	3,8 UI/mg
Actividad anticoagulante de anti-factor Xa	Farmacopea europea	3,9 UI/mg	4,9 UI/mg	5,5 UI/mg

Para su comparación, el valor correspondiente para la heparina no fraccionada (HNF) es de al menos 180 UI/mg.

Ejemplo 5

Unión de DF02 a P-selectina, analizado con biosensor óptico

10 El fin de este estudio fue investigar las propiedades de unión de DF02 producida de acuerdo con el Ejemplo 1 a la P-selectina humana. Se compararon las propiedades de unión de DF02 con las de la tinzaparina HBPM y las de la HNF. La tinzaparina fue elegida específicamente para esta comparación, dado que un estudio controlado aleatorizado doble ciego de la tinzaparina en CVO de células falciformes (Quari y col., 2007) demostró que reducía significativamente la duración de la hospitalización así como también la duración de las puntuaciones más elevadas de dolor.

15

Procedimiento

El lote 342 de heparina de baja anticoagulación DF02 fue fabricado bajo el estado de BPF mientras que se compró la sal de sodio de heparina (lote 1035-0753, calidad farmacéutica) y tinzaparina de sodio (Innohep®, 10.000 anti-Xa UI/ml). Se desalinizaron los derivados de heparina y se transfirieron a tampón de procesamiento usando columnas de desalinización. Se determinaron las concentraciones molares de los eluatos mediante análisis de contenido de AU (mg/ml) usando el procedimiento de fenilfenol (Blumenkrantz y col., 1973, Anal Biochem 54, 484-9). Para DF02, se determinó el peso molecular promedio (Mw) mediante el National Institute for Biological Standards and Control del Reino Unido, usando cromatografía de permeación en gel (GPC-HPLC, Farmacopea europea) en 7,4 kDa (Mn = 4,1 kDa, Mp = 3,4 kDa). Se determinó el Mw para la tinzaparina y se descubrió que Mw = 6,4 kDa (Mn = 5,1 kDa, Mp = 6,5 kDa). Un valor comúnmente usado de peso molecular para la heparina es de 15 kDa aunque no es posible determinarlo por el procedimiento de GPC-HPLC. Este valor fue empleado para calcular la concentración molar aproximada de la HNF. Se analizaron las interacciones biomoleculares en tiempo real mediante tecnología de resonancia de plasmones superficiales usando un instrumento Biacore 2000 y el software de control Biacore 2000, versión 3.1.1. Se analizaron los datos usando el software BIAevaluation, versión 3. Para preparar el ensayo del biosensor, se inmovilizó el anticuerpo anti-Fc de IgG humana de cabra, purificado por afinidad de captura sobre un chip de carboximetildextrano. Se inyectó el anticuerpo en una concentración de 50 µg/ml en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 durante 12 min a 20 µl/min, lo que dio como resultado una respuesta final de alrededor de 16.200 unidades de respuesta (UR) en la célula de flujo 1 y 13.400 UR en la célula de flujo 2. Se bloquearon los grupos activados restantes con una inyección de etanolamina-HCl. Se capturó la quimera de P-selectina/Fc sobre la superficie del anticuerpo en la célula de flujo 2 (Bachelet L. y col. 2009, Biochim et Biophys Acta 1790,1416), inyectando la molécula en una concentración de 35 µg/ml, usando un tampón de procesamiento (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl2 1 mM, 0,005 % de Tween-20, pH de 7,4, filtrado de 0,02 µm) en la fase móvil. Normalmente, esto da como resultado una respuesta de alrededor de 2000 UR. Se analizó la unión de los diferentes derivados de heparina a P-selectina usando un tampón de procesamiento a 20 µl/min. Después de la fase de asociación y disociación de cada muestra, se llevó a cabo una regeneración de la superficie usando tampón de procesamiento que contenía NaCl 0,8 M. Se sustrajeron los datos de la superficie de referencia de los datos de la superficie de P-selectina. Se verificó la estabilidad de la superficie de P-selectina midiendo la respuesta de las inyecciones de 0,1 mg/ml de heparina al comienzo y al final de cada experimento.

40

Resultados

Se representaron gráficamente los datos de respuesta en estado de equilibrio en comparación con la concentración (no se muestran los datos). Se analizaron los datos usando regresión no lineal, suponiendo una unión de 1:1. Esta suposición da valores de KD aparentes de 0,7 μM para DF02, 4 μM para la tinzaparina y 0,2 μM para la heparina. Se empleó el valor máximo (Mp) en vez del valor Mw (mayor) al calcular las concentraciones molares de la HNF. Esto da como resultado una sobreestimación de las concentraciones molares usadas en el experimento así como también una sobreestimación del valor de KD para la HNF.

En conclusión, DF02, así como también la HNF y la tinzaparina HBPM, se une a la P-selectina humana *in vitro*. Los valores de KD aparentes presentaban este orden: tinzaparina > DF02 > HNF. Los datos sugieren que el mayor peso molecular promedio del derivado de heparina da como resultado una mayor afinidad aparente (o avidez) por la superficie de P-selectina, y que la unión no depende de la actividad anticoagulante de la heparina.

Ejemplo 6

Adhesión de los glóbulos rojos falciformes *in vitro*

Con el fin de determinar la eficiencia terapéutica en DC se realizaron estudios *in vitro* sobre la capacidad de DF02 para inhibir la adhesión de los glóbulos rojos falciformes (SS RBC) a células endoteliales. Se comparó la actividad de DF02 con anticuerpos monoclonales inhibitorios de P-selectina así como también con tinzaparina HBPM. La tinzaparina fue elegida específicamente dado que un estudio controlado aleatorizado doble ciego de la tinzaparina en CVO de células falciformes demostró que reducía significativamente la duración de la hospitalización así como también la duración de los niveles más elevados de dolor.

