

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 238**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/715** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2013 PCT/US2013/023892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13116366**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2013 E 13704317 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2809326**

54 Título: **Polisacáridos sulfatados o sulfonatados no anticoagulantes**

30 Prioridad:

**30.01.2012 US 201261592549 P**

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

**08.02.2019**

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)**

**Zählerweg 4**

**6300 Zug, CH y**

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DOCKAL, MICHAEL;**

**SCHEIFLINGER, FRITZ;**

**KNAPPE, SABINE;**

**TILL, SUSANNE;**

**HAI, TON;**

**SANDERS, PAUL;**

**DANDE, PRASAD y**

**JIANG, CONG**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

ES 2 699 238 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

Polisacáridos sulfatados o sulfonatados no anticoagulantes

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/592.549, presentada el 30 de enero de 2012.

10 **Antecedentes de la invención**

La coagulación sanguínea normal es un proceso bioquímico y fisiológico complejo que implica la activación de una cascada de factores de coagulación que conduce a la formación de fibrina y a la agregación plaquetaria junto con vasoconstricción local (revisado por Davie, *et al.*, *Biochemistry*, 30:10363, 1991). La cascada de coagulación se compone de una ruta "extrínseca" que se cree que es el medio primario de iniciación de la coagulación normal y una ruta "intrínseca" que contribuye a una respuesta de coagulación ampliada. La respuesta normal a una lesión de hemorragia implica la activación de la ruta extrínseca. La activación de la ruta extrínseca se inicia cuando la sangre se pone en contacto con factor tisular (TF), un cofactor para el factor VII que queda expuesto o se expresa en tejidos tras la lesión. TF forma un complejo con FVII que facilita la producción de FVIIa. FVIIa se asocia entonces con TF para convertir FX en la serina proteasa FXa, que es un componente crítico del complejo de protrombinasa. La conversión de protrombina en trombina mediante el complejo de FXa/FVa/calci/fosfolípido estimula la formación de fibrina y la activación de las plaquetas, todo lo cual es esencial para la coagulación sanguínea normal. La hemostasia normal se potencia además por los factores de la ruta intrínseca IXa y VIIIa, que también convierten FX en FXa.

La coagulación sanguínea es inadecuada en trastornos de hemorragia, que pueden estar provocados por trastornos de la coagulación congénitos, trastornos de la coagulación adquiridos o estados hemorrágicos inducidos por traumatismo. La hemorragia es una de las manifestaciones más graves y significativas de una enfermedad, y puede producirse a partir de un sitio local o ser generalizada. La hemorragia localizada puede estar asociada con lesiones y puede complicarse además por un mecanismo hemostático defectuoso. Las deficiencias congénitas o adquiridas de cualquiera de los factores de coagulación pueden estar asociadas con una tendencia hemorrágica. Los trastornos de la coagulación congénitos incluyen hemofilia, un trastorno recesivo ligado al cromosoma X que implica una deficiencia de factor de coagulación VIII (hemofilia A) o factor IX (hemofilia B) y enfermedad de von Willebrand, un trastorno de hemorragia poco común que implica una deficiencia grave de factor de von Willebrand. Los trastornos de la coagulación adquiridos pueden surgir en individuos sin antecedentes previos de hemorragia como resultado de un proceso patológico. Por ejemplo, los trastornos de la coagulación adquiridos pueden estar provocados por inhibidores o autoinmunidad contra factores de coagulación sanguínea, tales como factor VIII, factor de von Willebrand, factores IX, V, XI, XII y XIII; o por trastornos hemostáticos tales como provocados por enfermedad hepática, que pueden estar asociados con disminución de la síntesis de factores de coagulación. Las deficiencias de factores de coagulación se tratan normalmente mediante reposición de los factores, lo que es caro, incómodo (intravenoso) y no siempre eficaz.

El tratamiento de trastornos de la coagulación sanguínea incluyendo hemofilia (hem), enfermedad de von Willebrand grave (svWD) y deficiencia de factor VII grave se tratan normalmente con factores de coagulación tales como factor VIII (usado para tratar hem y svWD). El inconveniente asociado con tratamientos centrados en la administración de factores de coagulación incluye su alto coste, la necesidad de administración intravenosa de estas proteínas y la generación de anticuerpos que neutralizan los efectos de los factores de coagulación. Hasta aproximadamente el 20 % de los pacientes que reciben terapia de reposición de factores crónicos pueden generar anticuerpos neutralizantes frente a los factores de reposición.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevos enfoques terapéuticos para tratar trastornos de hemorragia. Un único agente farmacéutico que sea seguro, conveniente y eficaz en una amplia gama de trastornos de hemorragia tendría un impacto favorable en la práctica clínica.

55 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona composiciones para tratar trastornos de hemorragia usando polisacáridos sulfatados o sulfonatados no anticoagulantes (NASP) como procoagulantes. Los NASP pueden administrarse como agentes individuales, o en combinación unos con otros, o con otros agentes hemostáticos. En particular, se proporciona el uso de NASP en el tratamiento de trastornos de hemorragia, incluyendo trastornos de la coagulación congénitos, trastornos de la coagulación adquiridos y estados hemorrágicos inducidos por traumatismo.

La presente invención proporciona numerosas ventajas. Por ejemplo, los polisacáridos como moléculas base para la sulfatación o sulfonación están estructuralmente bien definidos, muchos son de bajo peso molecular y están disponibles comercialmente. Además, la sulfatación o sulfonación química de polisacáridos permite el ajuste del grado de sulfatación o sulfonación y el patrón de sulfatación o sulfonación, lo que permite la caracterización de la

relación estructura-actividad de los polisacáridos sulfatados o sulfonatados. En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona una forma de dosificación oral que incorpora uno o más NASP de la invención, que mejora la atención al paciente a través de un aumento de la facilidad de administración y el cumplimiento del paciente.

5 En una realización, la invención proporciona un polisacárido sulfatado o sulfonato con la capacidad de potenciar la coagulación de sangre de mamíferos *in vivo* y/o *in vitro*. En diversas realizaciones, el polisacárido sulfatado o sulfonato tiene actividad procoagulante. En diversos aspectos la actividad procoagulante del polisacárido sulfatado o sulfonato es de suficiente magnitud como para poder medirse usando un ensayo convencional, por ejemplo, el ensayo de generación de trombina (TGA).

10 Polisacáridos sulfatados o sulfonados a modo de ejemplo de la invención se caracterizan por proporcionar a un sujeto al que se le administra uno de estos polisacáridos un efecto procoagulante terapéuticamente relevante. Polisacáridos sulfatados o sulfonados a modo de ejemplo de la invención también ejercen un efecto anticoagulante tras la administración a un sujeto; en diversas realizaciones, los polisacáridos de la invención no inducen un grado de efecto anticoagulante suficiente como para compensar completamente el efecto procoagulante del polisacárido.

15 En diversas realizaciones, la invención proporciona un polisacárido sulfatado o sulfonato en el que el polisacárido de base se selecciona de celotriosa, celotetraosa, celopentaosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, xilohexaosa, rafinosa, melecitosa, estaquiosa,  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina y 6-carboxicodextrina, e icodextrina. En diversas realizaciones el NASP de la invención disminuye el tiempo de coagulación sanguínea cuando se somete a prueba en el ensayo de TFPI-tiempo de protrombina diluido (TFPI-dPT).

20 En una realización a modo de ejemplo, el polisacárido sulfatado o sulfonato es de uso en un método para tratar a un sujeto que necesita una coagulación sanguínea potenciada que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado o sulfonato, no anticoagulante al sujeto.

25 En diversos aspectos, la memoria descriptiva proporciona un método para tratar a un sujeto que necesita coagulación sanguínea potenciada. El método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado o sulfonato no anticoagulante (NASP) de la invención al sujeto.

30 En determinados casos, la memoria descriptiva proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de hemorragia que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASP de la memoria descriptiva al sujeto.

35 En determinadas realizaciones, se administra un NASP de la invención a un sujeto para tratar un trastorno de hemorragia seleccionado del grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de coagulación (por ejemplo, factor XI, factor XII, precalicreína, y cininógeno de alto peso molecular (HMWK)), una deficiencia de uno o más factores asociados con hemorragia clínicamente significativa (por ejemplo, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia), y factor de von Willebrand), una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno (por ejemplo, afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia), una deficiencia de alfa2-antiplasmina y hemorragia excesiva tal como provocada por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y embarazo.

40 En determinadas realizaciones, se administra un NASP a un sujeto para tratar un trastorno de la coagulación congénito o un trastorno de la coagulación adquirido provocado por una deficiencia de factor sanguíneo. La deficiencia de factor sanguíneo puede estar provocada por deficiencias de uno o más factores (por ejemplo, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor XI, factor XII, factor XIII y factor de von Willebrand).

45 En realizaciones a modo de ejemplo, el NASP de la invención puede coadministrarse con uno o más NASP diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. En determinadas realizaciones, a un sujeto que tiene un trastorno de hemorragia se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASP de la invención en combinación con otro agente terapéutico. Por ejemplo, al sujeto puede administrársele una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASP de la invención y uno o más factores. Los factores a modo de ejemplo de uso en esta realización incluyen, sin limitación, factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa y factor de von Willebrand. El tratamiento puede comprender además administrar un procoagulante tal como trombina; un activador de la ruta de coagulación intrínseca, incluyendo factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína y HMWK; o un activador de la ruta de coagulación extrínseca, incluyendo factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa. Los agentes terapéuticos usados para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de hemorragia pueden administrarse en las mismas o diferentes composiciones y simultáneamente, antes o después de la administración de un NASP de la invención.

