

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 055**

51 Int. Cl.:

C08B 37/10 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

A61P 33/06 (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/SE2012/051428**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13095276**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12860938 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2794667**

54 Título: **Heparinas con bajo efecto anticoagulante**

30 Prioridad:
19.12.2011 WO PCT/SE2011/051538

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2018

73 Titular/es:
MODUS THERAPEUTICS AB (100.0%)
Sankt Eriksgatan 117
113 43 Stockholm , SE

72 Inventor/es:
EKRE, HANS-PETER;
LINDAHL, ULF;
HOLMER, ERIK;
ERIKSSON, PER-OLOV;
LEITGEB, ANNA;
WAHLGREN, MATS;
TIDIA, STEFANIA y
LIVERANI, LINO

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 669 055 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

Heparinas con bajo efecto anticoagulante

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a heparinas químicamente modificadas con una baja actividad anticoagulante y procedimientos para su producción. Las heparinas químicamente modificadas son útiles para el tratamiento de trastornos en los que se ha considerado eficaz la heparina, pero considerados demasiado susceptibles de efectos secundarios, como la malaria.

Antecedentes de la invención

10 La heparina es un glicosaminoglicano (GAG) natural sintetizado por los llamados mastocitos y almacenado intracelularmente en seres humanos y animales. Preparada a escala industrial a partir de mucosa intestinal porcina, la heparina es un potente anticoagulante y se lleva utilizando clínicamente más de 60 años como fármaco de preferencia para la profilaxis y tratamiento de trastornos tromboembólicos. Los principales posibles efectos adversos del tratamiento con heparina son complicaciones de hemorragias causadas por sus propiedades anticoagulantes. La heparina es altamente polidispersa y está compuesta de una población heterogénea de polisacáridos con pesos
15 moleculares comprendidos entre 5 y 40 kDa, siendo el promedio de aproximadamente 15 a 18 kDa.

Las heparinas de bajo peso molecular (LMWH por sus siglas en inglés) de acuerdo con la farmacopea europea 6.0 se definen como "sales de GAG sulfatadas que tienen una masa molecular promedio en masa de menos de 8 y para las cuales al menos un 60 por ciento de la masa total tiene una masa molecular inferior a 8 kDa." Las heparinas de
20 baja masa molecular presentan diferentes estructuras químicas en el extremo reductor o no reductor de cadenas de polisacárido." "La potencia está por encima de 70 UI de actividad anti-factor Xa por miligramo calculado en relación con la sustancia deshidratada. La relación entre la actividad anti-factor Xa y actividad anti-factor IIa es como mínimo 1,5." Las LMWH utilizadas clínicamente tienen pesos moleculares comprendidos entre 3 y 15 kDa con un promedio de aproximadamente 4 a 7 kDa. Producida por despolimerización/fraccionamiento controlado de heparina, LMWH presenta propiedades farmacológicas y farmacocinéticas más favorables, incluyendo una menor tendencia a inducir
25 hemorragia, mayor biodisponibilidad y una semivida prolongada tras la inyección subcutánea.

La heparina ejerce su actividad anticoagulante principalmente a través de la unión de alta afinidad y la activación del inhibidor de la proteinasa de serina, antitrombina (AT). Dicha unión está mediada por una secuencia de pentasacárido específica. AT, un importante inhibidor fisiológico de la coagulación de la sangre, neutraliza los
30 factores de coagulación activados formando un complejo estable con estos factores. La unión de heparina causa un cambio conformacional en AT que potencia de forma espectacular la tasa de inhibición de los factores de coagulación, atenuando así la coagulación de la sangre y la formación de coágulos de la sangre.

La infección causada por *Plasmodium falciparum* suele dar lugar frecuentemente a la malaria en los seres humanos. Los eritrocitos parasitados (Ep) tienen la capacidad de unirse (*in vivo*: secuestrar) en la microvasculatura profunda, así como a eritrocitos no infectados, las llamadas rosetas. El secuestro y la formación de rosetas de Ep aumenta la
35 generación de una enfermedad grave cuando la unión es excesiva: bloqueo del flujo sanguíneo, reducción del suministro de oxígeno y lesiones del tejido. Se ha señalado la heparina como un útil agente en el tratamiento de la patología que se produce durante la malaria grave. Anteriormente, se empleaba la heparina en el tratamiento de malaria grave, dada la presencia señalada de coagulación intravascular diseminada (CID) en los pacientes con malaria, pero se interrumpió como consecuencia de los efectos secundarios graves que se producían, como hemorragias intracraneales. Por otra parte, se observó que la agregación de Ep no se debe principalmente a la
40 coagulación de la sangre, sino a interacciones no covalentes entre una proteína inducida por parásito en las superficies de Ep y heparán sulfato (un GAG relacionado con heparina) en los eritrocitos y las células endoteliales vasculares. El efecto de heparina se atribuye a su capacidad para competir por esta interacción (Vogt y col., PLoS Pathog. 2006; 2, e100). Por tanto, existe una necesidad médica de contar con un derivado de heparina con un potencial de actividad anticoagulante e inducción de la hemorragia marcadamente reducido diseñado por lo que
45 respecta a su distribución de cadenas cargadas y de tamaño adecuado. La patente estadounidense No. 5.472.953 (Ekre y col.) desvela el uso de heparinas con una actividad anticoagulante reducida para el tratamiento de malaria.

AM Leitgeb y col. in Am. J. Trop. Med. Hyg. 2011, vol. 84(3), pp. 380-396 notifica prometedores estudios con heparinas con baja actividad anticoagulante, que según se observa rompen las rosetas de aislados clínicos recientes
50 de pacientes con malaria.

En suma, un derivado de heparina que mantenga las características polianiónicas de la heparina en los aspectos esenciales, pero que carezca de un efecto anticoagulante sería un excelente candidato para el tratamiento de malestares en los que el efecto anticoagulante de heparina se considere un grave efecto secundario.

Descripción de la invención

55 La presente invención se refiere a heparinas químicamente modificadas que se preparan selectivamente para que retengan los efectos terapéuticos de las cadenas de polisacárido, al mismo tiempo que presentan un efecto

anticoagulante bajo.

En el contexto de la presente invención, actividad anti-coagulante de heparina se refiere a la función clínica de potenciar la inhibición de factores de coagulación Xa y IIa (trombina) mediante AT. En la descripción expuesta a continuación, se definirán otros términos en cada contexto correspondiente.

5 En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para preparar heparina químicamente modificada con una actividad anti-factor IIa inferior a 10 UI/mg, una actividad anti-factor Xa inferior a 10 UI/mg y un peso molecular promedio (peso molecular medio ponderado, Pm) de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5 kDa. El procedimiento comprende una etapa de oxidación selectiva de la heparina presente en una solución acuosa sometiéndola a un agente oxidante capaz de oxidar los restos sacárido no sulfatados y seguido de la reducción de los restos sacárido oxidados resultantes. El procedimiento comprende asimismo la despolimerización de las cadenas de heparina oxidadas y reducidas por hidrólisis a un pH ácido de aproximadamente 3 a aproximadamente 4. El procedimiento puede llevarse a cabo en la secuencia general, consecutivamente, por oxidación, reducción y despolimerización con hidrólisis de la manera que se acaba de describir, si bien es posible añadir otras etapas del procedimiento en cualquier orden adecuado.

15 La despolimerización se lleva a cabo a una temperatura de al menos aproximadamente 20 °C para obtener cadenas convenientemente fraccionadas con pesos moleculares deseables. Para promover la selección de cadenas deseables, el procedimiento incluye por lo general también una etapa de enriquecimiento de cadenas de polisacárido que tienen un peso molecular de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 10,5 kDa. La etapa de enriquecimiento incluye generalmente procedimientos cromatográficos, de filtración o tamizado convencionales perfectamente conocidos entre las personas especializadas en la fabricación de biopolímeros.

Los procedimientos de acuerdo con la invención comprenden además al menos una etapa de eliminación del agente de oxidación sobrante.

25 Por otra parte, los procedimientos de acuerdo con la invención comprenden al menos una etapa de eliminación que incluye la eliminación de las formas reducidas del agente de oxidación. En este contexto, formas reducidas significa el agente de oxidación transformado en las formas reducidas desde los restos que contribuyen a la oxidación del sacárido diana en la heparina. También, dentro de este contexto, la etapa de reducción puede comprender la adición de un agente reductor que, aparte de reducir la heparina oxidada, contribuye al consumo (reducción) del agente oxidante sobrante.

30 El procedimiento de acuerdo con la invención comprende una etapa de eliminación de cualquier agente oxidante sobrante y la eliminación de las formas reducidas del agente de oxidación entre la etapa de reducción descrita y la etapa de despolimerización descrita. La despolimerización se puede llevar a cabo por hidrólisis a un pH comprendido entre 3,0 y 3,5.

35 Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas sucesivas de oxidación selectiva de una heparina sin fraccionar sometiéndola a un agente de oxidación capaz de oxidar sacáridos no sulfatados, reducción de los sacáridos oxidados resultantes; eliminación del agente de oxidación sobrante y las formas reducidas del agente de oxidación; y despolimerización de las cadenas de heparina por hidrólisis a un pH ácido comprendido entre 3 y 4 (por ejemplo de aproximadamente 3 a aproximadamente 3,5).

40 La etapa de eliminación puede comprender la adición de un alcohol en una cantidad suficiente para hacer precipitar la heparina químicamente modificada. El alcohol puede ser metanol, etanol o alcoholes similares y admite la precipitación de heparina químicamente modificada, al tiempo que se eliminan el agente de oxidación y sus formas reducidas con el alcohol.

45 La etapa de eliminación puede incluir también la adición de un agente de enfriamiento capaz de inactivar químicamente el agente de oxidación para que no siga ejerciendo los efectos oxidantes en la heparina. Generalmente, los autores de la invención consideran que la etapa de eliminación o las etapas de eliminación así descritas podrían contribuir a contrarrestar o reducir al mínimo la despolimerización no específica de heparina, es decir, los efectos de despolimerización no atribuibles a los resultados predecibles de la hidrólisis ácida. La despolimerización no específica puede tener como resultado una pérdida impredecible del peso molecular, productos descoloridos (con valores de absorbancia inestables), otros problemas relacionados con la estabilidad y la aparición de restos no identificados no previstos en la heparina o las heparinas de bajo peso molecular.

50 La introducción de una etapa de eliminación tras la etapa de oxidación da cabida a un mejor control con respecto a cualquier despolimerización no específica. Otra forma de controlar una despolimerización no específica, aplicable con cualquiera de los procedimientos descritos, es reducir la temperatura significativamente por debajo de la temperatura ambiente durante la etapa o etapas de precipitación anteriores cuando se añade un alcohol. Por ejemplo, se puede reducir la temperatura a aproximadamente 5 °C para evitar las reacciones no deseadas que tienen como resultado una despolimerización no específica.