Procedimiento

Se cultivaron HUVEC primarias (pasaje 4 solamente) hasta su confluencia en placas recubiertas con gelatina en medio basal de Eagle 2 (EBM2; Clonetics, Walkersville, MD) suplementado con medio de desarrollo endotelial 2 (EGM2; Clonetics, Walkersville, MD). Para cada ensayo se montó una placa recubierta con gelatina con HUVEC desarrolladas hasta su confluencia dentro de una cámara de flujo de altura graduada. En un principio, se estudiaron las placas estimuladas con IL-13/histamina y sin tratar con cada muestra de SS RBC. Luego, experimentos posteriores compararon la adhesión con y sin potenciales inhibidores de adhesión. Además, se usó tinzaparina para comparar la actividad anti-adhesiva de DF02 y se usaron anticuerpos de bloqueo y no bloqueo de P-selectina como controles para confirmar la adhesión de SS RBC a la P-selectina.

Se recolectaron muestras de sangre humana de pacientes homocigotos para la hemoglobina S en tubos con citrato. Se separaron las SS RBC de la capa leucocítica por gravedad a 4 °C durante al menos 2 horas, y luego se lavaron las SS RBC 4 veces en PBS estéril con Ca^{2+} 1,26 mM y Mg^{2+} 0,9 mM (pH 7,4). Se marcaron de forma fluorescente las SS RBC concentradas para estudios de adhesión tal como se describió con anterioridad (Zennadi y col., 2004).

Sistema de prueba: Metodología de cámara de flujo

Los estudios *in vitro* de adhesión celular expuestos a condiciones de flujo representan acontecimientos *in vivo* en comparación con los ensayos de adhesión en los que simplemente se dejan incubar las células apoyadas sobre un sustrato químico o celular (por ejemplo, laminina o células endoteliales) y luego, se retiran por lavado mediante fuerzas no controladas (por ejemplo, lavados con pipeta) o bien con fuerzas controladas (por ejemplo, dispositivos de movimiento giratorio). Las cámaras de flujo pueden producir un esfuerzo de cizalla constante en toda la cámara o bien, un esfuerzo de cizalla variable producido por la creación de una altura variable para la cámara.

Confirmación de la expresión de P-selectina por parte de células endoteliales después de la estimulación con IL-13 e histamina, mediante el uso de inmunofluorescencia indirecta y análisis de citometría de flujo

Se realizaron pruebas de la expresión superficial de P-selectina sobre células endoteliales no estimuladas y estimuladas con histamina e IL-13 (HUVEC) por citometría de flujo. Se llevó a cabo una medición de la capacidad de adhesión de SS RBC a estas células endoteliales en cámaras de flujo. Los experimentos de control negativo incluyeron células endoteliales no tratadas, para poder comparar la adhesión de SS RBC en las células tratadas y no tratadas. En general, se realizaron pruebas en las muestras de SS RBC de al menos 5 pacientes en cada grupo de condiciones, mediante el uso de diferentes disoluciones de DF02, con los experimentos control descritos con anterioridad.

Estimulación de la expresión de P-selectina mediante células endoteliales de vena de cordón umbilical humanas

Se realizaron múltiples experimentos de determinación de dosis. Asimismo, se demostró la dependencia de la adhesión de SS RBC en P-selectina mediante el uso del anticuerpo anti-P-selectina monoclonal 9E1 para inhibir la adhesión de SS RBC a HUVEC estimuladas con IL-13 + histamina.

Resultados

En general, la DF02 fue capaz de inhibir la adhesión de SS RBC a células endoteliales tratadas con IL-13 e histamina, y esta inhibición mostró una modesta relación entre dosis y respuesta (Figura 5). La adhesión a HUVEC estimuladas con IL-13 e histamina fue mayor que la adhesión a HUVEC estimuladas de forma similar pretratadas con DF02 en 100, 200, 400 y 600 µg/ml ($p = 0,047, 0,031, 0,094, 0,065$), respectivamente, mediante el uso de una prueba t para datos emparejados en la que se comparó la muestra de cada paciente solamente consigo misma antes del tratamiento de DF02. En un análisis similar, 7,5 µg/ml de anticuerpo monoclonal de bloqueo de P-selectina funcional 9E10 también redujo la adhesión de forma significativa ($p = 0,038$, Figura 5).

Tal como se ilustra en la Figura 6A, que representa un gráfico de muestras, se cuantificaron los acontecimientos de adhesión en múltiples esfuerzos de cizalla. Dado que la adhesión basal de SS RBC de diferentes pacientes varió en gran medida, es más válido comparar las SS RBC de cada paciente en distintos niveles de esfuerzo de cizalla y pre- y postratamiento con DF02. La inhibición tendió a ser más pronunciada con mayores dosis de DF02 y en pacientes con una adhesión basal más alta (Figura 6B). Si se dividía en grupos de adhesión alta y baja, había una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de 100 µg/ml de DF02 ($p = 0,02$), en la que el grupo de alta adhesión respondió mejor al tratamiento. En dichos análisis, también pareció que DF02 100 µg/ml inhibió la adhesión tanto como lo hicieron las concentraciones mayores (Figura 6B).

La DF02 inhibió la adhesión de SS RBC como lo muestra en detalle la Figura 7. Aunque hubo menos acontecimientos de adhesión con esfuerzos de cizalla mayores, el efecto de la DF02 fue similar (no se muestran los datos). Sin embargo, se observó un pequeño efecto cuando se usó DF02 en 10 y 50 µg/ml, mientras que fue fácilmente detectable el efecto de 100 µg/ml.

Asimismo, se comparó la DF02 con la tinzaparina en cuanto a su capacidad de inhibir la adhesión de SS RBC a células endoteliales. En general, la tinzaparina resultó bastante eficaz para reducir la adhesión de SS RBC. Para la mayoría de las muestras, la DF02 en 400 µg/ml fue equivalente a la misma concentración de tinzaparina (véanse las Figuras 8A y 8B, con la Figura 7).