En diversos aspectos, la invención proporciona un método para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) de la invención al sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto puede haberse tratado con un anticoagulante, pero sin limitarse a, heparina, un derivado de cumarina, tal como warfarina o dicumarol, inhibidor de la ruta de factor tisular (TFPI), antitrombina III, anticoagulante lúpico, péptido anticoagulante de nematodos (NAPc2), factor VIIa bloqueado en el sitio activo (factor VIIai), inhibidores de factor IXa, inhibidores de factor Xa, incluyendo fondaparinux, idraparinux, DX-9065a y razaxabán (DPC906), inhibidores de factores Va y VIIIa, incluyendo proteína C activada (APC) y trombomodulina soluble, inhibidores de trombina, incluyendo hirudina, bivalirudina, argatroban y ximelagatrán. En determinadas realizaciones, el anticoagulante en el sujeto puede ser un anticuerpo que se une a un factor de coagulación, incluyendo pero sin limitarse a, un anticuerpo que se une a factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor XI, factor XII, factor de von Willebrand, precalicreína o cininógeno de alto peso molecular (HMWK).

En determinadas realizaciones, un NASP de la invención puede coadministrarse con uno o más NASP diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto. Por ejemplo, al sujeto puede administrársele una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASP de la invención y uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa y factor de von Willebrand. El tratamiento puede comprender además administrar un procoagulante, tal como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, incluyendo factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína y HMWK; o un activador de la ruta de coagulación extrínseca, incluyendo factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa. Los agentes terapéuticos usados en combinación con un NASP de la invención para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto pueden administrarse en las mismas o diferentes composiciones y simultáneamente, antes o después de la administración del NASP de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto que está sometido a un procedimiento quirúrgico o invasivo en el que es deseable una coagulación sanguínea mejorada. El método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) de la invención al sujeto. En determinadas realizaciones, el NASP de la invención puede coadministrarse con uno o más NASP diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos, tales como los factores y/o agentes procoagulantes comentados en el presente documento. Los agentes terapéuticos usados para tratar a un sujeto que está sometido a un procedimiento quirúrgico o invasivo pueden administrarse en las mismas o diferentes composiciones y simultáneamente, antes o después de la administración del NASP de la invención.

En otra realización, la invención proporciona un método de inhibición de la actividad de TFPI en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASP de la invención al sujeto.

En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona un método de inhibición de la actividad de TFPI en una muestra biológica. El método incluye combinar la muestra biológica (por ejemplo, sangre o plasma) con una cantidad suficiente de un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) de la invención para inhibir la actividad de TFPI.

En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende un NASP de la invención. En determinadas realizaciones, el NASP es un polisacárido sulfatado o sulfonatado en el que el polisacárido de base se selecciona de celotriosa, celotetraosa, celopentaosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, xilohexaosa, rafinosa, melecitosa, estaquiosa,  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina, 6-carboxiicodextrina, y en determinadas realizaciones, la composición comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la composición comprende además uno o más NASP diferentes, y/o uno o más agentes terapéuticos, y/o reactivos. Por ejemplo, la composición puede comprender además uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II y factor de von Willebrand, factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa; y/o una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en reactivo de APTT, tromboplastina, fibrina, TFPI, veneno de víbora de Russell, partículas de sílice micronizadas, ácido elágico, sulfátidos y caolín.

Estas y otras realizaciones de la invención sujeto se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la técnica en vista de la divulgación en el presente documento.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra la generación de trombina.

La figura 2 es un trombograma automático calibrado (CAT) a modo de ejemplo.

- 5 Las figuras 3A-B muestran CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye celotriosa. El NASP en la figura 3A estaba el 70 % no sulfatado; el 30 % monosulfatado; <1 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El oligosacárido era procoagulante a >300 μg/ml. El NASP en la figura 3B estaba el 30 % no sulfatado; el 70 % monosulfatado; <2 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml.
- 10 Las figuras 4A-B muestran CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye celotetrosa. El NASP en la figura 4A estaba el 80 % no sulfatado; el 20 % monosulfatado; <0,5 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml. El NASP en la figura 4B estaba el 40 % no sulfatado; el 30 % monosulfatado; el 30 % de producto de degradación; <1 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml.
- 15 Las figuras 4A-B muestran CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye celotetrosa. El NASP en la figura 4A estaba el 80 % no sulfatado; el 20 % monosulfatado; <0,5 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml. El NASP en la figura 4B estaba el 40 % no sulfatado; el 30 % monosulfatado; el 30 % de producto de degradación; <1 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml.
- 20 Las figuras 5A-B muestran CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye celopentosa. El NASP en la figura 5A estaba el 90 % no sulfatado; el 10 % monosulfatado; <0,5 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml. El NASP en la figura 5B estaba el 80 % no sulfatado; el 10 % monosulfatado; el 10 % de producto de degradación; <0,5 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml.
- 25 Las figuras 6A-B muestran CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye maltotriosa. El NASP en la figura 6A estaba el 50 % monosulfatado; el 25 % disulfatado; el 25 % trisulfatado; ~4 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml. El NASP en la figura 6B estaba el 60 % monosulfatado; el 40 % de producto de degradación; <2 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml.
- 30 Las figuras 7A-B muestran CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye maltotetrosa. El NASP en la figura 7A estaba el 70 % no sulfatado; el 30 % monosulfatado; <1 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml. El NASP en la figura 7B estaba el 50 % no sulfatado; el 50 % monosulfatado; <1 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml.
- 35 Las figuras 8A-B muestran CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye maltopentaosa. El NASP en la figura 8A estaba el 60 % no sulfatado; el 40 % monosulfatado; <1 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml. El NASP en la figura 8B estaba el 50 % no sulfatado; el 30 % monosulfatado; el 20 % de producto de degradación; <0,5 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml.
- 40 Las figuras 9A-B muestran CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye rafinosa. El NASP en la figura 9A estaba el 70 % no sulfatado; el 30 % monosulfatado; <1 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >100 μg/ml. El NASP en la figura 9B estaba el 20 % no sulfatado; el 30 % monosulfatado; el 50 % de producto de degradación; <1 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >100 μg/ml.
- 45 Las figuras 10A-B muestran CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye melecitosa. El NASP en la figura 10A estaba el 40 % no sulfatado; el 50 % monosulfatado; el 10 % disulfatado; <2 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >100 μg/ml. El NASP en la figura 10B estaba el 25 % no sulfatado; el 50 % monosulfatado; el 25 % monosulfatado; <3 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >30 μg/ml.
- 50 Las figuras 11A-B muestran CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye α-ciclodextrina. El NASP en la figura 11A estaba el 45 % no sulfatado; el 50 % monosulfatado; el 5 % disulfatado; <1 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml. El NASP en la figura 11B estaba el 50 % no sulfatado; el 50 % monosulfatado; el <1 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml.
- 55 Las figuras 12A-B muestran CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye β-ciclodextrina. El NASP en la figura 12A estaba el 70 % no sulfatado; el 30 % monosulfatado; <0,5 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml. El NASP en la figura 12B estaba el 60 % no sulfatado; el
- 60

40 % monosulfatado; <0,5 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >300 μg/ml.

5 La figura 13 muestra CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye α-ciclodextrina. El NASP en la figura 13 tenía el 15,3 % de S; ~64 % de sulfatación; ~11 sulfatos. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante a >0,5 μg/ml.

10 Las figuras 14A-B muestran un CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye β-ciclodextrina. La figura 14A muestra un NASP con el 13,5 % de S; ~56 % de sulfatación; ~12 sulfatos. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 2,1 mg/ml. La figura 14B muestra un NASP con el 18,9 % de S; ~2,9 kDa. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 0,7 μg/ml.

15 La figura 15 muestra un CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye melecitosa. El NASP contenía el 18,7 % de S; ~73 % de sulfatación; ~8 sulfatos. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 13,5 μg/ml.

20 La figura 16 muestra un CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye estaquiosa. El NASP contenía el 18,4 % de S; ~73 % de sulfatación; ~10 sulfatos. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 2,3 μg/ml.

25 La figura 17 es un CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye rafinosa. El NASP contenía el 14,9 % de S; ~58 % de sulfatación; ~6 sulfatos. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 7,4 μg/ml.

La figura 18 es un CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye maltotriosa. El NASP contenía el 15,7 % de S; ~61 % de sulfatación; ~7 sulfatos. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 20,6 μg/ml.

30 La figura 19 muestra un CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye maltotetraosa. El NASP contenía el 13,8 % de S; ~55 % de sulfatación; ~8 sulfatos. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 5,0 μg/ml.

35 La figura 20 muestra un CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye maltopentosa. El NASP contenía el 13,9 % de S; ~56 % de sulfatación; ~9 sulfatos. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 2,1 μg/ml.

40 La figura 21 muestra un CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye celotriosa. El NASP contenía el 12,8 % de S; ~50 % de sulfatación; ~5 sulfatos. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 30,9 μg/ml.

45 La figura 22 muestra un CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye celotetraosa. El NASP contenía el 13 % de S; ~51 % de sulfatación; ~7 sulfatos. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 4,8 μg/ml.

La figura 23 muestra un CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye celopentaosa. El NASP contenía el 18 % de S; ~72 % de sulfatación; ~12 sulfatos. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 1,9 μg/ml.

50 La figura 24 muestra un CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye xilohexaosa. El NASP contenía el 13,9 % de S; ~59 % de sulfatación; ~8 sulfatos. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 4,8 μg/ml.

55 La figura 25 muestra un CAT de plasma con FVIII inhibido que incluye maltopentosa. Se analizó maltopentosa sulfatada de peso molecular 1,4 kD y el 15 % de S. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. El polisacárido era procoagulante con una CE<sub>50</sub> de 2,4 μg/ml.

60 La figura 26 es una comparación de los CAT en plasma con FVIII inhibido que contiene maltopentosa o β-ciclodextrina. La maltopentosa contiene el 13,9 % de S; la β-ciclodextrina tiene el 18,9 % de S y un peso molecular de 2,9 kD. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. Los polisacáridos eran procoagulantes con una CE<sub>50</sub> de aproximadamente 2 μg/ml.

La figura 27 es una comparación de los CAT de plasma con FVIII inhibido que contiene maltopentosa (el 13,9 % de

S) y maltopentosa (<1 % de S). Esta comparación demuestra la relación de la sulfatación con la actividad procoagulante. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM.