De acuerdo con la presente invención, La heparina se oxida selectivamente, en virtud de lo cual se inhibe el efecto anticoagulante mediado por la interacción entre AT y el pentasacárido específico. La oxidación fracciona

selectivamente glicoles con 2 hidroxilos libres adyacentes y el producto resultante se denomina producto de "glicol fraccionado". Para este fin, se trata la composición de heparina sin fraccionar con un compuesto periodato, como por ejemplo metaperiodato de sodio en un medio de reacción adecuado, por ejemplo siguiendo las divulgaciones de la patente estadounidense No.4.990.502. Otros agentes de oxidación serían útiles si tuvieran el mismo impacto químico en los restos no sulfatados, sin dañar los niveles críticos de los sulfatos, tal como se requiere en el producto final. Cuando se utiliza el compuesto periodato como agente de oxidación, se reduce a yodato y, posteriormente, en la etapa de reducción, a otras formas inertes de yodo, a las que se hace referencia de forma colectiva como "compuestos de yodo". La etapa de eliminación de los procedimientos de la invención sirve para eliminar o reducir al mínimo el efecto oxidante de cualquiera de los compuestos de yodo y eliminar los compuestos de yodo del procedimiento de forma que contrarreste o reduzca al mínimo la despolimerización no específica. Por esta razón, la etapa de eliminación puede comprender una o dos etapas de precipitación con alcohol. También puede incluir la adición de un agente de enfriamiento con dos grupos adyacentes hidroxilo, como etilen glicol, glicerol y agentes similares, para eliminar química y selectivamente agentes de oxidación.

Posteriormente, se trata la heparina oxidada, por ejemplo, tras el aislamiento por precipitación con alcohol, con un agente de reducción, convenientemente borohidruro de sodio, por ejemplo, de acuerdo con los protocolos de la patente estadounidense 4.990.502. Pueden utilizarse otros agentes de reducción si son capaces de realizar una reducción similar de los restos de ácido glucurónico/idurónico oxidados, como borohidruro de sodio, sin modificar o destruir innecesariamente los grupos sulfato de otros restos sacárido. Se pueden aislar las cadenas así reducidas, por ejemplo por precipitación con alcohol, y transferirse a la etapa de despolimerización.

Por lo general, se considera ventajoso para la invención el empleo de heparina sin fraccionar en los procedimientos así descritos, ya que contribuye a reducir el desperdicio de material y a aumentar la rentabilidad y favorece proporcionar un producto de composición con la longitud de cadena de polisacárido deseable y con la retención de grupos sulfato.

La etapa de despolimerización puede realizarse en una solución acuosa a una concentración comprendida entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25 % p/v de la heparina modificada. A continuación, se mezcla un acidulante fuerte con la solución a un pH comprendido entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4. Un intervalo de pH adecuado es de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,5. Un valor de pH de aproximadamente 3,0 es adecuado de acuerdo con el procedimiento de la invención, si bien se ha observado que también es adecuado un pH de 3,5 y que admite la producción de heparina químicamente modificada dentro del intervalo de peso molecular señalado. Se ha observado que el procedimiento de la invención admite flexibilidad en este intervalo de pH, que se puede controlar a través del tiempo de procedimiento para la etapa de hidrólisis cuando se opera dentro de un marco de tiempo de 4 a 10 horas. El ácido clorhídrico es un ácido adecuado con el procedimiento de la invención, sin embargo, es posible encontrar otros ácidos fuertes útiles si no destruyen sustancialmente los grupos sulfato. Al aplicar las condiciones especificadas, se recupera un producto con longitudes de cadena adecuadas y estabilidad en almacenamiento para la posterior elaboración de una composición farmacéuticamente útil.

Los procedimientos producen un enriquecimiento global de grupos sulfato dentro de la longitud de cadena de polisacárido ya que el ácido idurónico/glucurónico no sulfatado está químicamente modificado y aparece principalmente como extremo reductor, terminales remanentes. Los procedimientos, en consecuencia, implican condiciones que retienen grupos sulfato y retienen así los dominios sulfatados de la heparina nativa. Los procedimientos también producen cadenas con una distribución del tamaño ventajosa que favorece una eficacia terapéutica deseable y se considera que mejora el índice terapéutico en comparación con otras heparinas de bajo efecto anticoagulante descritas. La invención se extiende en términos generales a heparinas químicamente modificadas preparadas con los procedimientos mencionados.

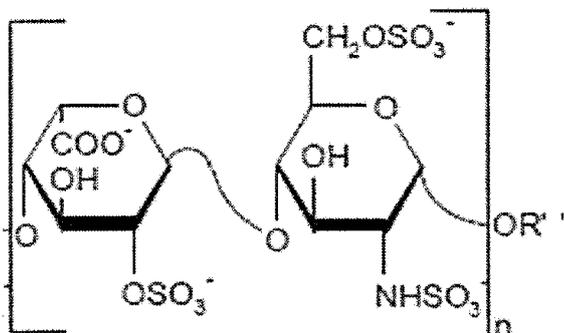
La invención se refiere a heparinas químicamente modificadas con una actividad anti-factor IIa de menos de 10 UI/mg, una actividad anti-factor Xa de menos de 10 UI/mg y un peso molecular medio ponderado (Pm) comprendido entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 9,5 kDa, que se pueden fabricar con los procedimientos descritos. La heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención tiene cadenas de polisacárido que retienen al menos un 90 % de los grupos sulfato. La heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención tiene una pérdida de grupos sulfato de aproximadamente un grupo sulfato por cada unidad de disacárido de 100 unidades de disacárido, lo que corresponde a una pérdida de grupos sulfato de menos de 1 % del contenido en sulfato total, cuando se presupone que la heparina contiene como promedio 2,4 grupos sulfato por unidad de disacárido y que hay un grupo sulfato por ácido idurónico, 12S y 2 grupos sulfato para la variante glucosamina predominante, GlcNS.

Un aspecto de la invención es una heparina químicamente modificada con actividad anti-factor IIa de menos de 10 UI/mg, una actividad anti-factor Xa de hasta 10 UI/mg y un peso molecular medio ponderado de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5 kDa, en la que las cadenas de polisacárido:

(i) retienen al menos un 90 % de los grupos sulfato de la heparina nativa correspondiente;

(ii) tiene una reducción de las secuencias de sacárido químicamente intactas proporcionando un efecto anticoagulante mediado por antitrombina cuando se compara con las cadenas de polisacárido de heparina nativa; y

(iii) tiene una reducción de unidades de ácido idurónico y/o glucurónico no sulfatadas en comparación con heparina nativa; en la que el disacárido predominante del polisacárido es un disacárido que tiene la estructura química:



5 en la que R' es un resto treonato; y n es un número entero comprendido entre 2 y 25, tal que comprende de 2 a 25 unidades de disacárido que corresponden a pesos moleculares comprendidos entre 1,2 y 15 kDa; y en la que la heparina químicamente modificada tiene en el espectro de ¹H RMN señales que no están sin identificar en los intervalos 0,10-2,00 ppm, 2,10-3,10 ppm y 5,70-8,00 ppm superiores a un 4 por ciento en comparación con la altura de la señal presente en la heparina nativa a 5,42 ppm.

10 Una heparina químicamente modificada tiene de 2 a 25 unidades de disacárido que corresponden a pesos moleculares comprendidos entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 15 kDa. Una heparina químicamente modificada tiene cadenas de polisacárido con una reducción en las secuencias de pentasacárido químicamente intactas responsables del efecto anticoagulante mediado por antitrombina (AT), en comparación con las cadenas de heparina nativa y tiene cadenas de polisacárido con una reducción de los restos de ácido idurónico y glucurónico sulfatados en comparación con heparina nativa.

15 Un aspecto de la invención es una heparina químicamente modificada que tiene cadenas de polisacárido que aparecen predominantemente con entre 6 y 16 unidades de disacárido con pesos moleculares entre 3,6 y 9,6 kDa. El término "predominantemente" en este contexto tiene el significado de las cadenas de polisacárido que "están presentes con la mayor frecuencia".

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

Las heparinas químicamente modificadas de la invención comprenden cadenas terminadas por un resto treonato. El resto treonato se representa más adelante como grupo terminal.

25 En un aspecto de la invención, de 3 a 15 % de las cadenas de polisacárido de la heparina químicamente modificada tiene una masa molecular de al menos 15 kDa.

En un aspecto de la invención, de 25 a 47 % de las cadenas de polisacárido de la heparina químicamente modificada tiene una masa molecular de al menos 9 kDa.

En un aspecto de la invención, de 40 a 60 % de las cadenas de polisacárido de la heparina químicamente modificada tiene una masa molecular de al menos 7 kDa.

30 En un aspecto de la invención, de 60 a 80 % de las cadenas de polisacárido de la heparina químicamente modificada tiene una masa molecular de al menos 5 kDa.

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

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

En otro aspecto más, la heparina químicamente modificada de la invención tiene una distribución de los polisacáridos y sus correspondientes masas moleculares expresados como % acumulativo de peso de acuerdo con la tabla:

Masa molecular, kDa	peso acumulativo, %
>15	3-15

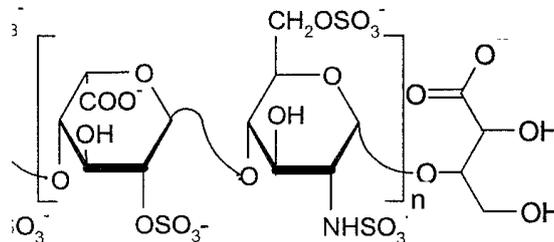
(continuación)

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

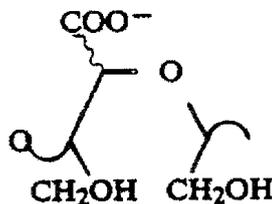
5 En otro aspecto más, la heparina químicamente modificada de la invención tiene una distribución de los polisacáridos y su masa molecular correspondiente expresada como % acumulativo de peso de acuerdo con la siguiente tabla:

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 La heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención tiene cadenas de polisacárido con el disacárido representado a continuación como estructura predominante con un resto de treonato terminal. El disacárido predominante tiene un peso molecular de aproximadamente 600 Da. (n un número entero de 2-25).



De acuerdo con otro aspecto más de la invención, la heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención comprende restos de glicol fraccionado con la estructura química:



Los restos de glicol fraccionado aparecen en las cadenas de polisacárido de las heparinas químicamente modificadas como resultado de los procesos de oxidación y reducción, tal como se ha explicado dentro del contexto del procedimiento y la etapa de hidrólisis específica. Asimismo se pueden considerar como indicativos de la eficacia de la etapa de despolimerización (hidrólisis) descrita anterior. Se hace referencia asimismo a la patente estadounidense 4.990.502 en cuanto a una referencia química de la aparición de restos de glicol fraccionado. El resto de glicol fraccionado representado proviene de la oxidación y reducción de ácido idurónico y ácido glucurónico sin sulfatar.

La heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención tiene un espectro $^1\text{H-RMN}$ en el intervalo de 5,0 a 6,5 ppm conforme al espectro $^1\text{H-RMN}$ de heparina nativa por ausencia de cualquiera de las señales de protón con una magnitud por encima de 0,1 % (moles).

De acuerdo con la invención, la heparina químicamente modificada, tal como se describe en el presente documento, cumple los patrones para la heparina aceptados actualmente al tener un espectro de $^1\text{H-RMN}$ que satisface los criterios de aceptación de heparina establecidos por el EDQM, Consejo de Europa, 2012, por ejemplo, al no tener ninguna señal sin identificar superior a 4 por ciento en comparación con la altura de la señal de heparina en 5,42 ppm en los intervalos de 0,10-2,00 ppm, 2,10-3,10 ppm y 5,70-8,00 ppm.

En un aspecto, la heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención tiene un intervalo de masa promedio relativa de aproximadamente 7.500 daltons con aproximadamente 90 % comprendido entre 2.000 y 15.000 daltons; el grado de sulfatación es de 2 a 2,5 por unidad de disacárido.

En un aspecto de la invención, una heparina químicamente modificada, tal como se describe en el presente documento, puede ser útil para terapias anteriormente desveladas como asociadas con otras regiones de heparina distintas al sitio de unión a AT. Entre los ejemplos se incluyen, sin limitarse a ellos, áreas como el tratamiento de inflamación, tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, reparación de tejidos, ictus, prevención y tratamiento de conmoción, sobre todo choque séptico y prevención del desarrollo de metástasis.

Un aspecto de la invención es una heparina químicamente modificada para su uso en el tratamiento de malaria. Las heparinas químicamente modificadas tal como se desvelan en el presente documento pueden ser útiles en la prevención o tratamiento de efectos oclusivos de la malaria causados por efectos adhesivos anormales en la sangre.

Un aspecto de la invención es una combinación de heparina químicamente modificada, tal como se desvela en el presente documento, con otro medicamento contra la malaria. En un aspecto de la invención, dichas combinaciones comprenden heparina químicamente modificada y atovaquona/proguanil o artesunato (parenteral). Entre los ejemplos de medicamentos contra la malaria en los aspectos de combinación de la invención para su uso en solitario o como una combinación de los mismos, se incluyen arteméter, lumefantrina, amodiaquina, mefloquina, sulfadoxina, pirimetamina, tetraciclina, doxiciclina, dapsona, clindamicina, quinina, tetraciclina, atovaquona, proguanil, cloroquina, primaquina, sulfadoxina, amodiaquina, dihidroartemisina, piperaquina, dihidroartemisina y piperaquina.

En otro aspecto más de la invención, una heparina químicamente modificada, tal como se desvela en el presente documento, puede administrarse simultáneamente o secuencialmente con un medicamento contra la malaria, es decir, en una terapia adjunta con un medicamento contra la malaria.

La expresión "medicamento contra la malaria" incluye agentes convencionalmente utilizados para el tratamiento de la malaria, tales como los agentes ya establecidos para el tratamiento de infecciones parasitarias. Otro aspecto más de la invención es un procedimiento para el tratamiento de la malaria que comprende la administración a un paciente que necesita dicho tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de una heparina químicamente modificada tal como se describe en el presente documento.

Otro aspecto más de la invención es una composición farmacéutica que comprende una heparina químicamente modificada, tal como se describe en el presente documento, en combinación con un vehículo farmacéutica o farmacológicamente aceptable. En otro aspecto más de la invención, puede administrarse una composición farmacéutica, tal como se describe en el presente documento, sistémicamente por administración parenteral, como por ejemplo inyección subcutánea o intravenosa. En otro aspecto más, puede administrarse una composición farmacéutica, tal como se describe en el presente documento, por vía oral. Para la administración parenteral, se pueden incorporar los compuestos activos en una solución o suspensión que contenga también uno o más adyuvantes, tales como diluyentes estériles, como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietileno glicol, glicerol, propileno glicol u otros disolventes sintéticos, agentes antibacterianos, antioxidantes, agentes quelantes, tampones y agentes para ajustar la osmolalidad. La preparación parenteral puede administrarse en ampollas, viales, jeringuillas precargadas o desechables, también para la autoadministración, o como dispositivos de infusión, como por ejemplo para infusión intravenosa o subcutánea. Las heparinas químicamente modificadas de acuerdo con la invención pueden administrarse por vía subcutánea con herramientas de autoadministración adecuadas, como por ejemplo inyector.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una heparina químicamente modificada, tal como se describen en el presente documento pueden comprender combinaciones de uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales. Dichos vehículos o excipientes pueden ser un material sólido, semisólido o líquido, que

puede servir como vehículo para el principio activo. Pueden administrarse las composiciones en una única dosis cada 24 horas durante un período de 1-30, preferentemente 1-10 días. La dosis puede estar comprendida entre 0,5-6 mg/kg peso corporal, administrados ya sea por vía intravenosa cada 6 u 8 horas, o 1-4 veces al día, por administración subcutánea. Una dosis unitaria estimada es de 25 a 100 mg/d de una heparina químicamente modificada, pero puede ser 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 el tratamiento de la malaria con terapias suplementarias o complementarias, tal como se ha señalado en la sección anterior. Una heparina químicamente modificada de la invención debería retener una cantidad suficiente de grupos sulfato incluidos en la forma nativa para ejercer una actividad terapéutica no relacionada con los efectos anticoagulantes, como por ejemplo dirigida a proteína de membrana de eritrocito infectado por *P. falciparum* 1 (PtEMP1) a la vez que se elimina o se reduce en gran medida la actividad anticoagulante inherente en el pentasacárido. Asimismo, los autores de la invención entienden que la inhibición de selectina, así como otros efectos biológicos dependientes de heparina, guarda una correlación con la longitud de cadena del polisacárido, de modo que la modificación química no puede tener como resultado una extensa fragmentación de las moléculas nativas. La biodisponibilidad de heparinas de cadena larga tras la administración subcutánea es baja y la posibilidad de trombocitopenia inducida por heparina (TIH) está positivamente correlacionada con la longitud de cadena, los derivados de heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención no deberán ser de longitud completa. La heparina químicamente modificada de la presente invención es el resultado de una serie de importantes consideraciones. 1. Inicialmente, para satisfacer los criterios económicos del procedimiento, la heparina diana tenía que poderse producir a partir de heparina no fraccionada. 2. El procedimiento no puede producir demasiada abundancia de cadenas cortas ya que el efecto terapéutico se correlaciona positivamente con longitudes de cadena de sacárido suficientemente largas. 3. El procedimiento no debería producir demasiada abundancia de cadenas largas ya que el régimen de administración subcutánea deseable no es posible con cadenas más largas. 4. De manera similar, la longitud de cadena larga guarda una correlación con los efectos secundarios no deseables como pueda ser TIH. El procedimiento debería eliminar el efecto anticoagulante inherente en el pentasacárido de unión a AT. 6. El procedimiento deberá evitar la desulfatación del polímero y, en cambio, deberá aumentar la proporción de restos sulfatados, ya que los efectos terapéuticos se correlacionan positivamente con el grado de sulfatación, que proporciona una densidad de carga negativa. La invención, tal como se ha descrito y como se describe a continuación en la sección experimental detallada demuestra que es posible resolver los escollos que se han descrito y, por tanto, que se puede producir con éxito un fármaco candidato para el tratamiento de malaria.

Descripción detallada e ilustrativa de la invención

Un aspecto de la invención es heparina químicamente modificada que tiene la denominación común internacional (DCI) *sevuparin sodium*, a la que se le ha dado también el código DF02. Dichos términos se utilizan indistintamente y pueden tener el mismo significado.

Descripción de los dibujos

Fig. 1 presenta un ejemplo representativo de una secuencia de heparina.

Fig. 2 presenta la estructura de la unidad de pentasacárido en la heparina requerida para la unión a AT.

Fig. 3 presenta un esquema de la síntesis de la heparina químicamente modificada DF02.

Fig. 4 presenta la estructura predominante de DF02.

Fig. 5 presenta cómo se rompen las rosetas del parásito FCR3S1.2 mediante DF02 y heparina dependiendo de la dosis.

Fig. 6 presenta cómo las rosetas de aislados recientes de niños con malaria grave, complicada o moderada responden al tratamiento con DF02 (100 (barras oscuras) y 1000 (barras grises) mg/ml).

Fig. 7 presenta la interrupción de citoadherencia: se puede inhibir o invertir la unión del Ep del parásito FCR3S1.2 a célula endotelial mediante DF02 o heparina dependiendo de la dosis.

Fig. 8 demuestra que puede inhibirse la invasión de parásito FCR3S1.2 en estadio merozoíto en glóbulos rojos recientes con DF02 o heparina dependiendo de la dosis.

Fig. 9 demuestra que puede inhibirse el secuestro de eritrocitos infectados con *P. falciparum* en los pulmones de ratas por tratamiento heparina químicamente modificada.

Ejemplo 1

Tanto Heparina como LMWH están compuestas de unidades de repetición de disacárido que contienen un resto ácido urónico (ácido D-glucurónico o L-idurónico, AU) y una fracción D-glucosamina (GlcN) que o bien está sulfatada o bien N-acetilada. Estos restos de hidrato de carbono se pueden O-sulfatar además, en las posiciones C-6 y C-3 en el caso de glucosamina y en la posición C-2 del AU. La estructura de heparina es variable en lo que respecta a la

distribución de AU y los restos sulfato; en la Fig. 1 se muestra una secuencia parcial representativa (que también ilustra el modo de numeración de átomos de carbono en un resto monosacárido). La Fig. 2 muestra la secuencia de pentasacárido única distribuida con polímeros de heparina que es esencial para la unión a AT. Se ha demostrado que hay varias características estructurales de esta secuencia que son cruciales para la interacción de heparina con AT. En particular, uno de los dos restos del AU presente en esta secuencia de pentasacárido está sólidamente sulfatado en la posición C-2; mientras que los grupos hidroxilo, tanto en C-2 como C-3 de la fracción urónico, están sin sustituir.

Descripción detallada del procedimiento de fabricación de heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención

La Fig. 3 muestra esquemáticamente la fabricación de heparina químicamente modificada de acuerdo con la presente invención, en adelante designada DF02, mientras que en las secciones a continuación se describen las etapas de fabricación.