Conclusión

En resumen, la DF02 es activa como inhibidor de adhesión de SS RBC a células endoteliales más probablemente a través de P-selectina. Una fuente de variabilidad podrían ser las células de los pacientes, dado que podría variar su expresión de ligandos de varios receptores de adhesión de células endoteliales, inclusive P-selectina y $\alpha v\beta 3$. Además, el estado de activación de los receptores de adhesión de eritroide podría variar de paciente a paciente. Sin embargo, casi todas las muestras de pacientes mostraron una menor adhesión en presencia de DF02, y el grado de inhibición de la adhesión fue, en general, más pronunciado con las muestras que contenían células altamente adherentes. La DF02 es un agente de antiadhesión útil en la DC, tanto para reducir la adhesión de RBC como para reducir potencialmente la adhesión de leucocitos, que también se demostró que depende de las selectinas, al menos parcialmente.

Ejemplo 7

Modelo de vaso-oclusión funcional *in vivo*

Con el fin de verificar los datos en los ejemplos *in vitro* previamente presentados, se evaluó la DF02 mediante el uso de un modelo animal de vaso-oclusión por células falciformes. El objetivo del estudio fue investigar la actividad de la DF02 en el bloqueo de la adhesión de glóbulos rojos falciformes y la vaso-oclusión por células falciformes mediante el uso de ensayos *in vivo* de la adhesión de glóbulos rojos falciformes (SS RBC) al endotelio, con y sin infusión de DF02, o control positivo o negativo, en el modelo de vaso-oclusión de ratón desnudo de cámara de ventana.

Procedimiento

Estos experimentos usan un modelo animal previamente descrito (Zennadi y col., Blood 2007), en el que primero se implantan cámaras de ventana a los flancos de los ratones desnudos. De tres a cinco días más tarde, se infunden glóbulos rojos humanos normales o falciformes en el ratón (usualmente a través de la vena de la cola) previamente tratados con TNF- α (para inducir inflamación y aumentar la expresión de P-selectina); los ratones tratados solo con el vehículo pueden ser estudiados como controles. Se usaron ratones hembra (nu-/nu) de 8 a 12 semanas de vida de Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, para realizar los experimentos descritos.

Se marcaron previamente las células RBC a ser infundidas con un colorante fluorescente. Luego, pudo observarse la adhesión de las células en vasos sanguíneos subdérmicos visibles a través de las cámaras de ventana previamente implantadas. Para determinar la capacidad de la DF02 de inhibir la adhesión de RBC, se infundió DF02 o un reactivo de control a ratones tratados con TNF- α antes de la infusión de SS o células RBC normales. Además, en algunos de estos experimentos se extrajeron muestras de sangre durante el período de observación para cuantificar las variables específicas, tales como la supervivencia de las células. Este modelo tiene la gran ventaja de proporcionar una visualización directa de las células en el contexto de la sangre completa y de permitir la circulación de las células transfundidas bajo presiones circulatorias normales. Además, los inventores han demostrado

previamente que los glóbulos rojos falciformes humanos se adhieren al endotelio, inducen la adhesión de los leucocitos e inducen la vaso-oclusión en este sistema modelo. Por último, los inventores han demostrado que no hay inmunoaclaramiento detectable de glóbulos rojos humanos en estos ratones nu/nu.

Resultados

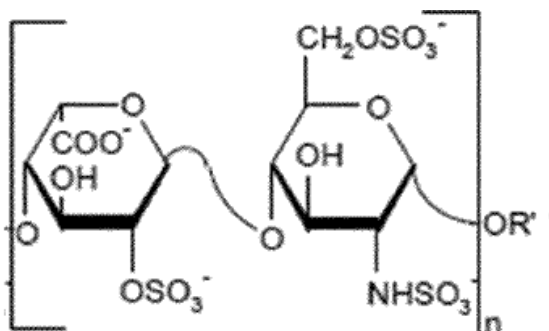
- 5 Se realizaron estudios del efecto de la DF02 en la vaso-oclusión mediante la inyección de DF02 tanto antes como después de la inducción de la vaso-oclusión. En este sistema modelo, la ocupación de SS RBC adheridas puede cuantificarse así como también el flujo sanguíneo. El modelo muestra una inhibición y una reversión de las SS RBC adheridas con DF02 y una normalización parcial del flujo sanguíneo.
- 10 Ocupación de vasos; se redujo una medición de la capacidad de SS RBC para unirse a la pared de los vasos sanguíneos en 50 % con una inyección de DF02, en comparación con una inyección de solución salina (Figura 9A).
- Además, al cuantificar la cantidad de vasos que alcanzaron un flujo de sangre normalizado, se detectó un efecto que depende de la dosis cuando se trató a los animales con DF02 (Figura 9B).

REIVINDICACIONES

1. Heparina químicamente modificada para su uso en el tratamiento de drepanocitosis, teniendo dicha heparina químicamente modificada una actividad de antifactor IIa de menos de 10 UI/mg, una actividad de antifactor Xa de hasta 10 UI/mg y un peso molecular promedio en peso de 6,5 a 9,5 kDa, en la que las cadenas de polisacáridos:

- 5 (i) retienen al menos el 90 % de los grupos sulfato de la heparina natural correspondiente;
 (ii) tienen una reducción en las secuencias de pentasacáridos químicamente intactas, lo que proporciona un efecto anticoagulante mediado por antitrombina, al compararlo con las cadenas de polisacáridos de heparina natural;
 10 (iii) tienen una reducción en unidades de ácido glucurónico y/o idurónico no sulfatado al compararlo con heparina natural;

en la que el disacárido predominante del polisacárido es un disacárido que tiene la estructura química:



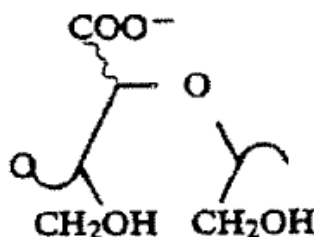
en la que R' es un resto de treonato; y n es un número entero de 2 a 25, de manera que comprende de 2 a 25 unidades de disacáridos correspondientes a pesos moleculares de 1,2 a 15 kDa; y

- 15 en la que la heparina químicamente modificada no tiene, en un espectro de RMN ¹H, señales no identificadas en los intervalos 0,10-2,00 ppm, 2,10-3,10 ppm y 5,70-8,00 ppm mayores que el 4 por ciento en comparación con la altura de la señal presente en la heparina natural de 5,42 ppm.