5 La figura 28 es una comparación de los CAT de plasma con FVIII inhibido que contiene α-ciclodextrina (el 18,1 % de S), β-ciclodextrina (el 18,9 % de S) y γ-ciclodextrina (el 20,0 % de S). Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. Esta comparación demuestra la relación del peso molecular con la actividad procoagulante.

10 La figura 29 es una comparación de ensayos de aPTT con β-ciclodextrina, α-ciclodextrina y melezitosa. Esta comparación demuestra la actividad anticoagulante de los compuestos. Se determinó la concentración a la que el tiempo de coagulación está aumentado un 50 % con respecto a un control de plasma normal. Los oligosacáridos se vuelven anticoagulantes a su concentración procoagulante óptima.

15 La figura 30 es un tromboelastograma rotacional (ROTEM) de maltopentosa sulfatada (el 15 % de S) en sangre completa humana con FVIII inhibido (TF 0,044 pM), que muestra que la maltopentosa sulfatada restaura la coagulación en sangre con FVIII inhibido.

20 La figura 31 es un ROTEM de β-ciclodextrina sulfatada (el 18,9 % de S) en sangre completa humana con FVIII inhibido (TF 0,044 pM), que muestra que la β-ciclodextrina sulfatada restaura la coagulación en sangre con FVIII inhibido.

La figura 32 es un CAT de maltopentosa sulfatada (el 15 % de S) en plasma normal, que muestra que la maltopentosa sulfatada no activa la ruta de contacto en ausencia de CTI hasta 33 μg/ml. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM, PL 4 μM y ± CTI 41 μg/ml.

25 La figura 33 es un CAT de β-ciclodextrina sulfatada (2,9 kDa, el 18,9 % de S) en plasma normal, que muestra que β-ciclodextrina sulfatada no activa la ruta de contacto hasta 33 μg/ml. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM, PL 4 μM y ± CTI 41 μg/ml.

30 La figura 34 es un gráfico que muestra TFPI-dPT frente a log de concentración de maltopentosa sulfatada (el 15 % de S) en plasma humano normal, que muestra que la maltopentosa sulfatada revierte el efecto del inhibidor de la ruta de factor tisular de longitud completa recombinante (rec. FL-TFPI) en plasma. La CE<sub>50</sub> de este compuesto es de 0,15 μg/ml.

35 La figura 35 es un gráfico que muestra TFPI-dPT frente a log de concentración de β-ciclodextrina sulfatada (2,9 kDa, el 18,9 % de S) en plasma humano normal, que muestra que β-ciclodextrina sulfatada revierte el efecto de rec. FL-TFPI en plasma. La CE<sub>50</sub> de este compuesto es de 0,08 μg/ml.

40 La figura 36 es un esquema de síntesis que muestra una ruta de la síntesis *de novo* de oligosacáridos de fucosa sulfatados.

La figura 37 es un CAT en plasma con FVIII inhibido que muestra que los polisacáridos de fucosilo no tienen actividad procoagulante hasta 300 μg/ml. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM.

45 Las figuras 38A-B es un CAT en plasma con FVIII inhibido que muestra que los polisacáridos de fucosilo se vuelven anticoagulantes a >200 μg/ml. (A) sacárido de trifucosilo; (B) sacárido de pentafucosilo. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM.

La figura 39 muestra las estructuras de icodextrina/6-carboxi-icodextrina y xilano.

50 La figura 40 es un CAT en plasma con FVIII inhibido que muestra que xilano sulfatado (el 14,7 % de S, 22 kD) es procoagulante a bajas concentraciones. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM.

55 La figura 41 es un CAT en plasma con FVIII inhibido que muestra una comparación de dos xilanos sulfatados despolimerizados (6,5 kDa; el 13 % de S y 2,8 kDa; el 15,5 % de S). La despolimerización del xilano reduce la actividad procoagulante. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM.

60 La figura 42 es un CAT en plasma con FVIII inhibido que muestra una comparación de icodextrina y 6-carboxiicodextrina no sulfatadas. Las icodextrinas no sulfatadas no son procoagulantes. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM.

La figura 43 es un CAT en plasma con FVIII inhibido que muestra la actividad procoagulante de 6-carboxiicodextrina sulfatada (21,6 kDa, el 10,6 % de S), que es procoagulante a muy bajas concentraciones. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. La CE<sub>50</sub> de este compuesto es 0,04 μg/ml.

- La figura 44 es un CAT en plasma con FVIII inhibido que muestra la actividad procoagulante de 6-carboxiicodextrina sulfatada (35 kDa, el 10,1 % de S), que es procoagulante a muy bajas concentraciones. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM. La CE<sub>50</sub> de este compuesto es 0,07 μg/ml.
- 5 La figura 45 es un ROTEM de 6-carboxi-icodextrina sulfatada (35 kDa; el 10,1 % de S) en sangre completa con FVIII inhibido, que muestra que la 6-carboxiicodextrina sulfatada restaura la coagulación en sangre con FVIII inhibido humana.
- La figura 46 es un CAT de 6-carboxi-icodextrina sulfatada (35 kDa; el 10,1 % de S) en plasma normal, que muestra que 6-carboxi-icodextrina sulfatada activa la ruta de contacto a 33 μg/ml. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM, PL 4 μM y ± CTI 41 μg/ml.
- 10 La figura 47 es un gráfico que muestra TFPI-dPT frente a log de concentración de 6-carboxiicodextrina sulfatada (21,6 kDa, el 10,6 % de S) en plasma humano normal, que muestra que 6-carboxiicodextrina sulfatada revierte el efecto de rec. FL-TFPI en plasma. La CE<sub>50</sub> de este compuesto es 0,26 μg/ml.
- 15 La figura 48 muestra un diagrama de procedimiento a modo de ejemplo para el fraccionamiento de 6-carboxiicodextrina.
- 20 La figura 49 muestra cromatogramas de exclusión molecular de 6-carboxiicodextrina sulfatada fraccionada.
- La figura 50 es un CAT que muestra la actividad procoagulante de fracciones de 6-carboxiicodextrina sulfatada (>10 kDa, 3-10 kDa, <3 kDa) en plasma con FVIII inhibido. Incluso 6-carboxi-icodextrina sulfatada de bajo peso molecular es procoagulante. Las mediciones se tomaron a 37 °C de temperatura con hTF 1 pM y PL 4 μM.
- 25 La figura 51 muestra cromatogramas de exclusión molecular de icodextrina sulfatada fraccionada. El fraccionamiento conduce a una muestra con distribuciones de peso molecular diferentes.
- La figura 52 es una tabla que muestra las CE<sub>50</sub> y razones de aPTT/CAT para fracciones de 6-carboxi-icodextrina sulfatada.
- 30 La figura 53 es un CAT que muestra la actividad procoagulante de fracciones de icodextrina sulfatada (>10 kDa, 3-10 kDa, <3 kDa) en plasma con FVIII inhibido. Incluso icodextrina sulfatada de bajo peso molecular es procoagulante. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM.
- 35 La figura 54 es una tabulación de NASP representativos de la invención y sus valores de CE<sub>50</sub> derivados de ensayos de CAT.
- La figura 55 es una ruta de síntesis a modo de ejemplo para la sulfatación de 6-carboxi-icodextrina.
- 40 La figura 56 es una tabulación de ventanas terapéuticas y concentraciones óptimas para xilano sulfatado de la invención.
- La figura 57 muestra CAT que comparan el efecto sobre la actividad procoagulante de la sulfatación del xilano en diferentes condiciones. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM.
- 45 La figura 58 muestra CAT que comparan el efecto sobre la actividad procoagulante de la sulfatación del xilano en diferentes condiciones. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM.
- 50 La figura 59 es un CAT en plasma con FVIII inhibido que muestra que un tiempo de reacción de sulfatación más prolongado no altera las propiedades procoagulantes del NASP. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM.
- La figura 60 es un CAT en plasma con FVIII inhibido que muestra que la sulfatación de 6-carboxiicodextrina confiere actividad procoagulante a muy bajas concentraciones del compuesto. Las mediciones se tomaron a 37 °C con hTF 1 pM y PL 4 μM.
- 55 La figura 61 es un gráfico del tiempo de coagulación determinado mediante ensayos de aPTT frente a la concentración de NASP que muestra que los NASP sulfatados de la invención son más anticoagulantes que un control (fucoidano).
- 60 La figura 62 compara datos de CAT y aPTT de xilanos sulfatados que muestran que los xilanos sulfatados no son anticoagulantes a su concentración procoagulante óptima.
- 65 La figura 63 muestra los resultados de CAT y aPTT de 6-carboxi-icodextrina sulfatada (el 11 % de S) que muestra

que este NASP no es anticoagulante a su concentración procoagulante óptima. Las mediciones se tomaron a 37 °C.

La figura 64 es una tabulación de la concentración a la que la actividad anticoagulante comienza y el tiempo de coagulación máximo para NASP seleccionados de la invención.

La figura 65 es una ruta de síntesis a modo de ejemplo para la síntesis de xilano sulfatado.

Las figuras 66A-B son una tabla de matriz que muestra combinaciones a modo de ejemplo de determinados tipos de NASP (basándose en su polisacárido de base) con agentes adicionales.

Las figuras 67A-G son una tabla de matriz que muestra dosificaciones a modo de ejemplo del respectivo NASP en cada una de las combinaciones identificadas en la figura 66A-B.

La figura 68 es una tabla que muestra dosificaciones a modo de ejemplo de agentes adicionales en los productos terapéuticos de combinación de la invención.

La figura 69 es la resorción de maltopentaosa sulfatada en el modelo de células Caco-2 con o sin potenciadores de la penetración: la cantidad de NASP transportada sobre el lado basolateral de las células se determinó mediante un ensayo basado en actividad de generación de trombina en plasma humano con FVIII inhibido.