Se prepara la sustancia a partir de heparina sódica. La preparación implica la oxidación selectiva de restos de ácido urónico no sulfatados en heparina mediante periodato, incluyendo la fracción de ácido glucurónico en la secuencia de pentasacárido que se une a AT. La interrupción de la estructura de este resto aniquila la interacción de alta afinidad con AT y, en consecuencia, el efecto anticoagulante (medido como a-FXa o a-FIIa, véase Tablas 4 y 5). La posterior reducción y tratamiento con ácido tiene como resultado la escisión del polímero en los sitios que se han oxidado mediante periodato. En conjunto, estas manipulaciones llevan a una pérdida de la actividad anticoagulante junto con una despolimerización adecuada de la cadena de heparina.

A continuación, se eliminan los aditivos, impurezas y productos secundarios por precipitaciones repetidas con etanol, filtración y centrifugado. Más adelante, se obtiene la sustancia en forma de polvo por secado al vacío y con calor. Se disuelve el fármaco DF02 en tampón acuoso estéril para producir el medicamento destinado a administración intravenosa o subcutánea.

Oxidación de ácido glucurónico e idurónico (restos), supresión de la actividad anticoagulante

Se disuelve una cantidad de aproximadamente 3000 gramos de heparina en agua purificada para obtener una solución al 10-20 % p/v. Se ajusta el pH de esta solución a 4,5-5,5. A continuación, se añade metaperiodato sódico (NaIO_4) a la solución de procedimiento; cantidad de periodato 15-25 % del peso de heparina. Se vuelve a ajustar el pH a 4,5-5,5. Se cubre el reactor para proteger la reacción de la luz. Se hace reaccionar la solución de procedimiento durante 22-26 horas con agitación constante y se mantiene la temperatura a entre 13 - 17 °C. Se mide el pH al final del período de reacción y se registra.

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

Se añade etanol (95-99,5 %) a la mezcla de reacción durante un período de 0,5 - 1 hora con agitación cuidadosa a una temperatura de 20 - 25 °C. El volumen de etanol que se añade se encuentra en el intervalo de 1-2 volúmenes de etanol por volumen de la solución de procedimiento. A continuación se deja precipitar y sedimentar la heparina oxidada durante 15-20 horas, tras lo cual se decantan y se descargan las aguas madre.

A continuación, se disuelve el sedimento en agua purificada para obtener 15-30% p/v de solución de procedimiento. Después, se añade NaCl para obtener una concentración de 0,15-0,30 moles/litro en la solución de procedimiento. Se continúa agitando durante 0,5 - 1 hora más al mismo tiempo que se mantiene la temperatura de 20 -25 °C. A continuación, se añaden 1,0-2,0 volúmenes de etanol (95-99,5 %) por volumen de la solución de procedimiento a esta solución con agitación cuidadosa, durante un período de 0,5 - 1 hora. Esto hace precipitar el producto desde la solución. La precipitación continúa durante > 1 hora.

Reducción de ácidos glucurónico/idurónico oxidados

Una vez decantadas y descartadas las aguas madre, se disuelve el sedimento por adición de agua purificada hasta obtener una concentración de la solución de procedimiento de 15-30 % p/v. Al mismo tiempo que se mantiene la temperatura a 13-17 °C, se ajusta el pH de la solución a 5,5-6,5. Después se añade una cantidad de 130-150 gramos de borohidruro sódico a la solución y se disuelve, el pH aumentará inmediatamente a un pH de 10-11 y se continúa la reacción durante 14-20 horas. Se registra el pH de la solución, tanto antes como después de este período de reacción. Después de este período de reacción, se añade un ácido diluido lentamente para ajustar el pH a un valor de 4, esto degrada el borohidruro sódico sobrante. Después de mantener un pH de 4 durante 34-60 minutos, se ajusta el pH de la solución a 7 con solución de NaOH diluida.

Hidrólisis ácida para conseguir la despolimerización de las cadenas de polisacárido

Se añade 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 al mismo tiempo que se agita la solución durante 3 horas +/- 10 minutos. Después, se añade una solución de NaOH diluido hasta obtener un pH de 7,0 y se enfría la solución de reacción hasta una temperatura de 13-17 °C. Después, se añade cloruro sódico (NaCl) hasta obtener una concentración de 0,2-0,3 moles/litro.

Purificación de productoEliminación de los aditivos e impurezas del procedimiento, adición de contraiones y filtración.

5 A continuación, se añade un volumen de solución de 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, tras lo cual se decanta y descarta el sobrenadante.

10 A continuación, se disuelve la pasta de producto obtenida por centrifugación en agua purificada para obtener una concentración de producto de 10-20 % p/v. Después se añade NaCl para obtener una concentración de 0,20-0,35 moles/litro. Asimismo, se añaden 1,5-2,5 volúmenes de etanol (95-99,5 %) por volumen de solución de procedimiento que hace precipitar el producto desde la solución. La centrifugación continúa a >2000 G y a <20 °C durante 20 - 30 minutos, tras lo cual se decanta y se descarta el sobrenadante. A continuación, se añade a la pasta que queda agua purificada para disolver. La concentración del producto estaría ahora en el intervalo de 10-20 % p/v. A continuación, se ajusta el pH de la solución de producto a 6,5-7,5. Después se filtra la solución para eliminar las partículas. A continuación, se añaden a un volumen de la solución de procedimiento 1,5-2,5 volúmenes de etanol (95-99,5 %). Sigue la centrifugación a >2000 G y a <20 °C durante 20 - 30 minutos tras lo cual se decanta y se descarta el sobrenadante.

Reducción del tamaño y contenido en agua de la pasta precipitada

20 A continuación, se carga un reactor de vidrio con etanol, volumen 2 litros. Mientras se agita el etanol, se añade la pasta de precipitado. La agitación mecánica solidifica la pasta y reemplaza el agua presente por el etanol dando una suspensión de partículas homogénea. Se interrumpe la agitación al cabo de 1-2 horas, tras lo cual se deja sedimentar las partículas, después, se decantan las aguas madre. Se repite este procedimiento dos veces. Se aísla el precipitado sobre un filtro de polipropileno (PP). Se repitió este procedimiento dos veces más. Después de eliminar el exceso de líquido, se pasan las partículas a través de un tamiz para obtener partículas más pequeñas de tamaño uniforme.

Secado al vacío

25 Se distribuye el producto uniformemente en dos bandejas pesadas previamente y se colocan en una cabina de vacío. Se reduce la presión con una bomba de vacío, anotándose la presión obtenida realmente y se calientan las bandejas a 35 – 40 °C, con un registro constante de la temperatura. Se pasa una corriente de nitrógeno a través de la secadora en este período al mismo tiempo que se mantiene la presión baja en la secadora. Cuando se obtiene un peso constante, es decir, no se percibe más evaporación, se considera completado el secado. Se dispensa el producto deshidratado, se envasa y se protege de la humedad. Se realiza el almacenamiento en un área seca a una temperatura de 20-25 °C.

35 Se puede preparar el producto así fabricado como un medicamento para un procedimiento aséptico convencional, como por ejemplo una solución que comprende 150 mg/ml de heparina químicamente modificada como agente activo y fosfato de Na hasta 15 mM, pH 6-8. Se destina el medicamento así obtenido para 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. DF02 tiene una distribución del tamaño de los polímeros de polisacárido con un intervalo para n de 2-25 que corresponde a los pesos moleculares de 1,2-15 kDa. El tamaño predominante es 6-16 unidades de disacárido que corresponde a los pesos moleculares de 3,6-9,6 kDa.

40 A través de pruebas prácticas se puede observar que la reacción de la preparación de heparina oxidada en solución alcalina da lugar a cadenas que son demasiado cortas o falta del grado de sulfatación apropiado, para la función farmacéutica óptima de la heparina resultante. Asimismo, a través de pruebas prácticas, se puede demostrar que el tratamiento de la preparación de heparina en una solución de un pH por debajo de 1, conlleva la desulfatación del producto y, por tanto, da lugar a una heparina químicamente modificada con un efecto farmacéutico por debajo del 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

(continuación)

Masa molecular, kDa	Peso acumulativo, %
>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 medio ponderado, Pm, entra dentro del intervalo de 6,5-9,5 kDa.

5

Tabla 2 Distribución de polisacáridos y su masa molecular correspondiente en DF02 como % acumulativo del peso 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

El valor correspondiente para el peso molecular medio ponderado, Pm, es 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 determinados parámetros del procedimiento, como las temperaturas de procedimiento, con el fin de evitar cualquier despolimerización no específica en la parte inicial del procedimiento.

Oxidación de ácido glucurónico y ácido idurónico (restos), supresión de actividad anticoagulante

15 Se disuelve una cantidad de aproximadamente 3000 gramo de heparina en agua purificada para obtener una solución al 10-20 % p/v. Se ajusta el pH >2 95,6 de esta solución a 4,5-5,5. A continuación, se añade metaperiodato sódico (NaIO₄) a la solución de procedimiento; cantidad de periodato 15-25 % del peso de heparina. Se vuelve a ajustar el pH a 4,5-5,5. Se cubre el reactor para proteger la reacción de la luz. Se hace reaccionar la solución de procedimiento durante 22-26 horas con agitación constante y se mantiene la temperatura a entre 13 - 17 °C, al mismo tiempo que se reduce la temperatura a aproximadamente 5 °C durante las dos últimas horas. Se mide el pH al final del período de reacción y se registra.

20 Terminación de la reacción de oxidación y eliminación de los compuestos que contienen yodo

Se añade etanol (95-99,5 %) a la mezcla de reacción durante un período de 0,5 - 1 hora con agitación cuidadosa a una temperatura de aproximadamente 5 °C. El volumen de etanol que se añade se encuentra en el intervalo de 1-2 volúmenes de etanol por volumen de la solución de procedimiento. A continuación se deja precipitar y sedimentar la heparina oxidada durante 15-20 horas, tras lo cual se decantan y se descargan las aguas madre.

A continuación, se disuelve el sedimento en agua purificada para obtener 15-30% p/v de solución de procedimiento. Después, se añade NaCl para obtener una concentración de 0,15-0,30 moles/litro en la solución de procedimiento. Se continúa agitando durante 0,5 – 1 hora más al mismo tiempo que se mantiene la temperatura de aproximadamente 5 °C. A continuación, se añaden 1,0-2,0 volúmenes de etanol (95-99,5 %) por volumen de la solución de procedimiento a esta solución con agitación cuidadosa, durante un período de 0,5 – 1 hora. Esto hace precipitar el producto desde la solución. La precipitación continúa durante > 1 hora.

Reducción de ácidos glucurónico/idurónico oxidados

Esta etapa se realiza de acuerdo con el Ejemplo 1.

Hidrólisis ácida para conseguir la despolimerización de las cadenas de polisacárido

Esta etapa se lleva a cabo de acuerdo con el Ejemplo 1 con la diferencia de que se puede extender el tiempo del procedimiento aproximadamente dos horas antes de elevar el pH a 7,0 con NaOH.

Las etapas de procedimiento posteriores para obtener el medicamento, que comprende por ejemplo 150 mg/ml de agente activo heparina químicamente modificada, son idénticas a las etapas descritas en el Ejemplo 1.