20 2. Heparina químicamente modificada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las cadenas de polisacáridos que se presentan predominantemente tienen de 6 a 16 unidades de disacáridos con pesos moleculares de 3,6 a 9,6 kDa.

3. Heparina químicamente modificada para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que al menos el 30 % de las cadenas de polisacáridos tienen un peso molecular de al menos 8 kDa.

4. Heparina químicamente modificada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende restos de escisión de glicol de la estructura química:



25 5. Heparina químicamente modificada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el 3-15 % de las cadenas de polisacáridos tienen un peso molecular de al menos 15 kDa.

6. Heparina químicamente modificada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el 25-47 % de las cadenas de polisacáridos tienen un peso molecular de al menos 9 kDa.

30 7. Heparina químicamente modificada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el 40-60 % de las cadenas de polisacáridos tienen un peso molecular de al menos 7 kDa.

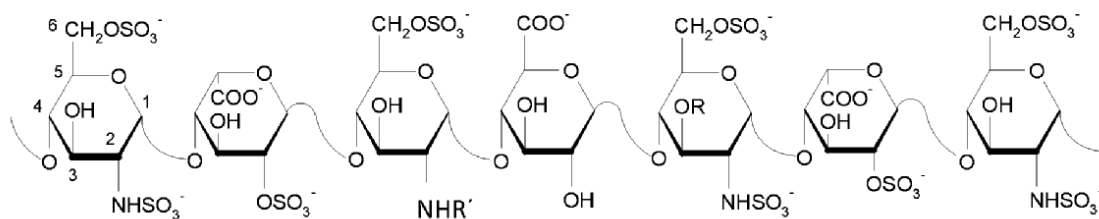
8. Heparina químicamente modificada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el 60-80 % de las cadenas de polisacáridos tienen un peso molecular de al menos 5 kDa.

9. Heparina químicamente modificada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la

que al menos el 85 % de las cadenas de polisacáridos tienen un peso molecular de al menos 3 kDa.

10. Heparina químicamente modificada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que al menos el 95 % de las cadenas de polisacáridos tienen un peso molecular de al menos 2 kDa.

5 11. Heparina químicamente modificada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la drepanocitosis comprende crisis vaso-oclusivas.