La figura 70 es la resorción de  $\beta$ -ciclodextrina sulfatada en el modelo de células Caco-2 con o sin potenciadores de la penetración: la cantidad de NASP transportada sobre el lado basolateral de las células se determinó mediante un ensayo basado en actividad de generación de trombina en plasma humano con FVIII inhibido.

La figura 71 es una resorción de 6-carboxi-icodextrina sulfatada fraccionada (lote 137) en el modelo de células Caco-2 con o sin potenciadores de la penetración: la cantidad de NASP transportada sobre el lado basolateral de las células se determinó mediante un ensayo basado en actividad de generación de trombina en plasma humano con FVIII inhibido.

La figura 72 es una resorción de 6-carboxi-icodextrina sulfatada no fraccionada (lote 171A) en el modelo de células Caco-2 con o sin potenciadores de la penetración: la cantidad de NASP transportada sobre el lado basolateral de las células se determinó mediante un ensayo basado en actividad de generación de trombina en plasma humano con FVIII inhibido.

La figura 73 es un ensayo de TEG que muestra que el tiempo de coagulación (tiempo R) disminuye tras la administración intravenosa de 6-carboxi-icodextrina sulfatada a cobayas con FVIII inhibido. Se les inyectó a cobayas tratadas con plasma anti-inhibidor de FVIII cuatro dosis de 6-carboxi-icodextrina sulfatada, solución salina o FEIBA ( $N = 5$  por duplicado cada una). Cinco minutos tras la administración, se realizaron mediciones de TEG con sangre completa con citrato y se registró el tiempo R. Se observó un efecto procoagulante superior al control de vehículo tal como se refleja por una reducción en el tiempo R, para NASP a 0,15 y 0,45 mg/kg y el control positivo FEIBA. El gráfico muestra medianas y resultados individuales.

## Descripción detallada de la invención

### Introducción

Los trastornos de la coagulación sanguínea incluyendo hemofilia (Hem) A y Hem B, enfermedad de von Willebrand grave (svWD) y deficiencia de factor VII (FVII) grave se han tratado normalmente mediante terapia de reposición de factores, por ejemplo, factor VIII para Hem A y svWD, factor IX para Hem B y factor VII(a) para deficiencia de FVII y otros (revisado en Bishop, *et al.* (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3:684-694; Carcao, *et al.* (2004) *Blood Rev.*, 18:101-113; Roberts, *et al.* (2004) *Anesthesiology* 100:722-730; y Lee (2004) *Int. Anesthesiol. Clin.*, 42:59-76). Aunque tales terapias son a menudo eficaces, las características que limitan la utilidad incluyen el alto coste, la incomodidad (es decir, administración intravenosa) y la generación de anticuerpos neutralizantes (Bishop, *et al.*, citado anteriormente; Carcao, *et al.*, citado anteriormente; Roberts, *et al.*, citado anteriormente; Lee, citado anteriormente; y Bohn, *et al.* (2004) *Haemophilia* supl. 10, 1:2-8). Aunque FVIIa está utilizándose cada vez más en diversos trastornos de hemorragia (Roberts, *et al.*, citado anteriormente), son de interés terapias procoagulantes con un único compuesto alternativas carentes de las restricciones mencionadas anteriormente y con amplia aplicación.

Un enfoque general para mejorar la hemostasia en individuos con trastornos de hemorragia es mejorar el inicio de la coagulación regulando por incremento la ruta extrínseca de coagulación sanguínea. Mientras que las rutas intrínseca y extrínseca de la coagulación contribuyen a la generación de trombina y la formación del coágulo de fibrina (Davie, *et al.* (1991) *Biochemistry*, 30:10363-10370), la ruta extrínseca (o medida por factor tisular (TF)) es crítica para el inicio, y contribuye a la propagación de la coagulación *in vivo* (Mann (2003) *Chest*, 124(supl. 3): 1S-3S; Rapaport, *et al.* (1995) *Thromb. Haemost.*, 74:7-17). Un posible mecanismo para regular por incremento la actividad de la ruta extrínseca es la atenuación del inhibidor de la ruta de factor tisular (TFPI). TFPI es un inhibidor de proteinasa de tipo Kunitz de FVIIa/TF que proporciona regulación por disminución tónica de la activación de la ruta extrínseca

(véase Broze (1992) *Semin. Hematol.*, 29:159-169; Broze (2003) *J. Thromb. Haemost.*, 1:1671-1675; y Johnson, *et al.* (1998) *Coron. Artery Dis.*, 9(2-3):83-87 para una revisión). De hecho, la deficiencia de TFPI heterocigota en ratones puede dar como resultado la exacerbación de la formación de trombos (Westrick, *et al.* (2001) *Circulation*, 103:3044-3046) y la mutación del gen de TFPI es un factor de riesgo de trombosis en seres humanos (Kleesiek, *et al.* (1999) *Thromb. Haemost.*, 82:1-5). La regulación de la coagulación en hemofilia por medio de la sección como diana de TFPI la describieron Nordfang, *et al.* y Wun, *et al.*, que mostraron que anticuerpos anti-TFPI podrían acortar el tiempo de coagulación de plasma hemofílico (Nordfang, *et al.* (1991) *Thromb. Haemost.*, 66:464-467; Welsch, *et al.* (1991) *Thromb. Res.*, 64:213-222) y que IgG anti-TFPI mejoraba el tiempo de hemorragia de conejos que eran deficientes en factor VIII (Erhardtsen, *et al.* (1995) *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 6:388-394).

Como clase, los polisacáridos sulfatados se caracterizan por una plétora de actividades biológicas con perfiles de tolerabilidad a menudo favorables en animales y seres humanos. Estas moléculas polianiónicas se derivan a menudo de tejidos vegetales y animales y abarcan una amplia gama de subclases incluyendo heparinas, glicosaminoglicanos, fucoidanos, carragenanos, polisulfatos de pentosano y sulfatos de dermatano o dextrano (Toida, *et al.* (2003) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 15:29-46). Se han notificado polisacáridos sulfatados sintetizados químicamente, de peso molecular inferior, menos heterogéneos y han alcanzado diversas fases de desarrollo de fármacos (Sinay (1999) *Nature*, 398:377-378; Bates, *et al.* (1998) *Coron. Artery Dis.*, 9:65-74; Orqueira, *et al.* (2003) *Chemistry*, 9:140-169; McAuliffe (1997) *Chemical Industry Magazine*, 3:170-174; Williams, *et al.* (1998) *Gen. Pharmacol.*, 30:337-341). Los polisacáridos sulfatados de tipo heparina presentan actividad anticoagulante diferencial mediada a través de las interacciones de antitrombina III y/o cofactor de heparina II (Toida, *et al.*, citado anteriormente). De manera notable, determinados compuestos, de origen natural o químicamente modificados, presentan otras actividades biológicas a concentraciones (o dosis) a las que la actividad anticoagulante no es sustancial (Williams, *et al.* 1998) *Gen. Pharmacol.*, 30:337-341; Wan, *et al.* (2002) *Inflamm. Res.*, 51:435-443; Bourin, *et al.* (1993) *Biochem. J.*, 289 (Pt 2):313-330; Mc-Caffrey, *et al.* (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184:773-781; Luyt, *et al.* (2003) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 305:24-30). Además, se ha mostrado que el sulfato de heparina presenta fuertes interacciones con TFPI (Broze (1992) *Semin. Hematol.*, 29:159-169; Broze (2003) *J. Thromb. Haemost.*, 1:1671-1675; Johnson, *et al.* (1998) *Coron. Artery Dis.*, 9:83-87; Novotny, *et al.* (1991) *Blood*, 78(2):394-400).

Tal como se describe en el presente documento, determinados polisacáridos sulfatados o sulfonatados interactúan con TFPI e inhiben su actividad a concentraciones inferiores a las asociadas con anticoagulación. Tales moléculas pueden usarse en entornos en los que la formación de coágulos se ve comprometida.

Antes de describir la presente invención en detalle, ha de entenderse que esta invención no se limita a formulaciones o parámetros de procedimiento particulares ya que tales pueden variar, por supuesto. Ha de entenderse también que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares de la invención solo, y no pretende ser limitativa.

Aunque pueden usarse varios métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en el presente documento.

#### Definiciones

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan tal como se indica a continuación.

Tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un NASP” incluye una mezcla de dos o más de tales agentes, y similares.

Un “NASP” tal como se usa en el presente documento se refiere a un polisacárido sulfatado o sulfonatado que presenta actividad anticoagulante en un ensayo de coagulación de tiempo de protrombina diluido (dPT) o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) que es no mayor de un tercio, y preferiblemente menor de un décimo, de la actividad anticoagulante (aumento en el tiempo de coagulación) de heparina sin fraccionar (por ejemplo, tal como se mide mediante el aumento por µg/ml). Los NASP de la invención pueden purificarse y/o modificarse a partir de fuentes naturales (por ejemplo, algas pardas, corteza de árbol, tejido animal) o pueden sintetizarse *de novo* y pueden oscilar en peso molecular desde 100 Daltons hasta 1 000 000 de Daltons. Los NASP de la invención pueden usarse en los métodos de la invención para mejorar la hemostasia en el tratamiento de trastornos de hemorragia, particularmente los asociados con deficiencias de factores de coagulación o para revertir los efectos de anticoagulantes. La capacidad de los NASP de la invención para promover la coagulación y reducir la hemorragia se determina fácilmente usando diversos ensayos de coagulación y hemostáticos globales *in vitro* (por ejemplo, ensayos de TFPI-dPT, aPTT, CAT y ROTEM) y modelos de hemorragia *in vivo* (por ejemplo, transección de la cola, corte transversal, tiempo de coagulación sanguínea completo o determinación del tiempo de hemorragia de la cutícula en perros o ratones hemofílicos). Véase, por ejemplo, PDR Staff. *Physicians' Desk Reference*. 2004, Anderson, *et al.* (1976) *Thromb. Res.*, 9:575-580; Nordfang, *et al.* (1991) *Thromb Haemost.*, 66:464-467; Welsch, *et*

*al.* (1991) *Thrombosis Research*, 64:213-222; Broze, *et al.* (2001) *Thromb Haemost*, 85:747-748; Scallan, *et al.* (2003) *Blood*, 102:2031-2037; Pijnappels, *et al.* (1986) *Thromb. Haemost.*, 55:70-73; y Giles, *et al.* (1982) *Blood*, 60:727-730.