Al llevar a cabo las etapas de procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 2, se obtiene una heparina químicamente modificada con una distribución del peso molecular del polisacárido, tal como se muestra en la Tabla 1 del Ejemplo 1.

Ejemplo 3

El Ejemplo 3 representa otro procedimiento para fabricar heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención sometiendo directamente la solución de procedimiento que proviene de la etapa de oxidación a un agente de reducción fuerte antes de introducir la etapa de precipitación.

Oxidación de ácido glucurónico y ácido idurónico (restos), supresión de actividad anticoagulante

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

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

Al mismo tiempo que se mantiene una temperatura de 13-17 °C, se ajusta el pH de la solución a 5,5-6,5. A continuación, se añade una cantidad de 130-200 gramos de borohidruro sódico a la solución y se disuelve, el pH aumentará inmediatamente a un pH de 10 -11 y se continúa la reacción durante 14-20 horas. Se registra el pH de la solución, tanto antes como después de este período de reacción. Después de este período de reacción, se añade ácido diluido lentamente para ajustar el pH a un valor de 4, esto degrada el borohidruro sódico restante. Después de mantener un pH de 4 durante 45-60 minutos, se ajusta al pH de la solución a 7 con solución de NaOH diluida.

Eliminación de compuestos que contienen yodo

Se añade 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 que se añade se encuentra en el intervalo de 1-2 volúmenes de etanol por volumen de solución de procedimiento. A continuación, se deja precipitar y sedimentar la heparina oxidada y reducida a continuación durante 15-20 horas, tras lo cual se decanta y se descartan las aguas madre.

A continuación, se disuelve el sedimento en agua purificada para obtener 15-30 % p/v de solución de procedimiento. A continuación, se añade NaCl para obtener una concentración de 0,15-0,30 moles/litro de la solución de procedimiento. Se continúa agitando durante 0,5 – 1 hora más al mismo tiempo que se mantiene la temperatura de 15-25 °C. A continuación, se añaden 1,0 -2,0 volúmenes de etanol (95-99,5 %) por volumen de solución de procedimiento a esta solución con agitación cuidadosa, durante un período de 0,5 – 1 hora. Esto hace precipitar el producto desde la solución. La precipitación continúa durante >1 hora.

Hidrólisis ácida para conseguir la despolimerización de las cadenas de polisacárido

Una vez decantadas y descartadas las aguas madre, se disuelve el sedimento por adición de agua purificada hasta obtener una concentración de la solución de procedimiento de 15-30 % p/v.

Se añade ácido diluido a la solución hasta obtener un pH de 3,0. Se mantiene la temperatura a 50-55 °C al mismo tiempo que se agita la solución durante 5 a 10 horas. Se puede hacer un seguimiento del progreso de la despolimerización a través de análisis del peso molecular incorporados en el procedimiento, por GPC-HPLC para

determinar el tiempo real requerido para la reacción. A continuación, se añade una solución de NaOH diluida hasta obtener un pH de 7,0 y se enfría la solución de reacción a una temperatura de 13-17 °C. Después, se añade cloruro sódico NaCl hasta obtener una concentración de 0,2-0,3 moles/litro. Alternativamente, para controlar de forma similar el peso molecular promedio, se puede añadir el ácido diluido para obtener un pH de 3,5, pero para completar un nivel comparable de hidrólisis, se extiende el período de procedimiento de 5-6 horas a 8-9 horas. De acuerdo con ambas alternativas, se mantiene el peso molecular promedio dentro del intervalo especificado de 6,5 y 9,5 kDa.

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

Al llevar a cabo las etapas de procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 3, se obtiene una heparina químicamente modificada con una distribución del peso molecular de polisacárido, tal como se muestra en la Tabla 1 del Ejemplo 1.

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

Lote producido de acuerdo con:	Intensidad de 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

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

La Tabla 3 confirma que una heparina químicamente modificada, tal como se fabrica con el procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 3, tiene como resultado un espectro de ¹H-RMN con ausencia de señales inesperadas en el intervalo de 5,90 ppm a 6,14 ppm equivalente al de heparina. Dichas señales presentan una correlación con las estructuras de enlace doble parcialmente insaturadas que contienen glucosa aminas, que pueden experimentar otras modificaciones químicas y contribuyen a la decoloración del producto.

Dicho de otra forma, el procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 3 no tiene como resultado restos o estructuras sin identificar que sean inesperadas en los espectros de protones de heparinas convencionales o heparina de bajo peso molecular.

Para confirmar que los procedimientos de acuerdo con la invención contribuyen a retener el nivel deseado de cadenas de polisacárido sulfatadas, se llevó a cabo una prueba con un electrodo de medición del sulfato sobre muestras de líquido de procedimiento de la etapa de la hidrólisis ácida, es decir, muestras del líquido de procedimiento no sometidas directamente a las siguientes etapas de elaboración y purificación de un producto de heparina químicamente modificada. Los resultados demuestran niveles de sulfato liberado (perdido) desde polisacáridos generalmente por debajo de 1500 ppm. Es decir, las pruebas confirman que los procedimientos de la invención inducen a una pérdida de grupos sulfato que no excede un grupo sulfato por unidad de disacárido de 100 unidades de disacárido. Las heparinas químicamente modificadas de acuerdo con la invención contienen un grupo sulfato por cada ácido idurónico, 12S y 2 grupos sulfato por cada variante de glucosamina predominante, GlcNS. Por consiguiente, la heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención retiene al menos un 90 % de los grupos sulfato que corresponden a heparina.

La heparina químicamente modificada producida de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 3 y elaborada como un producto presenta una absorbancia muy baja a 400 nm (10 % de solución). 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 un pH 3,5 o 3,0 respectivamente. Los valores de absorbancia bajos confirman que se reducen al mínimo los efectos de cualquier despolimerización no específica asociada con decoloración a partir de reacciones secundarias de tipo Maillard (medido como absorbancia a 400 nm) y que es de esperar una estabilidad adecuada de los productos de heparina químicamente modificada de acuerdo con la invención.

Ejemplo 4

Efectos antihemostáticos y anticoagulación

Se realizaron estudios sobre los efectos de DF02 en los parámetros de coagulación y sobre hemorragia en ratas Sprague-Dawley macho, adultas y jóvenes. Se estudiaron también heparina y una preparación LMWH (Fragmin) con fines comparativos. Los procedimientos básicos de la prueba fueron los siguientes:

Transcurridos 5 minutos después de la administración i.v. del artículo de ensayo, se realizó una incisión longitudinal en las ratas en la sección media dorsal de la cola. La incisión fue de 9 mm de longitud y 1 mm de profundidad y se normalizó utilizando un dispositivo de matriz. Se secó la sangre con papel absorbente por la incisión hasta que dejó de sangrar. Se midió el tiempo durante el cual pudo observarse una hemorragia visible, durante hasta 25 minutos. Cuanto más prolongado fue el tiempo de sangrado, más pronunciados fueron los efectos anti-coagulantes del agente administrado.

Rata adulta

Transcurridos 40 minutos después de la administración, se sacrificó a las ratas desangrándolas totalmente. Se preparó plasma estabilizado con citrato a partir de la sangre. Se almacenó el plasma en partes alícuotas de 1 o 0,5 ml a -70 °C hasta el análisis de APTT y PT.

Se analizaron los siguientes compuestos y dosis (cada uno de ellos en grupos de 8 ratas) en ratas adultas:

- 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

Se analizaron los siguientes compuestos y dosis (cada uno de ellos en grupos de 8 ratas) en ratas jóvenes de edades de 14 ± 1 días

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

El tiempo de sangrado y los parámetros de coagulación según se midió en los animales adultos reveló que DF02 tuvo un bajo efecto anticoagulante en ratas. La potencia de DF02 fue inferior a la de los anticoagulantes Heparina y Fragmin, si bien los dos tuvieron un profundo efecto en todos los parámetros, guardando dicho efecto una correlación directa con la dosis en cuestión. El efecto en PT fue demasiado débil como para permitir estimaciones comparativas.

El tiempo de sangrado y los parámetros de coagulación establecidos en los animales jóvenes indican que DF02 tiene un bajo efecto anticoagulante en ratas jóvenes. El cambio del tiempo de sangrado y los parámetros de coagulación en ratas jóvenes se encuentra en el mismo intervalo que en las ratas adultas. Al igual que en las ratas adultas, también en las ratas jóvenes el efecto en PT fue débil.

Para comprender mejor la diferencia en la potencia anticoagulante de los compuestos de heparina químicamente modificada, se calculó una estimación de las dosis relativas de potencia equivalente (Tabla 4). Se calculó la relación entre las dosis relativas de potencia equivalente estimadas con respecto a los efectos en el tiempo de sangrado y APTT según se midió en un modelo de hemorragia de rata. Se estableció la normalización o comparación con heparina no fraccionada, véase Tabla 4, a continuación.

Tabla 4

Dosis relativas	DF02	Heparina	Fragmin
Tiempo de sangrado (min)	30-50	1	5
APTT	30-40	1	5

La Tabla 5 a continuación presenta las actividades anti-coagulantes específicas de DF02 a través de ensayos de anti-factor Xa y anti-factor II.

Tabla 5

Fármaco		Resultados de lote		
Propiedad	Procedimiento	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Actividad anti-coagulante FIIa	Ph.Eur. (ensayo cromogénico)	4,6 IU/mg	5,0 IU/mg	3,8 IU/mg
Actividad anti-coagulante anti-factor Xa	Ph. Eur.	3,9 IU/mg	4,9 IU/mg	5,5 IU/mg

Con fines comparativos, el valor correspondiente para heparina no fraccionada (HNF) es al menos 180 IU/mg.

Ejemplo 5

5 Investigación de formación de rosetas y citoadherencia en sangre infectada con malaria

Se investigó DF02 en cuanto a sus efectos en modelos de malaria *in vitro*, p.ej., interrupción de rosetas de eritrocitos infectados y no infectados y prevención o interrupción de la citoadherencia de eritrocitos infectados al endotelio. En ambos modelos, se demostró la eficacia de DF02 dependiendo de la dosis. Se demostró que DF02 tiene una potencia significativa en estudios de campo en los que se analizó la formación de rosetas en eritrocitos parasitados (Ep) recientes de pacientes con malaria moderada y complicada. Asimismo, se analizó DF02 en cuanto a los efectos bloqueantes en la invasión en estadio merozoito de eritrocitos *in vitro*. Se demostró que DF02 tiene una potencia equivalente por mg de heparina en este modelo.