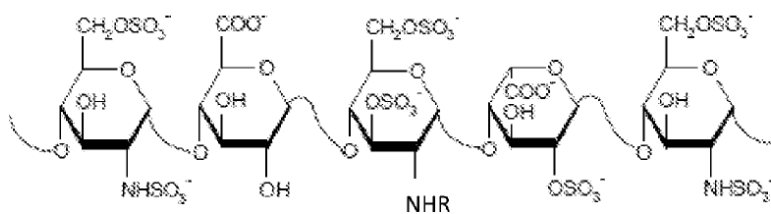


GlcN - AU - GlcN - AU - GlcN - AU - GlcN

R = -H or -SO₃⁻

R' = COCH₃ or -SO₃⁻

Fig. 1



R = COCH₃ or -SO₃⁻

Fig. 2

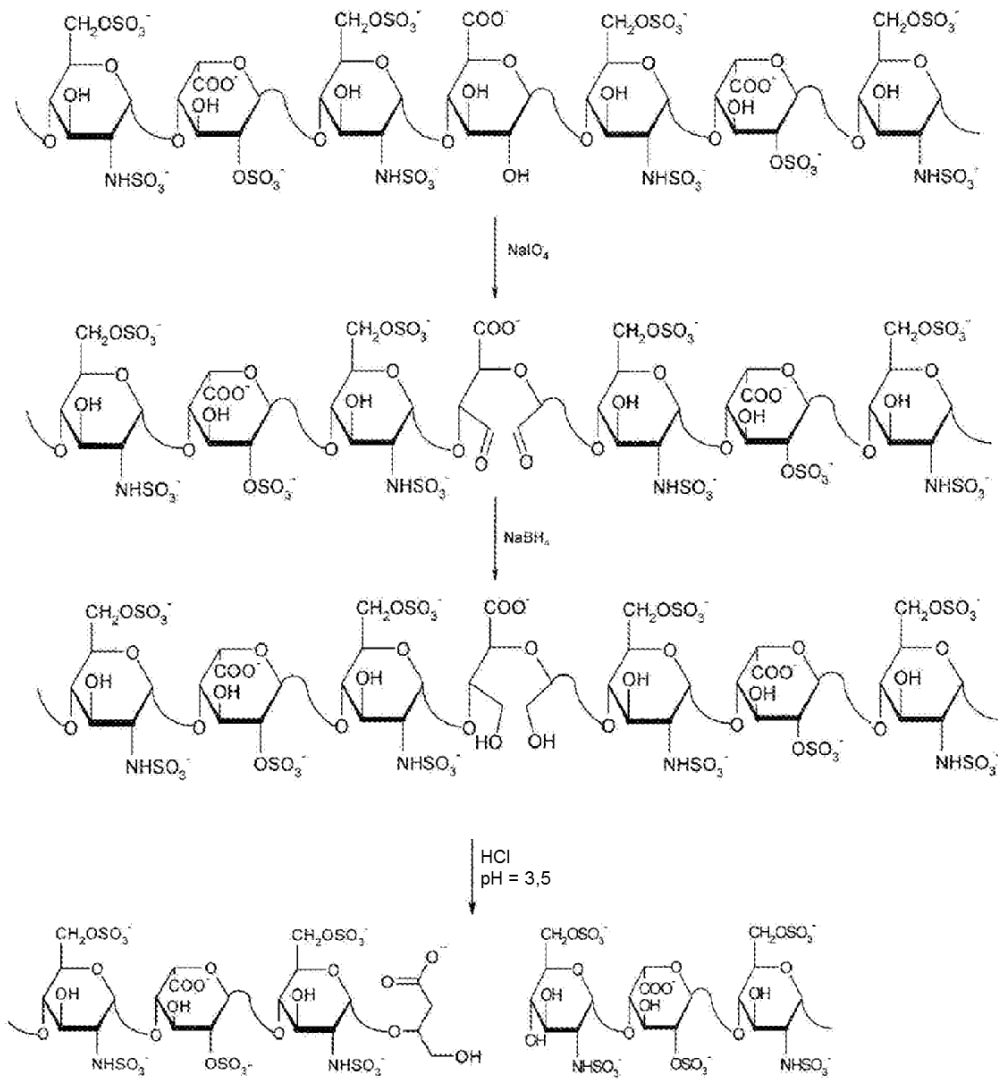