5 Un "procoagulante" se usa en el presente documento en su sentido convencional para referirse a cualquier factor o reactivo capaz de iniciar o acelerar la formación de coágulos. Los procoagulantes a modo de ejemplo incluyen un NASP, cualquier activador de las rutas de coagulación intrínseca o extrínseca, tales como un factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste en factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína, HMWK, factor tisular, factor VIIa y factor Va. Otros reactivos que promueven la coagulación incluyen calicreína, iniciador de APTT (es decir, un reactivo que contiene un fosfolípido y un activador de contacto), veneno de víbora de Russel (RVV) y tromboplastina (para dPT). Los activadores de contacto que pueden usarse en los métodos de la invención como reactivos procoagulantes incluyen partículas de sílice micronizadas, ácido elágico, sulfátidos, caolín o similares conocidos por los expertos en la técnica. Los procoagulantes pueden ser de un extracto natural en bruto, una muestra de sangre o plasma, aislada y sustancialmente purificada, sintética o recombinante. Los procoagulantes pueden incluir factores de coagulación que se producen de manera natural o fragmentos, variantes o derivados modificados covalentemente de los mismos que conservan la actividad biológica (es decir, promueven la coagulación). Las concentraciones óptimas y las dosificaciones del procoagulante para tratar una enfermedad seleccionada pueden determinarlas los expertos en la técnica.

20 El término "polisacárido," tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que comprende una pluralidad (es decir, dos o más) de residuos de sacárido covalentemente unidos. Las uniones pueden ser naturales o no naturales. Las uniones naturales incluyen, por ejemplo, enlaces glicosídicos, mientras que las uniones no naturales pueden incluir, por ejemplo, restos de unión éster, amida u oxima. Los polisacáridos tienen cualquiera de una amplia gama de valores de peso molecular (PM) promedio, pero generalmente son de al menos aproximadamente 100 Daltons. Por ejemplo, los polisacáridos pueden tener pesos moleculares de al menos aproximadamente 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10 000, 20 000, 30 000, 50 000, 100 000, 500 000 Daltons o superiores. Los polisacáridos pueden tener una cadena lineal o estructuras ramificadas. Los polisacáridos pueden incluir fragmentos de polisacáridos generados mediante degradación (por ejemplo, hidrólisis) de polisacáridos más grandes. La degradación puede lograrse mediante cualquiera de una variedad de medios conocidos por los expertos en la técnica incluyendo tratamiento de polisacáridos con ácido, base, calor o enzimas para producir polisacáridos degradados. Los polisacáridos pueden alterarse químicamente y pueden tener modificaciones, incluyendo pero sin limitarse a, sulfatación, polisulfatación, sulfonación, polisulfonación, esterificación y alquilación, por ejemplo, metilación.

35 El término "derivado de" se usa en el presente documento para identificar la fuente original de una molécula pero no pretende limitar el método mediante el que se prepara la molécula que puede ser, por ejemplo, mediante síntesis química o medios recombinantes.

40 "Peso molecular", tal como se comenta en el presente documento, puede expresarse como o bien un peso molecular promedio en número o bien un peso molecular promedio en peso. A menos que se indique lo contrario, todas las referencias a peso molecular en el presente documento se refieren al peso molecular promedio en peso. Ambas determinaciones de peso molecular, promedio en número y promedio en peso, pueden medirse usando, por ejemplo, cromatografía de penetración en gel u otras técnicas de cromatografía de líquidos.

45 "Farmacéuticamente aceptable" significa que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y ni indeseable biológicamente ni de otra forma e incluye que es aceptable para uso veterinario así como uso farmacéutico en humanos.

50 La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento significa la cantidad de un compuesto, material o composición que comprende un NASP de la presente invención que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado, a una razón de beneficio/riesgo razonable, tal como las generalmente aplicables al tratamiento del trastorno de hemorragia usando productos farmacéuticos convencionales. "Dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" de un NASP, factor sanguíneo u otro agente terapéutico se refiere a una cantidad de esta sustancia que, cuando se administra tal como se describe en el presente documento, ocasiona una respuesta terapéutica positiva, tal como hemorragia reducida o tiempos de coagulación más cortos.

60 El término "sales farmacéuticamente aceptables" incluye sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, pueden obtenerse sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, o bien pura o bien en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, pueden obtenerse sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, o bien puro o bien en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen

las derivadas de ácidos inorgánicos como ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o fosforoso y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge *et al.*, *Journal of Pharmaceutical Science*, 66: 1-19 (1977)). Determinados compuestos específicos de la presente invención contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de o bien base o bien ácido.

Cuando un residuo se define como "SO<sub>3</sub>", entonces la fórmula pretende incluir opcionalmente un contraión catiónico orgánico o inorgánico. Preferiblemente, la forma de sal resultante del compuesto es farmacéuticamente aceptable. Esta estructura también abarca la especie protonada, "SO<sub>3</sub>H".

Las formas neutras de los compuestos se regeneran preferiblemente poniendo en contacto la sal con una base o un ácido y aislando el compuesto original de la manera convencional. La forma original del compuesto difiere de las diversas formas de sal en determinadas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a la forma original del compuesto para los propósitos de la presente invención.

El término "trastorno de hemorragia" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier trastorno asociado con hemorragia excesiva, tal como un trastorno de la coagulación congénito, un trastorno de la coagulación adquirido o un estado hemorrágico inducido por traumatismo. Tales trastornos de hemorragia incluyen, pero no se limitan a, hemofilia (Hem) A, Hem B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de coagulación, tales como factor XI, factor XII, precalicreína y HMWK, una deficiencia de uno o más factores asociados con hemorragia clínicamente significativa, tal como factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia) y factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, incluyendo afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa2-antiplasmina, y hemorragia excesiva tal como la provocada por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y embarazo.

"Icodex", tal como se usa en el presente documento se refiere a 6-carboxi-icodextrina sulfatada.

Por "sujeto" quiere decirse cualquier miembro del subfilo Chordata, incluyendo, sin limitación, humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves, incluyendo aves domésticas, silvestres y de caza tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares. El término no indica una edad particular. Por tanto, tanto individuos adultos como recién nacidos son de interés.

El término "paciente" se usa en su sentido convencional para referirse a un organismo vivo que padece o es propenso a un estado que puede prevenirse o tratarse mediante la administración de un NASP de la invención, e incluye tanto humanos como especies no humanas.

"TFPI" y "fTFPI", tal como se usan en el presente documento, se refieren a inhibidor de la ruta de factor tisular e inhibidor de la ruta de factor tisular de longitud completa, respectivamente.

"TFPI160" se refiere a un polipéptido que incluye los aminoácidos 1-160, incluyendo los dominios KD1 y KD2, de TFPI. El KD3 y extremo C-terminal de TFPI de longitud completa están ausentes.

## LAS REALIZACIONES

Los aspectos de la invención incluyen composiciones, formulaciones que contienen estas composiciones y métodos para potenciar la coagulación sanguínea en un sujeto. En la puesta en práctica de los métodos según determinadas realizaciones, se administra una cantidad de un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) a un sujeto de una manera suficiente para potenciar la coagulación sanguínea en el sujeto. También se proporcionan kits para la puesta en práctica de los métodos de la invención.

Antes de que la invención se describa en mayor detalle, ha de entenderse que la invención no se limita a las realizaciones particulares descritas en el presente documento ya que tales realizaciones pueden variar. Ha de entenderse también que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares solo, y la terminología no pretende ser limitativa. El alcance de la invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Cuando se proporciona un intervalo de valores, ha de entenderse que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario,

entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, se abarca dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden estar independientemente incluidos en los intervalos más pequeños y también se abarcan dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos de los límites, también se incluyen en la invención intervalos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos. Determinados intervalos se presentan en el presente documento con valores numéricos que van precedidos por el término "aproximadamente." El término "aproximadamente" se usa en el presente documento para proporcionar soporte literal para el número exacto al que precede, así como un número que está próximo a o es aproximadamente el número al que precede el término. Al determinar si un número está próximo a o es aproximadamente un número mencionado específicamente, el número no mencionado próximo o aproximado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número mencionado específicamente. La mención de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la invención descrita en el presente documento no tiene derecho a anteceder a tal publicación en virtud de invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas podrían ser diferentes de las fechas de publicación reales, lo que puede necesitar confirmación independiente.

Se indica que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta afirmación pretende servir como base de antecedente para el uso de terminología exclusiva tal como "únicamente", "solo", y similares en relación con la mención de elementos de reivindicaciones, o el uso de una limitación "negativa". Tal como resultará evidente para los expertos en la técnica tras la lectura de esta divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en el presente documento tiene componentes y características diferenciados que pueden fácilmente separarse de o combinarse con las características de cualquiera de las otras y varias realizaciones sin apartarse del alcance de la invención. Cualquier método mencionado puede llevarse a cabo en el orden de acontecimientos mencionado o en cualquier otro orden que sea posible lógicamente. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento puede usarse también en la práctica o las pruebas de la invención, se describen ahora métodos y materiales ilustrativos representativos.

#### A. NASP

En un aspecto, la invención proporciona un polisacárido sulfatado o sulfonatado con la capacidad de potenciar coagulación de sangre de mamíferos *in vivo* o *in vitro*. En diversas realizaciones, el polisacárido sulfatado o sulfonatado tiene actividad procoagulante. En una realización a modo de ejemplo, la actividad procoagulante del polisacárido sulfatado o sulfonatado es de magnitud suficiente que puede medirse usando un ensayo hemostático global convencional, por ejemplo, el ensayo de generación de trombina (TGA).