Resultados

Se analizó una alta formación de rosetas y clones parásitos multiadhesivos (FCR3S1.2), así como aislados parásitos de pacientes gravemente enfermos en cuanto a su sensibilidad a DF02 en ensayos de formación de roseta y citoadherencia. DF02 rompe las rosetas de muchos cultivos de parásitos analizados dependiendo de la dosis y, con algunos parásitos, se alcanzó una interrupción total o cercana a la total en 1000 µg/ml (Fig. 5). Las rosetas de aislados clínicos también fueron sensibles a DF02. También se realizó una investigación de campo sobre DF02. Se trató con DF02 47 parásitos de niños con malaria que presentaban un fenotipo de formación de roseta. Un 91 % de las muestras de sangre con rosetas recogidas de los niños con malaria grave/complicada presentaron un 50 % de interrupción de las rosetas a la concentración más alta analizada (1000 µg/ml) (Fig. 6). Se evaluó de manera similar el efecto de DF02 en la unión de Ep a células endoteliales (citoadherencia) por incubación dinámica para imitar las condiciones de la circulación de la sangre *in vivo*. Se examinó el efecto directo sobre la unión primaria a células endoteliales añadiendo Ep junto con DF02 de manera simultánea al endotelio (bloqueo de citoadherencia). Se pudo bloquear hasta un 80 % de la unión de Ep mediante DF02 en comparación con las muestras sin tratar. Para analizar la eficacia de DF02 para desalojar Ep ya unido del endotelio, se permitió que se adhiriese Ep al endotelio, antes de la incubación con DF02 a diferentes concentraciones finales (interrupción de citoadherencia). La interrupción de la citoadherencia con DF02 tuvo como resultado un 80 % de reducción de la unión (Fig. 7). Algunos cultivos de parásitos fueron más sensibles que otros.

30 **Ejemplo 6**

Efectos de DF02 en invasión de merozoítos en eritrocitos *in vitro*

El ciclo vital de *P. falciparum* dentro de los eritrocitos es corta y los Ep explotan cada 48 horas y los parásitos liberados tienen que volver a invadir eritrocitos nuevos. Anteriormente, se ha demostrado que heparina inhibe el cultivo continuo de *P. falciparum in vitro* bloqueando la invasión de merozoítos en eritrocitos. Por lo tanto, se analizó DF02 en cuanto a sus efectos bloqueantes de la invasión de merozoítos en eritrocitos utilizando un ensayo *in vitro* (Fig. 8). DF02 bloqueó la invasión de merozoítos dependiendo de la dosis y la inhibición fue superior a 80 %. Se observó que los efectos inhibidores de DF02 eran iguales a los de heparina normal.

Procedimiento

Se llevó a cabo el ensayo de inhibición de la invasión de merozoíto con heparina químicamente modificada y heparina no fraccionada. Se llevaron a cabo cultivos de *P. falciparum* sincronizados con Ep maduros (trofozoítos) con una parasitemia de 0,4 % y un hematocrito de 2 % en micro-cultivos (100 µl) en presencia de concentraciones crecientes de heparina químicamente modificada o heparina no fraccionada a 37 °C durante 24-30 h. Para cuantificar la parasitemia, se mancharon las muestras durante 10 s con naranja de acridina y después se analizaron utilizando un instrumento de FACS de Becton Dickinson. Se recogió mínimo de 50.000 células por muestra.

45 Resultados

Se analizaron DF02 y heparina normal en cuanto a los efectos bloqueantes en la invasión de merozoítos en eritrocitos utilizando un ensayo *in vitro*. DF02 bloqueó la invasión de merozoítos dependiendo de la dosis y alcanzó

hasta un 80 % de inhibición. Se observó que los efectos inhibidores de DF02 eran equivalentes a los de heparina normal.

Ejemplo 7

Liberación *in vivo* de eritrocitos infectados secuestrados

5 Se ha estudiado la eficacia de DF02 de liberar eritrocitos infectados unidos desde los microvasos pulmonares en la circulación de la sangre *in vivo* en ratas. Se demostró que con DF02 se liberaba Ep en la circulación. En el modelo de rata, una inyección de la sustancia junto con el Ep bloqueó la unión de hasta un 80 % de Ep en el pulmón de la rata. De manera similar, cuando se inyectó primero Ep y se permitió su unión en la microvasculatura de los animales durante 60 minutos, seguido de inyección intravenosa de DF02, se observó que se liberaba hasta un 60 % de Ep
10 secuestrado anteriormente con el tratamiento (Fig. 9).

Procedimiento

Se cultivaron Ep humanos *in vitro* y enriquecidos para una parasitemia por encima de 70 %. Antes de la inyección en los animales, se marcaron radiactivamente los eritrocitos infectados humanos con ^{99m}Tc. Se anestesió a las ratas y se les inyectaron los eritrocitos Ep marcados por vía intravenosa en la vena caudal. Se trató a las ratas o bien con
15 una co-inyección con Ep marcado junto con diferentes concentraciones de la heparina químicamente modificada, o bien se les inyectó primero Ep y, transcurridos 3 minutos, se les inyectó diferentes concentraciones de heparina químicamente modificada, heparina no fraccionada o sulfato de dextrano, mientras que a los animales de control se les inyectó Ep marcada sin DF02, heparina o sulfato de dextrano. Se llevó un seguimiento de la distribución de las células marcadas utilizando una cámara gamma durante 30 minutos. Se calculó la cantidad relativa de las células
20 marcadas secuestradas en los pulmones comparando la actividad de pulmones extirpados con la de los del animal entero.

Efecto de heparina químicamente modificada en el secuestro de Ep en ratas *in vivo*

Se llevaron a cabo estudios del secuestro de Ep, incluyendo tanto la formación de rosetas como la citoadherencia en la rata. En este sistema *in vivo*, Ep de diferentes cepas y clones se adhiere firmemente en los pulmones de rata en
25 una manera dependiente de PfEMP1. El sistema presenta un efecto bloqueante del secuestro de la heparina químicamente modificada DF02 en Ep con un máximo de 80 % (aproximadamente) de promedio de reducción del secuestro. Se comparó co-inyección de eritrocitos humanos marcados sin infectar con heparina químicamente modificada con la inyección de eritrocitos sin infectar marcados sin heparina químicamente modificada. No se observó ninguna diferencia y la cantidad total retenida fue muy baja. Se trató también a las ratas con heparina
30 químicamente modificada después de que se hubo secuestrado Ep marcado para estudiar la capacidad de heparina químicamente modificada de liberar Ep en la circulación. Se redujo el secuestro en aproximadamente un 50 %.

Ejemplo 8

Investigación clínica de sevuparin sodium en pacientes con malaria

35 Estudio de seguridad/eficacia, asignación paralela, control activo, sin enmascaramiento, aleatorizado, Fase I/II, de Sevuparin/DF02 como terapia adjunta en sujetos afectados con malaria por *Falciparum* no complicada.

Los eritrocitos infectados con *P. falciparum* (Ep) tienen la capacidad de secuestrar en la microvasculatura profunda en muchos órganos vitales. La propiedad de secuestro está relacionada con la generación de la gravedad de la enfermedad y la patología, a través de la obstaculización del flujo sanguíneo, un menor suministro de oxígeno y sucesivas lesiones del tejido y se basa en la capacidad de los Ep en estadio trofozoíto de adherirse al endotelio vascular y a eritrocitos no infectados. El efecto combinado de la adhesión de Ep endotelial y a eritrocitos es el mecanismo central que conlleva la obstrucción de la microvasculatura y, por tanto los síntomas clínicos de malaria grave.

Se administra Sevuparin sodium como una infusión i.v. en combinación con atovaquona/proguanil (Malanil®) como tratamiento anti-malaria a sujetos de sexo femenino y masculino (de 18 a 65 años de edad) afectados con malaria no complicada. Se lleva un seguimiento de una parte de incremento gradual de la dosis (parte 1) a través de una comparación aleatorizada sin enmascaramiento del tratamiento con sevuparin sodium y Malanil® frente a Malanil® solamente (parte 2). Se administra sevuparin sodium a cada uno de los pacientes 4 veces al día y se administra atovaquona/proguanil (Malanil®) a cada paciente de acuerdo con su indicación marcada. Las ramificaciones del estudio son sevuparin sodium en combinación con atovaquona/proguanil (Malanil®) y atovaquona/proguanil
50 (Malanil®) en solitario como control.

Procedimiento

Se comparan curvas de eliminación de parásito y estadiaje del parásito en sangre periférica secuencial de pacientes tratados con DF02 en comparación con el grupo de control. La citoadherencia y por tanto el secuestro de Ep que contienen las formas más maduras del parásito queda afectada por DF02, una elevación temporal de la parasitemia

y la aparición de estadios más maduros del parásito en la sangre periférica.

5 Se modelan las curvas de eliminación en relación con el estadiaje de la sangre periférica utilizando una distribución de estadios, proporción del secuestro específico de estadio y eliminación del parásito específica de estadio a través de quinina como parámetros. Se ha probado un enfoque similar en la evaluación de levamisol como terapia con adyuvante anti-adhesivo en malaria por *falciparum* (Dondorp y col. J Infect. Dis. 2007; 196:460-6). Se evalúan las diferencias del secuestro entre pacientes tratados con DF02 y el grupo de control comparando los números integrados (en parásitos por microlitro) y la parasitemia (en porcentajes) de parásitos en el estadio trofozoíto y esquizonte observada en la sangre periférica a lo largo del tiempo hasta 72 horas, determinado como el área bajo la curva tiempo-parasitemia. Los estadios morfológicos bien definidos del parásito consisten en lo siguiente; anillos diminutos, anillos pequeños, anillos grandes, trofozoítos tempranos, trofozoítos en estadio intermedio, trofozoítos tardíos y esquizontes [Silamut K, y col. Am J Pathol 1999; 155:395-410]. Las edades del estadio asexual del parásito (de la invasión de merozoítos) que limita los estadios morfológicos, tal como se evalúa en cultivo *in vitro* son respectivamente 12, 17, 22, 28, 37 y 42 h. Una cohorte de formas de anillo grande en admisión evoluciona al estadio trofozoítos temprano 6 horas más tarde. Otras cohortes coincidentes incluyen anillos diminutos en admisión y anillos pequeños y grande combinados al cabo de 12 horas, anillos pequeños en admisión y anillos grandes al cabo de 6 horas, trofozoítos tempranos al cabo de 12 horas trofozoítos en el estadio intermedio al cabo de 18 horas, y anillos grandes en admisión y o bien trofozoítos en estadio intermedio al cabo de 12 horas o bien trofozoítos tardíos al cabo de 18 horas. Se lleva a cabo la evaluación de portaobjetos de sangre periférica a través de dos microscopistas independientes, que se ocultan para la asignación del fármaco de estudio.