Fig. 3

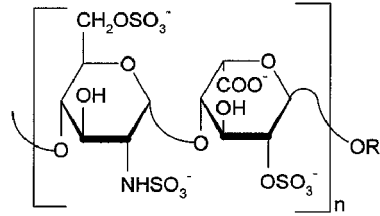


Fig. 4

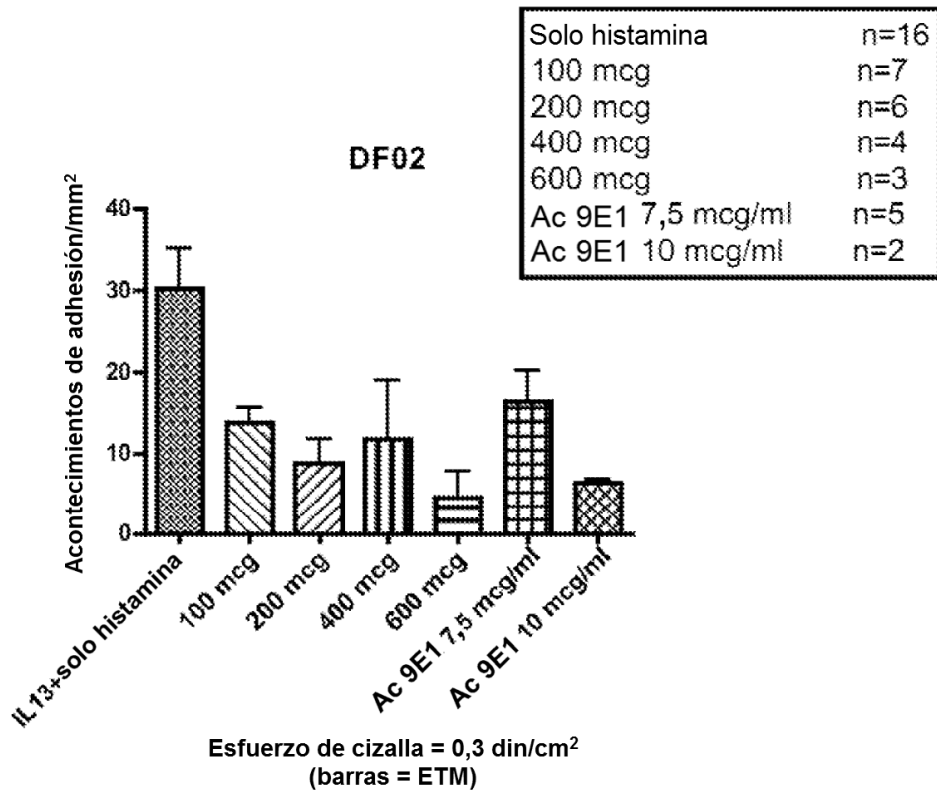


Fig. 5

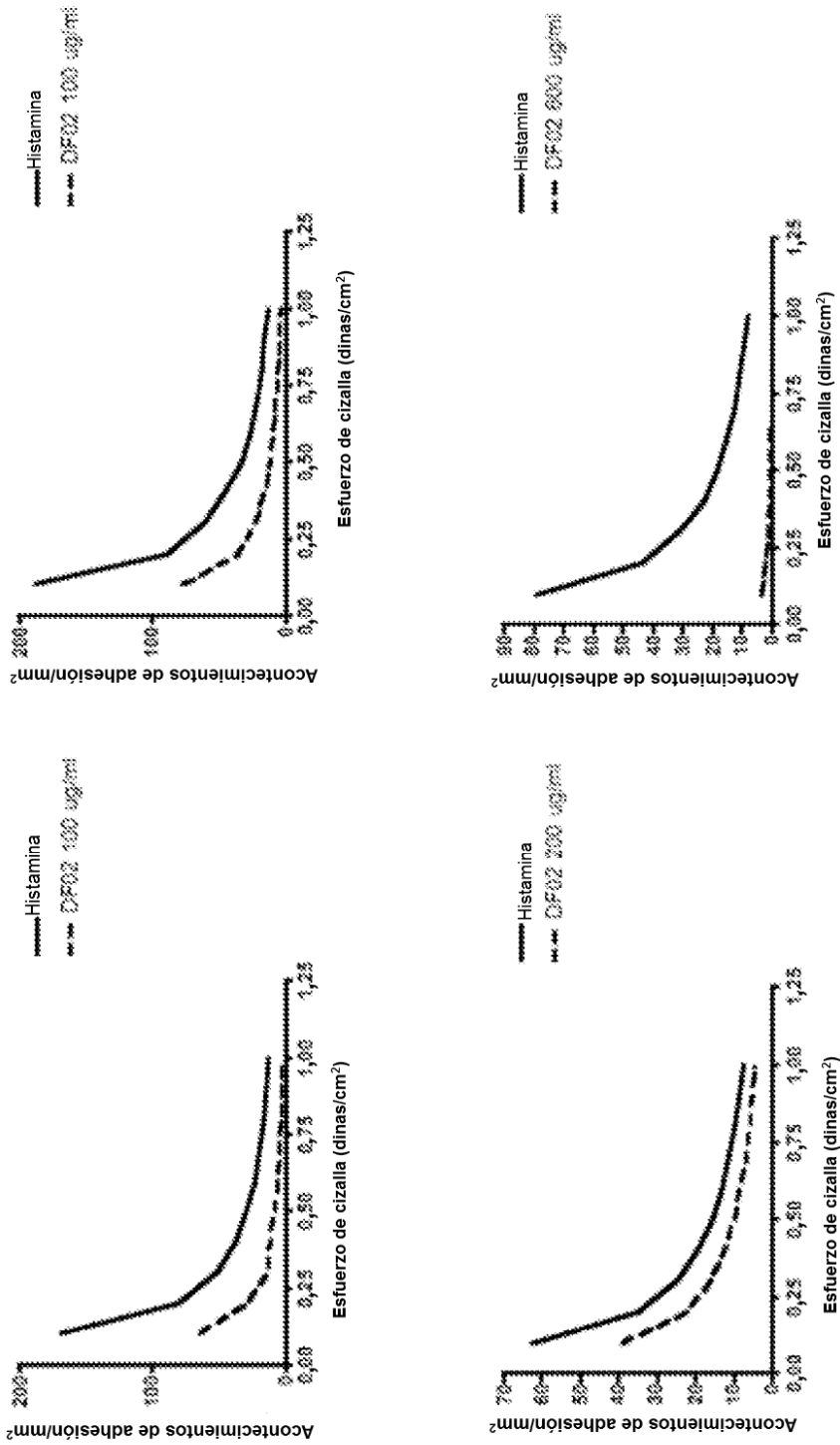


Fig. 6A

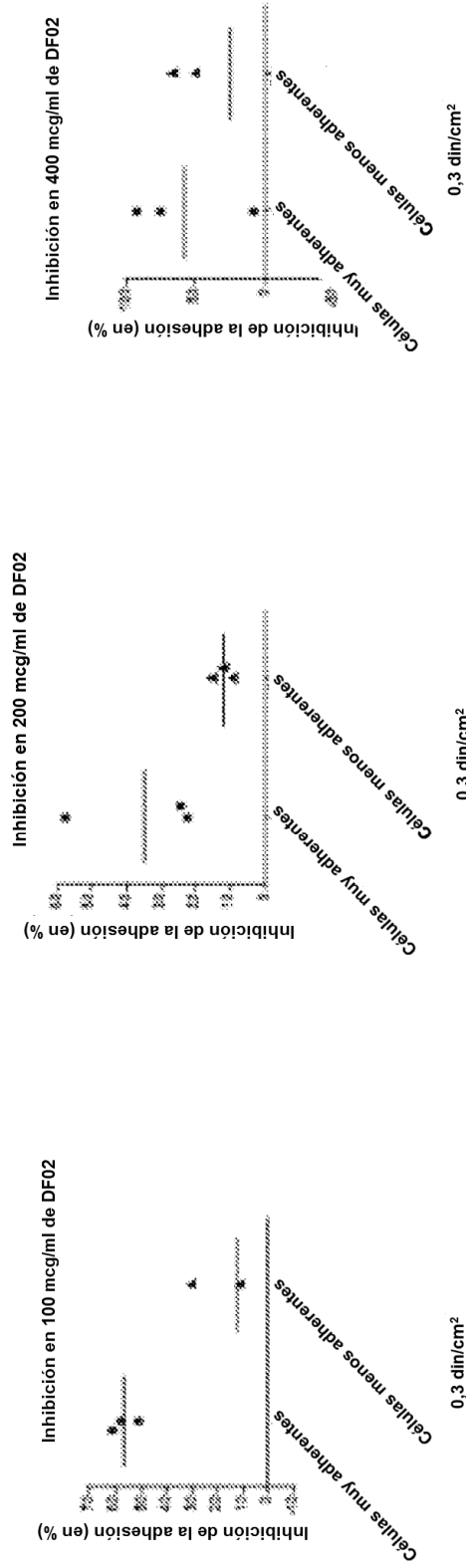