Los NASP a modo de ejemplo de la invención se caracterizan por proporcionar a un sujeto al que se le administra uno de estos polisacáridos un efecto procoagulante terapéuticamente eficaz. Los NASP a modo de ejemplo de la invención también ejercen un efecto anticoagulante tras la administración a un sujeto; en diversas realizaciones, los NASP de la invención no inducen un grado de efecto anticoagulante suficiente para compensar por completo el efecto procoagulante terapéuticamente eficaz del NASP. Los NASP a modo de ejemplo de la invención son procoagulantes a una concentración de desde aproximadamente 0,01  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 700  $\mu\text{g/ml}$  de plasma (por ejemplo, plasma humano), por ejemplo, desde aproximadamente 10  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 600  $\mu\text{g/ml}$  de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 20  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 500  $\mu\text{g/ml}$  de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 30  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 400  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, desde aproximadamente 40  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 300  $\mu\text{g/ml}$  de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 50  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 200  $\mu\text{g/ml}$  de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 60  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 100  $\mu\text{g/ml}$  de plasma. En diversas realizaciones, los NASP de la invención tienen un efecto procoagulante a concentraciones de desde aproximadamente 1  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 300  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, desde aproximadamente 5  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 250  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, desde aproximadamente 10  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 200  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, desde aproximadamente 15  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 150  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, desde aproximadamente 20  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 100  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, desde aproximadamente 25  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 50  $\mu\text{g/ml}$ . En diversas realizaciones, los compuestos de la invención tienen un efecto procoagulante a una concentración de no más de aproximadamente 400  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, no más de aproximadamente 350  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, no más de aproximadamente 300  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, no más de aproximadamente 250  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, no más de aproximadamente 200  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, no más de aproximadamente 150  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, no más de aproximadamente 100  $\mu\text{g/ml}$ , por ejemplo, no más de aproximadamente 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Los NASP de la invención son sustancialmente no anticoagulantes a las concentraciones mencionadas anteriormente ya que la generación de trombina está por encima del nivel de en plasma en hemofilia tal como se mide en un ensayo convencional tal como trombografía automática calibrada (CAT), ejemplos de lo cual se exponen en el presente documento. Véase, por ejemplo, el ejemplo 2 y la figura 3. Tanto el efecto procoagulante como la trombina pico pueden medirse mediante CAT.

Los NASP a modo de ejemplo de la invención son polisacáridos sulfatados o sulfonatados con actividad procoagulante y actividad anticoagulante. Las propiedades anticoagulantes de posibles NASP se determinan usando los ensayos de coagulación de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). Los polisacáridos sulfatados o sulfonatados no anticoagulantes presentan no más de un tercio, y preferiblemente menos de un décimo, de la actividad anticoagulante (medida mediante un aumento estadísticamente significativo en el tiempo de coagulación) de heparina sin fraccionar.

La capacidad de los NASP para promover la coagulación y reducir la hemorragia se determina fácilmente usando diversos ensayos hemostáticos globales y de coagulación *in vitro* (por ejemplo, ensayos de dPT, aPTT, CAT y ROTEM) y modelos de hemorragia *in vivo* (por ejemplo, recorte y/o transección de la cola o determinación del tiempo de hemorragia de la cutícula en ratones o perros hemofílicos). Véase, por ejemplo, PDR Staff. *Physicians' Desk Reference*, 2004, Nordfang, *et al.* (1991) *Thromb Haemost.*, 66:464-467; Anderson, *et al.* (1976) *Thromb. Res.*, 9:575-580; Welsch, *et al.* (1991) *Thrombosis Research*, 64:213-222; Broze, *et al.* (2001) *Thromb Haemost.*, 85:747-748; Scallan, *et al.* (2003) *Blood*, 102:2031-2037; Pijnappels, *et al.* (1986) *Thromb. Haemost.*, 55:70-73; y Giles, *et al.* (1982) *Blood*, 60:727-730. Los ensayos de coagulación pueden realizarse en presencia de uno o más NASP y uno o más factores sanguíneos, procoagulantes u otro agente terapéutico. Por ejemplo, pueden administrarse uno o más factores conjuntamente con uno o más NASP, incluyendo pero sin limitarse a, factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II y factor de von Willebrand, factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa; y/o uno o más agentes terapéuticos, incluyendo pero sin limitarse a, reactivo de APTT, tromboplastina, fibrina, TFPI, veneno de víbora de Russell, partículas de sílice micronizadas, ácido elálgico, sulfátidos y caolín.

Los ejemplos y las figuras adjuntas a los mismos confirman que los agentes a los que se hace referencia en el presente documento como NASP son verdaderamente "no anticoagulantes", es decir, no aumentan significativamente los tiempos de coagulación dentro de un intervalo de concentración seleccionado. Tales compuestos pueden usarse en los métodos y las composiciones de la presente invención siempre que cualquier actividad anticoagulante que puedan presentar solo aparezca a concentraciones significativamente por encima de la concentración a la que presentan actividad procoagulante. La razón de la concentración a la que se producen propiedades anticoagulantes no deseadas con respecto a la concentración a la que se producen actividades procoagulantes deseadas se denomina índice procoagulante (por ejemplo, índice terapéutico) para el NASP en cuestión. Un índice terapéutico a modo de ejemplo para NASP de la presente invención es de aproximadamente 3, 5, 10, 30, 100, 300, 1000 o más. En una realización a modo de ejemplo, la razón aPTT:CAT se determina usando métodos convencionales, en la que "aPTT" es el tiempo de tromboplastina parcial activada y "CAT" es trombografía automática calibrada. Por ejemplo, en el caso del ensayo de CAT, la CE<sub>50</sub> se deriva de la curva de generación de trombina (CAT). En el caso del ensayo de aPTT, se determina la concentración a la que el tiempo de coagulación está aumentado un 50 % con respecto a un control de plasma normal. A partir de esos valores puede calcularse la razón aPTT/CAT.

En diversas realizaciones, la invención proporciona NASP que incluyen al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 % o al menos aproximadamente el 20 % de azufre. En una realización a modo de ejemplo, esta cantidad de azufre se determina mediante análisis elemental del NASP.

En realizaciones a modo de ejemplo, los NASP de la invención tienen una CE<sub>50</sub>, tal como se mide en un ensayo de CAT de desde aproximadamente 0,001 µg/ml hasta aproximadamente 30 µg/ml de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 0,01 µg/ml hasta aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo, desde aproximadamente 0,05 µg/ml hasta aproximadamente 5 µg/ml. En diversas realizaciones, el NASP de la invención no es sustancialmente anticoagulante a su CE<sub>50</sub>. Un NASP a modo de ejemplo de la invención no es sustancialmente anticoagulante a una concentración de hasta aproximadamente 1,1x, 1,3x, 1,6x, 1,9x, 2,5x, 3x, 3,5x, 4,0x, 5x, 10x, 20x, 30x, 40x o 50x su CE<sub>50</sub>.

En diversas realizaciones, la invención proporciona un NASP, que es un miembro seleccionado de celotriosa, celotetraosa, celopentaosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, xilohexaosa, rafinosa, melecitosa, estaquirosa, α-ciclodextrina, β-ciclodextrina, γ-ciclodextrina, icodextrina, xilano y 6-carboxiicodextrina, que tiene una cantidad de azufre tal como se expuso anteriormente. También se proporcionan NASP, que son sacáridos oxidados (tales como análogos oxidados de los sacáridos mencionados anteriormente), como 6-carboxi-icodextrina.

#### B. Formulaciones farmacéuticas

En diversas realizaciones, el NASP de la invención se incorpora en una formulación farmacéutica. En diversas realizaciones, dependiendo de los efectos deseados y de la potencia de los NASP, pueden formularse uno o más NASP juntos. Por ejemplo, pueden formularse dos o más NASP juntos, tal como tres o más NASP e incluyendo cuatro o más NASP. Cuando se emplean más de un NASP, el porcentaje en masa de cada NASP en la composición puede variar, oscilando entre el 1 % o más de la masa total de la composición, tal como aproximadamente el 2 % o más, tal como aproximadamente el 5 % o más, tal como aproximadamente el 10 % o más, tal como aproximadamente el 25 % o más e incluyendo hasta aproximadamente el 50 % o más de la masa total de la

composición.

En diversas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas de la invención contienen opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, hidratos de carbono, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases y combinaciones de los mismos. Los excipientes líquidos incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina, aceites vegetales, fosfolípidos y tensioactivos. Un hidrato de carbono tal como un azúcar, un azúcar derivatizado tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado y/o un polímero de azúcar puede estar presente como excipiente. Los excipientes de hidratos de carbono específicos incluyen, por ejemplo: monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosil-sorbitol, mioinositol y similares. El excipiente también puede incluir una sal inorgánica o tampón tal como ácido cítrico, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, nitrato de potasio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico y combinaciones de los mismos.

Una formulación farmacéutica de la invención también puede incluir un agente antimicrobiano para prevenir o disuadir el crecimiento microbiano. Los ejemplos no limitativos de agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, timersol y combinaciones de los mismos.

También puede haber un antioxidante presente en la formulación. Se usan antioxidantes para prevenir la oxidación, previniendo de ese modo el deterioro del NASP u otros componentes de la formulación. Los antioxidantes adecuados para su uso en las formulaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monoglicérol, galato de propilo, bisulfito de sodio, formaldehidosulfoxilato de sodio, metabisulfito de sodio y combinaciones de los mismos.

Un tensioactivo puede estar presente como excipiente. Los tensioactivos a modo de ejemplo incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80", y Pluronic tales como F68 y F88 (BASF, Mount Olive, N.J.); ésteres de sorbitano; lípidos, tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferiblemente no en forma de liposoma), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, tales como colesterol; agentes quelantes, tales como EDTA; y zinc y otros cationes adecuados de este tipo.

Puede haber ácidos o bases presentes como excipiente en la formulación. Los ejemplos no limitativos de ácidos que pueden usarse incluyen los ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen, sin limitación, bases seleccionadas del grupo que consiste en hidróxido de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formiato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumarato de potasio y combinaciones de los mismos.