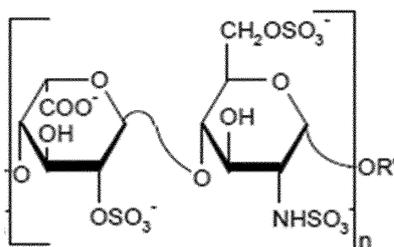
20

REIVINDICACIONES

1. Heparina químicamente modificada con una actividad anti-factor IIa de hasta 10 IU/mg, una actividad anti-factor Xa de hasta 10 IU/mg y un peso molecular medio ponderado de 6,5 a 9,5 kDa, en la que las cadenas de polisacárido:

- 5 (i) retienen al menos 90 % de los grupos sulfato de la heparina nativa correspondiente;
- (ii) tienen una reducción de secuencias de pentasacárido químicamente intactas que proporciona un efecto anticoagulante mediado por antitrombina, cuando se compara con las cadenas de polisacárido de heparina nativa;
- 10 (iii) tienen una reducción de unidades de ácido idurónico y/o glucurónico sin sulfatar cuando se compara con heparina nativa;

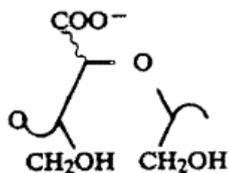
en la que el disacárido predominante del polisacárido es un disacárido que tiene la estructura química:



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

2. Heparina químicamente modificada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las cadenas de polisacárido que aparecen predominantemente tienen de 6 a 16 unidades de sacárido con pesos moleculares entre 3,6 y 9,6 kDa.

3. Heparina químicamente modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende restos de glicol fraccionado de estructura química:



4. Heparina químicamente modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que al menos 30 % de las cadenas de polisacárido tienen un peso molecular de al menos 8 kDa.

5. Heparina químicamente modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que 3-15 % de las cadenas de polisacárido tiene un peso molecular de al menos 15 kDa.

6. Heparina químicamente modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que 25-47 % de las cadenas de polisacárido tiene un peso molecular de al menos 9 kDa.

7. Heparina químicamente modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que 40-60 % de las cadenas de polisacárido tiene un peso molecular de al menos 7 kDa.

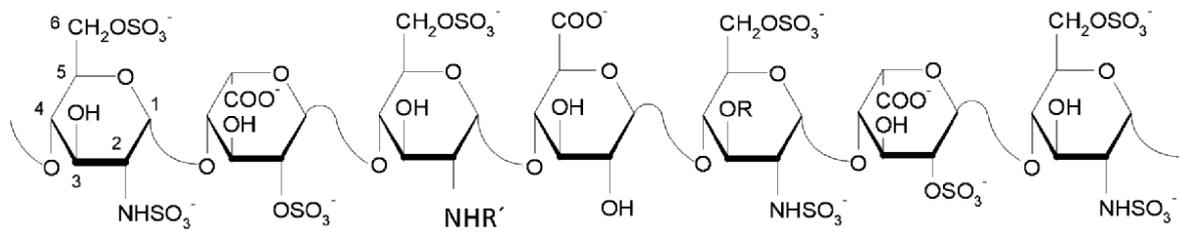
8. Heparina químicamente modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que 60-80 % de las cadenas de polisacárido tiene un peso molecular de al menos 5 kDa.

9. Heparina químicamente modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que al menos 85 % de las cadenas de polisacárido tiene un peso molecular de al menos 3 kDa.

10. Heparina químicamente modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que al menos 95 % de las cadenas de polisacárido tiene un peso molecular de al menos 2 kDa.

11. Un procedimiento de preparación de heparina químicamente modificada con una actividad anti-factor IIa de hasta 10 IU/mg, una actividad anti-factor Xa de hasta 10 IU/mg y un peso molecular medio ponderado (peso promedio, Pm) de 6,5 a 9,5 kDa, que comprende las etapas consecutivas de:

- (a) oxidación selectiva de heparina no fraccionada sometiéndola a un agente de oxidación capaz de oxidar restos de sacáridos no sulfatados;
- (b) reducción del resto sacárido oxidado resultante;
- (c) eliminación del agente oxidante sobrante y eliminación de las formas reducidas del agente de oxidación; y
- 5 (d) despolimerización de las cadenas de polisacárido por hidrólisis a un pH ácido de 3 a 4.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que se realiza la despolimerización de las cadenas de heparina:
- (i) por hidrólisis a un pH ácido de 3,0 a 3,5; y/o
- (ii) a una temperatura de al menos 20 °C.
- 10 13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en el que la etapa de eliminación comprende la adición de un alcohol en una cantidad suficiente para hacer precipitar la heparina químicamente modificada.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que se oxidan selectivamente ácidos glucurónico no sulfatado y/o idurónico no sulfatado con un compuesto periodato.
- 15 15. Heparina químicamente modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en terapia.
16. Heparina químicamente modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento de malaria.
- 20 17. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una heparina químicamente modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con un vehículo farmacéutica y farmacológicamente aceptable.
18. Una combinación que comprende una heparina químicamente modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y otro medicamento para su uso en el tratamiento de malaria.
- 25 19. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el otro medicamento es atovaquona/proguanil o artesunato.