Fig. 6B

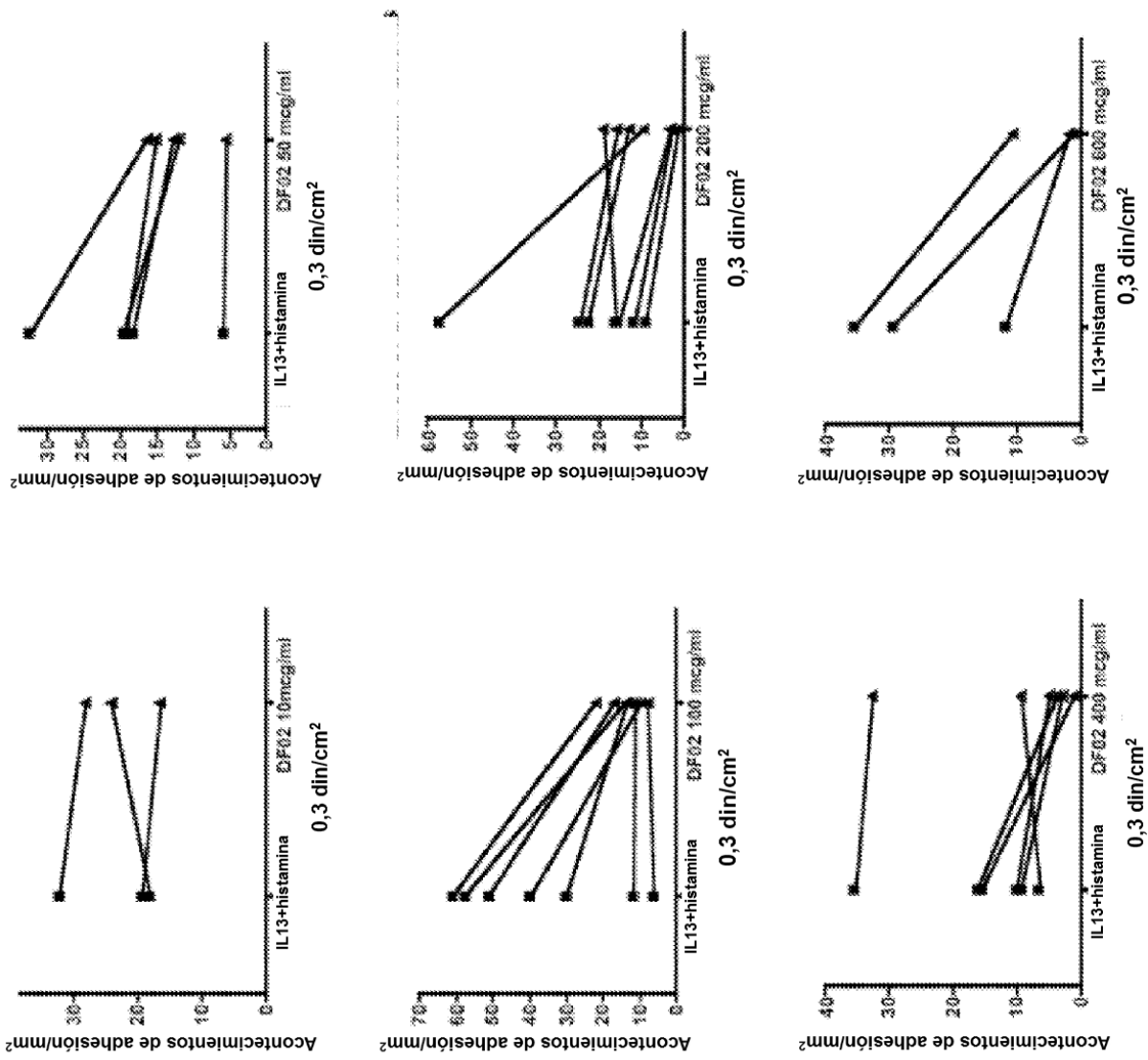


Fig. 7

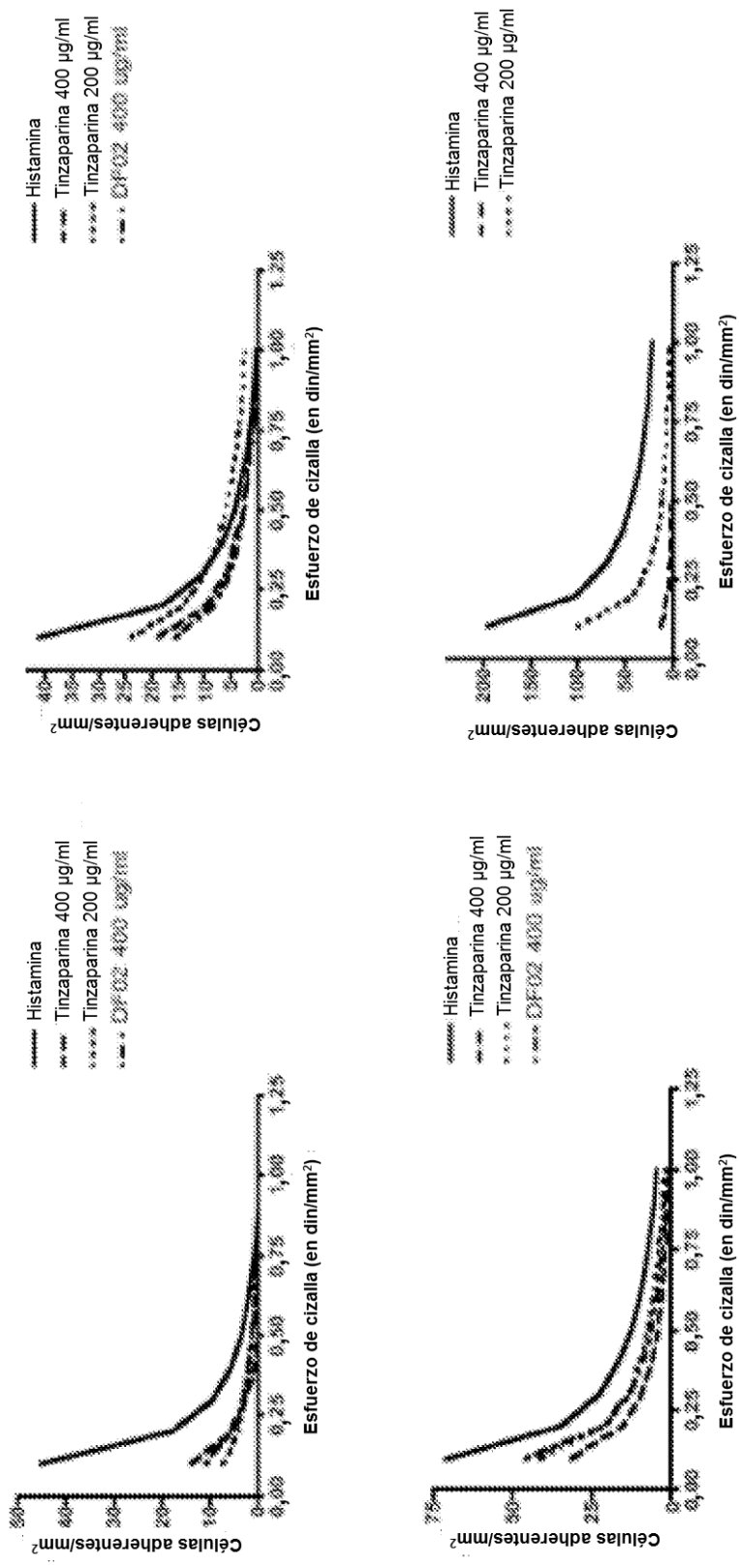


Fig. 8A

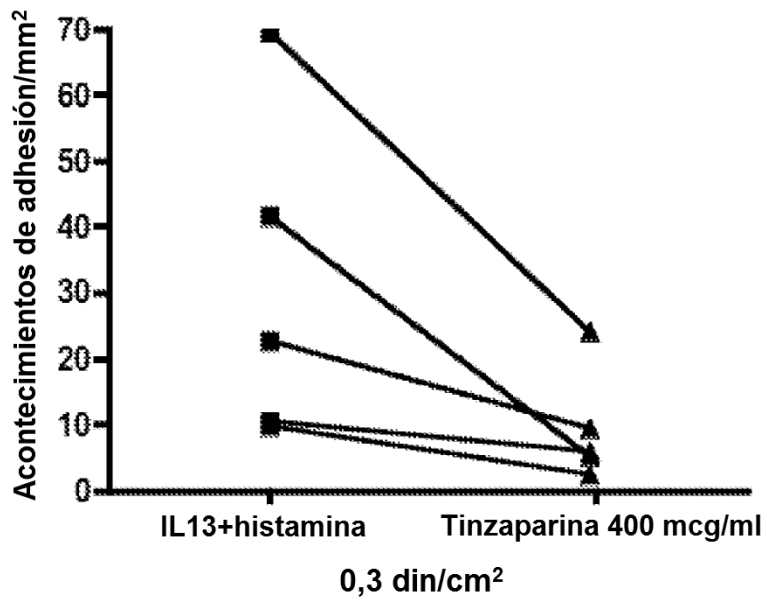
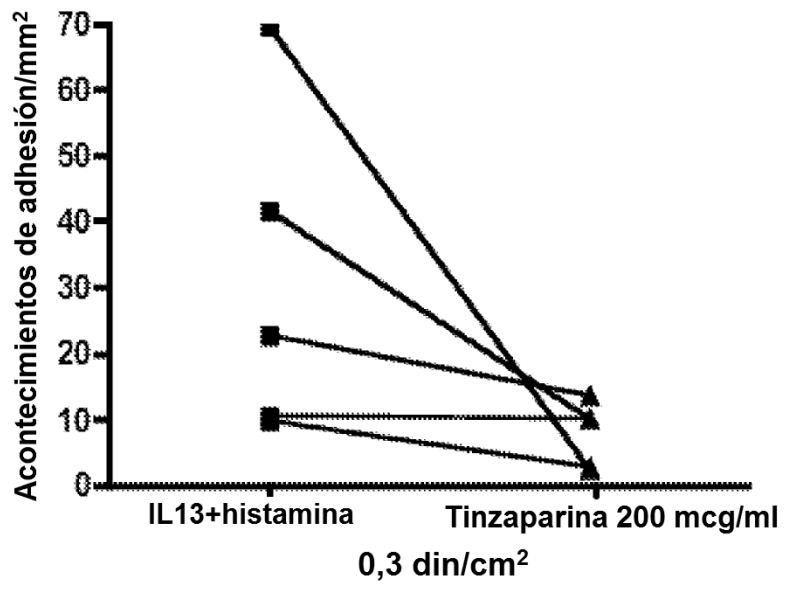