La cantidad del NASP en la formulación variará dependiendo de varios factores, pero será de manera óptima una dosis terapéuticamente eficaz cuando la formulación está en una forma de dosificación unitaria (por ejemplo, una pastilla o cápsula) o recipiente (por ejemplo, un vial o bolsa). Una dosis terapéuticamente eficaz puede determinarse experimentalmente mediante administración repetida de cantidades crecientes de la formulación con el fin de determinar qué cantidad produce un criterio de valoración clínicamente deseado.

La cantidad de cualquier excipiente individual en la formulación variará dependiendo de la naturaleza y función del excipiente y necesidades particulares de la composición. Normalmente, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina mediante experimentación de rutina, es decir, preparando formulaciones que contienen cantidades variables del excipiente (que oscilan entre bajas y altas), examinando la estabilidad y otros parámetros, y después determinando el intervalo en el que se alcanza un rendimiento óptimo sin efectos adversos significativos. Sin embargo, generalmente el/los excipiente(s) está(n) presente(s) en la composición en una cantidad de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 99 % en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 5 % hasta aproximadamente el 98 % en peso, más preferiblemente desde aproximadamente el 15 hasta aproximadamente el 95 % en peso del excipiente, siendo las más preferidas concentraciones de menos del 30 % en peso. Estos excipientes farmacéuticos anteriores junto con otros excipientes se describen en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19.<sup>a</sup> ed., Williams & Williams, (1995), "Physician's Desk Reference", 52.<sup>a</sup> ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998), y Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3.<sup>a</sup> edición, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

En otras realizaciones el NASP se selecciona del grupo que consiste en fragmentos de bajo peso molecular de los compuestos anteriormente indicados. En determinadas realizaciones, la formulación puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, las formulaciones pueden comprender además uno o más NASP diferentes y/o uno o más agentes terapéuticos y/o reactivos.

Las formulaciones abarcan todos los tipos de formulaciones y en particular aquellas que son adecuadas para administración oral o inyección. Las composiciones preferidas adicionales incluyen aquellas para administración oral, ocular o localizada.

5 Las formulaciones farmacéuticas en el presente documento también pueden alojarse en una bolsa de infusión, una jeringa, un dispositivo de implantación o similares, dependiendo del modo de administración y uso previstos. Preferiblemente, las composiciones de NASP descritas en el presente documento están en forma de dosificación unitaria, lo que significa una cantidad de composición de la invención apropiada para una única dosis, en una forma  
10 previamente medida o previamente envasada.

15 Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Los métodos a modo de ejemplo incluyen la etapa de poner en asociación un compuesto o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo ("principio activo") con el portador que constituye uno o más componentes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima el compuesto de la invención con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y después, si es necesario, conformando el producto para dar la formulación deseada. Los expertos en la técnica conocen bien formulaciones orales, y métodos generales para prepararlas se encuentran en cualquier libro de texto de farmacia convencional, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A.R. Gennaro, ed. (1995), cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento como referencia.

25 En diversas realizaciones, la invención proporciona una formulación de dosificación unitaria que incluye uno o más NASP de la invención. En una realización a modo de ejemplo, la formulación de dosificación unitaria incluye una dosificación terapéuticamente eficaz de un NASP, preferiblemente suficiente para inducir una alteración clínicamente detectable y, preferiblemente, clínicamente significativa, en el estado de coagulación del sujeto a quien se le administra la formulación de dosificación unitaria. En realizaciones a modo de ejemplo, la cantidad de un NASP de la invención oscila entre una cantidad suficiente para proporcionar una dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg de a NASP. En diversas realizaciones, la cantidad de un NASP de la invención es suficiente para proporcionar una dosificación de desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, por ejemplo, desde aproximadamente 0,02 mg/kg hasta aproximadamente 2 mg/kg. La cantidad de compuesto en la formulación de dosificación unitaria dependerá de la potencia del NASP específico y la magnitud o efecto procoagulante deseado y la vía de administración.

35 Formulaciones de dosificación unitarias a modo de ejemplo son aquellas que contienen una dosis eficaz, o una fracción apropiada de la misma, del principio activo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una dosis profiláctica o terapéutica varía normalmente con la naturaleza y gravedad del estado que va a tratarse y la vía de administración. La dosificación y quizás la frecuencia de dosificación también variarán según la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual. En general, para los compuestos de la invención, la dosis total en una forma de dosificación unitaria de la invención oscila entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 7000 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 500 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 200 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 100 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 80 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 60 mg. En algunas realizaciones, la cantidad de un NASP de la invención en una  
45 forma de dosificación unitaria oscila entre desde aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 100 mg hasta aproximadamente 500 mg.

50 Las composiciones de NASP en el presente documento pueden estar opcionalmente en combinación con uno o más agentes adicionales, tales como agentes hemostáticos, factores sanguíneos u otros medicamentos usados para tratar a un sujeto para un estado o enfermedad. En diversas realizaciones, la invención proporciona preparaciones de combinación que incluyen uno o más factores sanguíneos tales como factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa, y factor de von Willebrand. Las composiciones de NASP también pueden incluir otros procoagulantes, tales como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, incluyendo, pero sin limitarse a, factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa, precalicreína, y HMWK; o y activador de la ruta de coagulación extrínseca, incluyendo, pero sin limitarse a, factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa. Las composiciones de NASP pueden incluir factores de coagulación que se producen de manera natural, sintéticos o recombinantes o fragmentos, variantes o derivados modificados de manera covalente de los mismos que conservan actividad biológica (es decir, fomentan la coagulación). Alternativamente, tales agentes pueden estar contenidos en una composición independiente del NASP y coadministrarse simultáneamente, antes o después de la composición de NASP de la invención.

60 En la figura 66A-B se muestran combinaciones a modo de ejemplo de determinados NASP (basándose en su polisacárido de base) con agentes adicionales. Cada combinación en las mismas se identifica mediante una letra mayúscula (que hace referencia a un tipo de NASP) seguida por un número (que hace referencia al agente adicional). Por ejemplo, "C5" se refiere a la combinación de un NASP que tiene un polisacárido de base de celopentaosa con factor V.

Los componentes individuales de tales combinaciones pueden administrarse o bien simultáneamente o bien secuencialmente en una forma de dosificación unitaria. La forma de dosificación unitaria puede ser una forma de dosificación unitaria individual o múltiple. En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona una combinación en una forma de dosificación unitaria individual. Un ejemplo de una forma de dosificación unitaria individual es una cápsula en la que tanto el compuesto de la invención como el agente terapéutico adicional están contenidos dentro de la misma cápsula. En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona una combinación en una forma de dosificación unitaria doble. Un ejemplo de una forma de dosificación unitaria doble es una primera cápsula que contiene el compuesto de la invención y una segunda cápsula que contiene el agente terapéutico adicional. Por tanto, el término “unidad individual” o “unidad doble” o “unidad múltiple” se refiere al objeto que ingiere el paciente, no a los componentes internos del objeto. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente dosis apropiadas de agentes terapéuticos conocidos.

En diversas realizaciones, las composiciones de NASP en el presente documento pueden incluir opcionalmente, cuando están destinadas a su administración oral, uno o más potenciadores de la penetración. Los potenciadores de la penetración apropiados y su uso con procoagulantes, tales como los proporcionados por la presente invención, se dan a conocer en la solicitud de patente estadounidense provisional n.º 61/509.514, presentada el 19 de julio de 2011, titulada “Absorption Enhancers as Additives to Improve the Oral Formulation of Non-Anticoagulant Sulfated Polysaccharides” (Potenciadores de la absorción como aditivos para mejorar la formulación oral de polisacáridos sulfatados no anticoagulantes). En algunas realizaciones el potenciador de la penetración es un potenciador de la penetración de la barrera epitelial gastrointestinal. Dependiendo de la fisiología del sujeto, la frase “epitelial gastrointestinal” tal como se usa en el presente documento, se refiere al tejido epitelial del tubo digestivo, tal como el estómago y el tracto intestinal (por ejemplo, duodeno, yeyuno, íleo), y puede incluir adicionalmente otras estructuras que participan en las funciones gastrointestinales del organismo incluyendo la parte inferior del esófago, el recto y el ano. En diversas realizaciones, las composiciones de la invención incluyen una cantidad procoagulante de un NASP en combinación con un potenciador de la penetración de la barrera epitelial gastrointestinal. Las cantidades de potenciador de la penetración útiles en esta invención son generalmente idénticas a las expuestas en la solicitud de patente estadounidense provisional n.º 61/509.514 anteriormente mencionada. De manera similar, en realizaciones a modo de ejemplo, las cantidades apropiadas de un NASP son idénticas a las cantidades expuestas para NASP en la solicitud anteriormente mencionada. En diversas realizaciones, las composiciones de la invención incluyen una combinación de una cantidad procoagulante de un NASP con un potenciador de la penetración de la barrera epitelial gastrointestinal y un factor de coagulación sanguínea. En el presente documento se exponen cantidades a modo de ejemplo de NASP y un segundo agente, por ejemplo, un factor de coagulación sanguínea. Los potenciadores de la penetración de la barrera epitelial gastrointestinal incluyen compuestos que, cuando se administran por vía oral, aumentan la cantidad de NASP que se absorbe por el sistema gastrointestinal. Además, los potenciadores de la penetración gastrointestinal también pueden acelerar el inicio (es decir, reducir la cantidad de tiempo para que comience la absorción) de la absorción de NASP a través del epitelio gastrointestinal así como acelerar la tasa global de transporte del NASP a través del epitelio gastrointestinal del sujeto (es decir, reducir la cantidad de tiempo para que la absorción de NASP por el sistema gastrointestinal sea completa). En realizaciones de la invención, los potenciadores de la penetración de la barrera epitelial gastrointestinal pueden variar, dependiendo del trastorno de coagulación sanguínea particular, la fisiología del sujeto y la potenciación de absorción deseada por el sistema gastrointestinal. En algunas realizaciones, los potenciadores de la penetración de la barrera epitelial gastrointestinal son moduladores de la unión estrecha. El término “unión estrecha” se emplea en su sentido convencional para hacer referencia a las zonas celulares estrechamente asociadas en las que membranas de células adyacentes están unidas entre sí. En realizaciones de la invención, los moduladores de la unión estrecha pueden incluir, pero no se limitan a, enzimas, ácidos biliares, polisacáridos, ácidos grasos y sales de los mismos y cualquier combinación de los mismos.