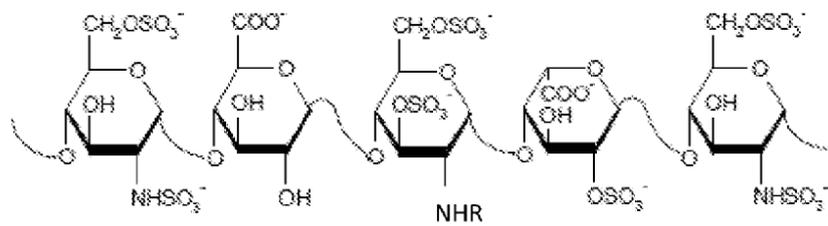


GlcN - UA - GlcN - UA - GlcN - UA - GlcN

R = -H or -SO₃⁻

R' = COCH₃ or -SO₃⁻

Fig. 1



R = COCH₃ or -SO₃⁻

Fig 2

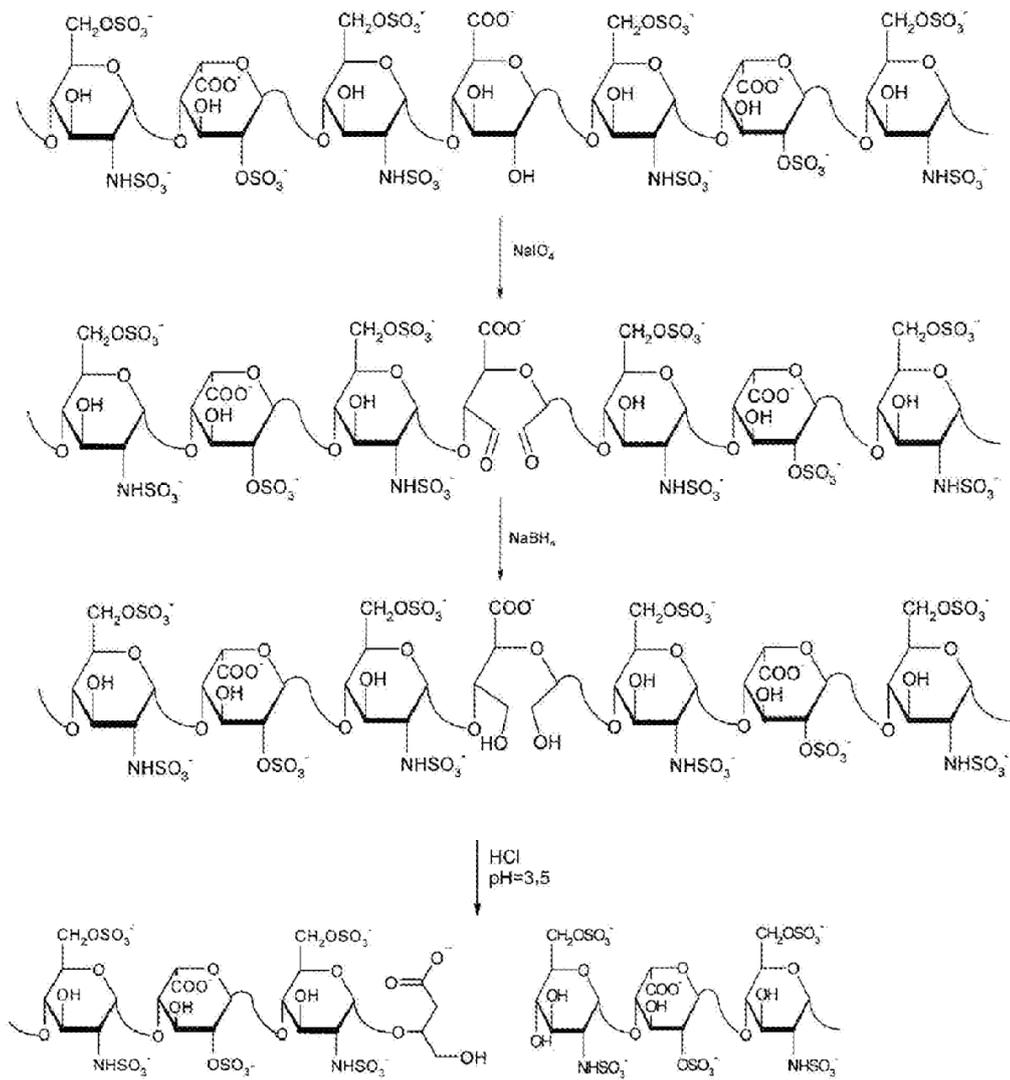


Fig. 3

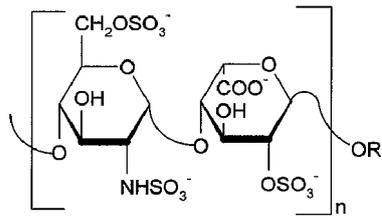


Fig. 4

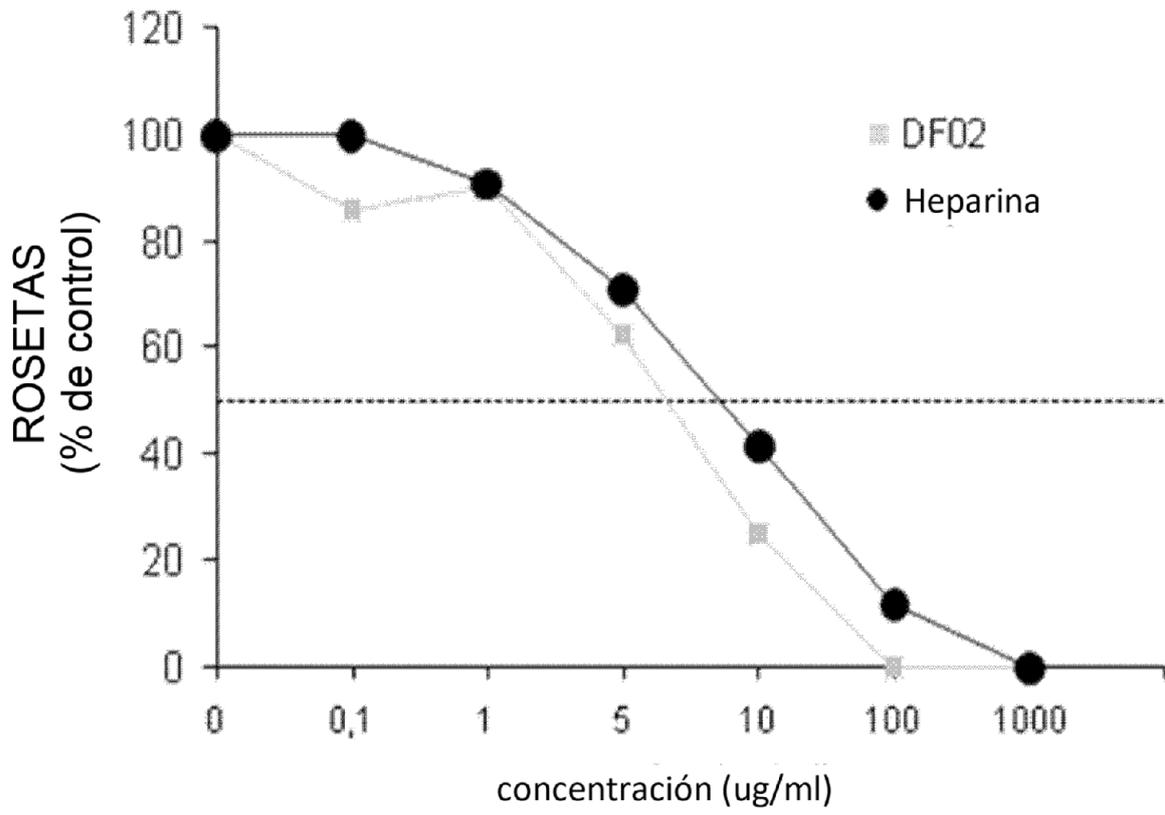


Fig. 5

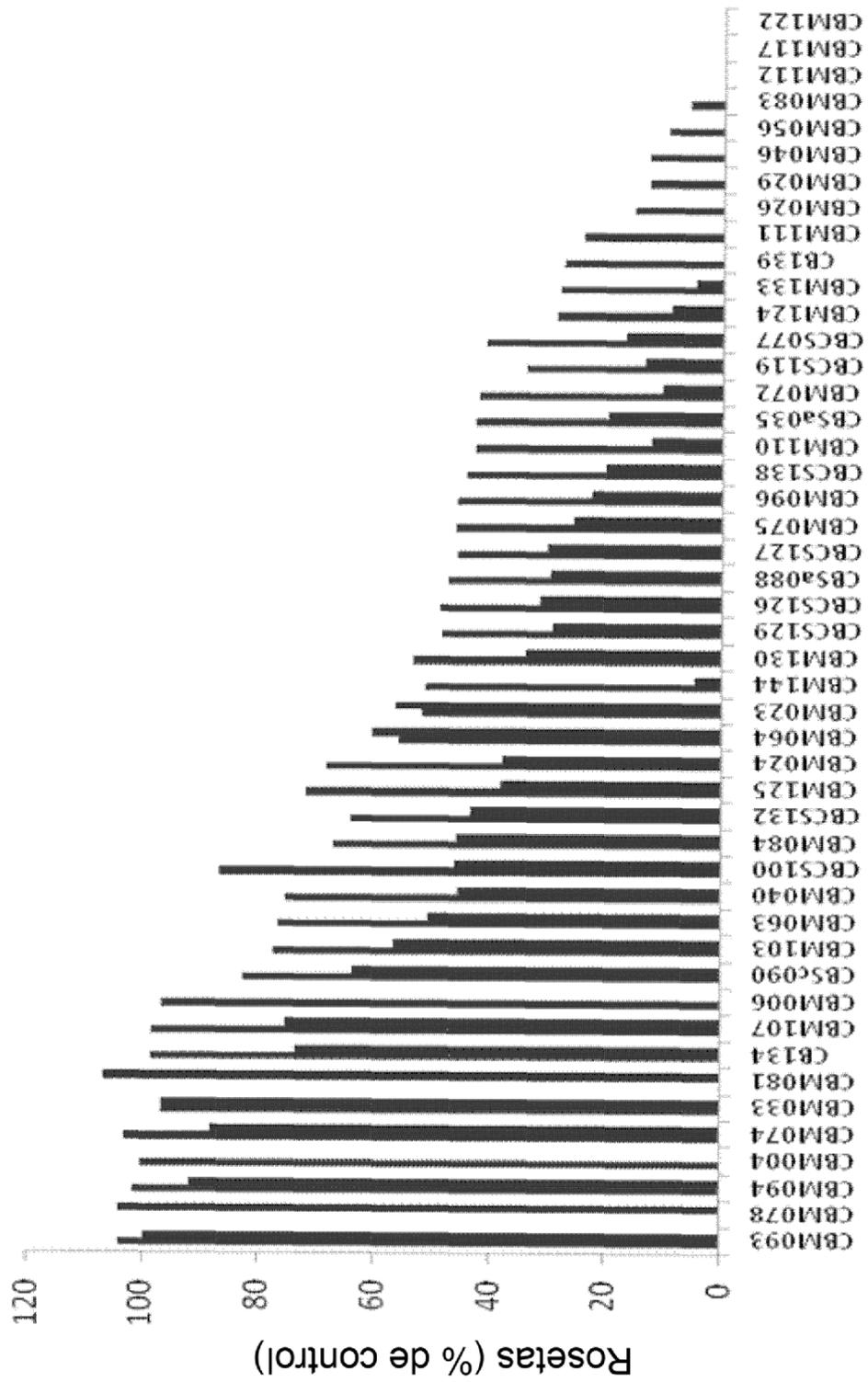


Fig. 6

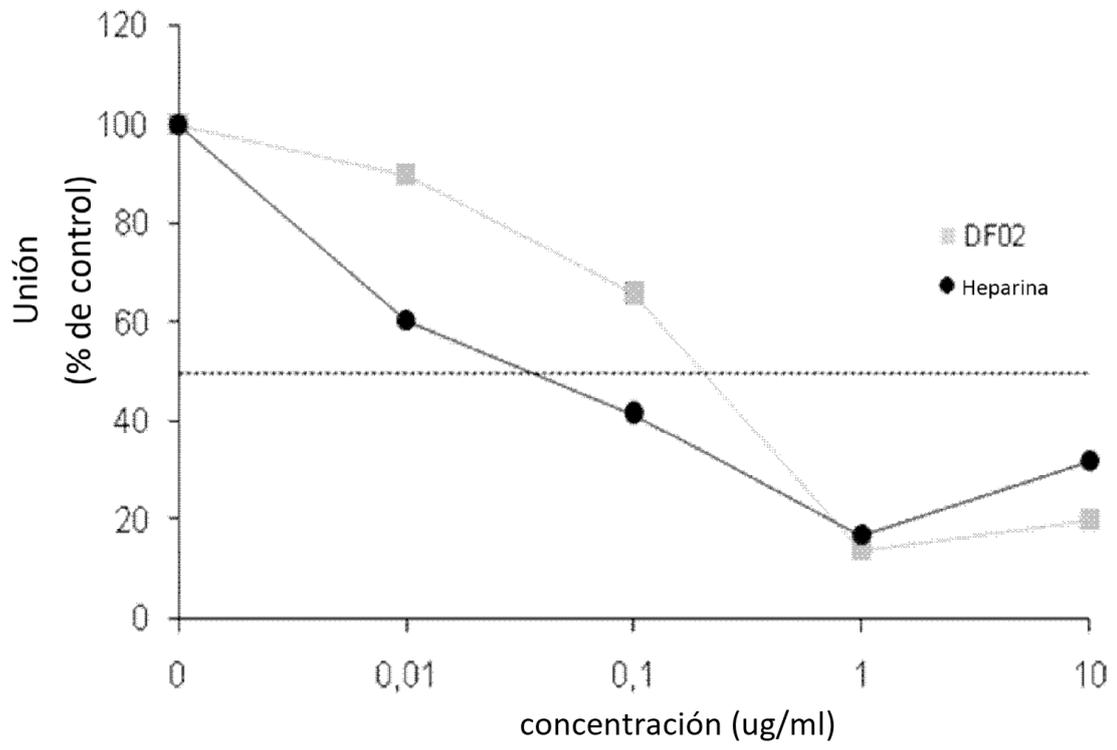


Fig. 7

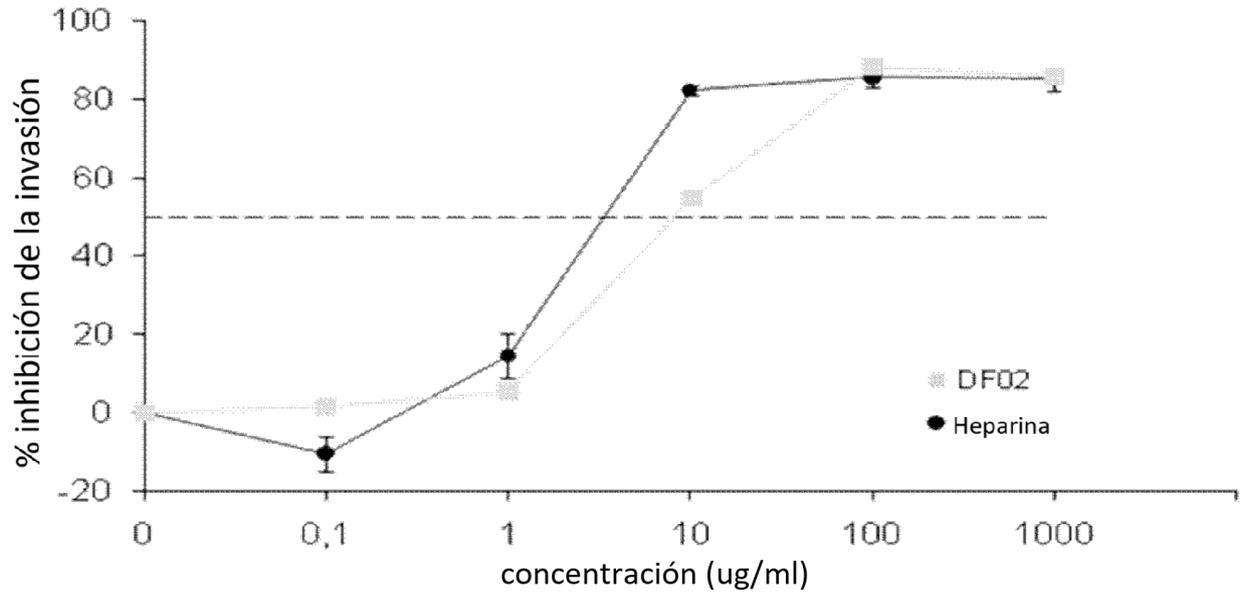


Fig. 8



Fig. 9