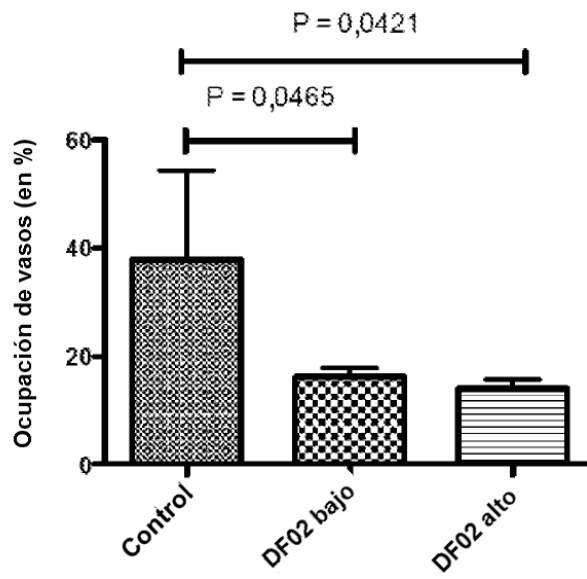
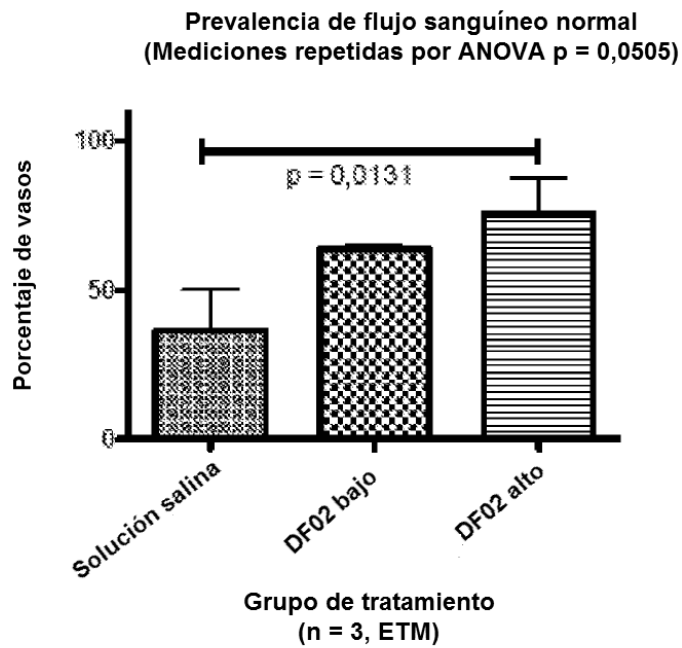


Fig. 8B



Solución salina comparada con DF02 *in vivo*
(n = 5, ETM)

Fig. 9A



Grupo de tratamiento
(n = 3, ETM)

Fig. 9B