En una realización a modo de ejemplo de la invención, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende a) un compuesto de la invención; b) un agente terapéutico adicional y c) un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización a modo de ejemplo, la formulación farmacéutica es una forma de dosificación unitaria. En una realización a modo de ejemplo, la formulación farmacéutica es una forma de dosificación unitaria individual. En una realización a modo de ejemplo, la formulación farmacéutica es una forma de dosificación unitaria doble. En una realización a modo de ejemplo, la formulación farmacéutica es una forma de dosificación unitaria doble que comprende una primera forma de dosificación unitaria y una segunda forma de dosificación unitaria, en la que la primera forma de dosificación unitaria incluye a) un compuesto de la invención y b) un primer excipiente farmacéuticamente aceptable; y la segunda forma de dosificación unitaria incluye c) un agente terapéutico adicional y d) un segundo excipiente farmacéuticamente aceptable.

Debe entenderse que además de los componentes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica que se refieren al tipo de formulación en cuestión, por ejemplo los adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades diferenciadas tales como cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina blanda), sellos o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como polvo o gránulos; como disolución o suspensión en

un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta.

Un comprimido puede prepararse mediante compresión o moldeo, opcionalmente usando uno o más componentes auxiliares. Pueden prepararse comprimidos producidos mediante compresión comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, lubricante, agente tensioactivo o dispersante. Pueden prepararse comprimidos moldeados moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse opcionalmente o ranurarse y pueden formularse para proporcionar liberación sostenida, retardada o controlada del principio activo en el mismo. Los expertos en la técnica conocen bien sistemas de administración de fármacos de liberación sostenida orales y parenterales, y métodos generales para lograr la liberación sostenida de fármacos administrados por vía oral o parenteral se encuentran, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, páginas 1660-1675 (1995), cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia.

En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona una formulación de dosificación unitaria de un NASP de la invención en una forma apropiada para su administración mediante inyección (por ejemplo, infusión). La formulación de dosificación unitaria puede diluirse con un diluyente farmacéuticamente aceptable apropiado poco antes de su uso, o puede envasarse como dosificación unitaria diluida para infusión. Las formas adecuadas para dilución antes de la inyección incluyen, por ejemplo, polvos o liofilizados que pueden reconstituirse con un disolvente antes de su uso, así como disoluciones o suspensiones listas para inyección, composiciones insolubles secas para combinación con un vehículo antes de su uso, y emulsiones y concentrados líquidos para dilución antes de la administración. Los ejemplos de diluyentes adecuados para reconstituir composiciones sólidas antes de la inyección incluyen agua para inyección bacteriostática, dextrosa al 5 % en agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada y combinaciones de los mismos. Con respecto a las composiciones farmacéuticas líquidas, se prevén disoluciones y suspensiones. En general, las cantidades comentadas anteriormente como apropiadas para formas de dosificación unitarias orales también son aplicables a la dosificación unitaria inyectable.

En una realización a modo de ejemplo adicional, la invención proporciona la formulación de dosificación unitaria inyectable y un dispositivo para la administración de la formulación de dosificación unitaria mediante inyección (por ejemplo, infusión). En diversas realizaciones, el dispositivo es una bolsa de infusión. En un ejemplo de esta realización, la invención proporciona una bolsa de infusión, o dispositivo similar, en el que se carga previamente la formulación de dosificación unitaria diluida o en una forma apropiada para dilución.

Los polisacáridos sulfatados o sulfonatados con posible actividad NASP (es decir, actividad procoagulante) incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos sulfatados o sulfonatados en los que el polisacárido de base se selecciona de celotriosa, celotetraosa, celopentaosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, xilohexaosa, rafinosa, melecitosa, estaquirosa,  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina, icodextrina y 6-carboxiicodextrina.

#### C. NASP como promotores de la coagulación

En realizaciones a modo de ejemplo, la invención proporciona métodos para regular la hemostasia que, paradójicamente, usan polisacáridos sulfatados o sulfonatados, tales como polisacáridos sulfatados o sulfonatados de tipo heparina para fomentar la coagulación. Los polisacáridos sulfatados o sulfonatados seleccionados descritos en el presente documento carecen esencialmente de actividad anticoagulante, o presentan actividad promotora de coágulos a concentraciones inferiores, de manera preferible significativamente inferiores, a la concentración a la que presentan actividad anticoagulante, y por tanto se denominan "polisacáridos sulfatados o sulfonatados no anticoagulantes".

Los NASP para su uso en los métodos de la invención son polisacáridos sulfatados o sulfonatados que tienen actividad procoagulante. Las propiedades de posibles NASP se determinan usando ensayos de coagulación de TFPI-tiempo de protrombina diluido (dPT) o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). La actividad procoagulante de NASP de la invención puede determinarse mediante ensayo hemostático global tal como generación de trombina o tromboelastografía con baja cantidad de TF. Los polisacáridos sulfatados o sulfonatados no anticoagulantes no presentan más de un tercio, y preferiblemente presentan menos de una décima parte, de la actividad anticoagulante (medida mediante aumento del tiempo de coagulación) de heparina sin fraccionar.

Tal como se muestra en los ejemplos en el presente documento, los NASP de la invención fomentan la coagulación de plasma y sangre completa. En los experimentos divulgados en el presente documento, en ensayos de coagulación se muestra que determinados NASP candidatos demuestran una actividad anticoagulante al menos aproximadamente a tres veces, al menos aproximadamente cinco veces o al menos aproximadamente diez veces menor en comparación con heparina. Estos resultados indican que la administración sistémica de NASP seleccionados representa un enfoque único para regular la hemostasia en trastornos de hemorragia.

Por tanto, en realizaciones a modo de ejemplo, la invención se refiere al uso de NASP para controlar la hemostasia

en sujetos con trastornos de hemorragia, incluyendo trastornos de la coagulación congénitos, trastornos de la coagulación adquiridos y estados hemorrágicos inducidos por traumatismo.

5 En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto que necesita coagulación sanguínea potenciada que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) de la invención al sujeto. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de hemorragia que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASP de la invención al sujeto.

10 En una realización a modo de ejemplo, la composición tiene utilidad en un método para tratar a un sujeto que necesita coagulación sanguínea potenciada. El método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante al sujeto.

15 En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona un método en el que se administra un NASP conjuntamente con uno o más NASP diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos.

20 En determinadas realizaciones, se administra un NASP de la invención a un sujeto para tratar un trastorno de hemorragia seleccionado del grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de coagulación (por ejemplo, factor XI, factor XII, precalicreína y HMWK), una deficiencia de uno o más factores asociados con hemorragia clínicamente significativa (por ejemplo, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia), y factor de von Willebrand), una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno (por ejemplo, afibrinogenemia, hipofibrinogenemia, y disfibrinogenemia), una deficiencia de alfa2-antiplasmina, y hemorragia excesiva tal como provocada por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación, y embarazo.

25 En determinadas realizaciones, se administra un NASP a un sujeto para tratar un trastorno de la coagulación congénito o un trastorno de la coagulación adquirido provocado por una deficiencia de factor sanguíneo. La deficiencia de factor sanguíneo puede estar provocada por deficiencias de uno o más factores (por ejemplo, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor XI, factor XII, factor XIII, y factor de von Willebrand).

30 En determinadas realizaciones, al sujeto que tiene un trastorno de hemorragia se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASP en combinación con otro agente terapéutico tal como se expuso anteriormente.

35 En otra realización, la invención proporciona un método para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto. El método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) de la invención al sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto puede haberse tratado con un anticoagulante incluyendo, pero sin limitarse a, heparina, un derivado de cumarina, tal como warfarina o dicumarol, TFPI tisular, antitrombina III, anticoagulante lúpico, péptido anticoagulante de nematodos (NAPc2), factor VIIa bloqueado en el sitio activo (factor VIIai), inhibidores de factor IXa, inhibidores de factor Xa, incluyendo fondaparinux, idraparinux, DX-9065a, y razaxabán (DPC906), inhibidores de factores Va y VIIIa, incluyendo proteína C activada (APC) y trombomodulina soluble, inhibidores de trombina, incluyendo hirudina, bivalirudina, argatroban, y ximelagatrán. En determinadas realizaciones, el anticoagulante en el sujeto puede ser un anticuerpo que se une a factor de coagulación, incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo que se une a factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor XI, factor XII, factor de von Willebrand, precalicreína, o HMWK.

40 En determinadas realizaciones, se administra un NASP conjuntamente con uno o más NASP diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASP de la invención y uno o más agentes terapéuticos tales como los expuestos anteriormente. Los agentes terapéuticos usados en combinación con un NASP para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto pueden administrarse en las mismas o diferentes composiciones y simultáneamente, antes o después de la administración del NASP.

45 En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico o invasivo en el que es deseable una coagulación sanguínea mejorada. El método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) de la invención al sujeto. En determinadas realizaciones, el NASP puede administrarse conjuntamente con uno o más NASP diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos tales como los expuestos anteriormente. Los agentes terapéuticos usados para tratar a un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico o invasivo pueden administrarse en las mismas o diferentes composiciones y simultáneamente, antes o después de la administración del NASP.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de inhibición de la actividad de TFPI en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASP de la invención al sujeto.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un método de inhibición de la actividad de TFPI en una muestra biológica, comprendiendo el método combinar la muestra biológica (por ejemplo, sangre o plasma) con una cantidad suficiente de un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) de la invención para inhibir la actividad de TFPI.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un método de medición de la aceleración de coagulación mediante un NASP de la invención en una muestra biológica, comprendiendo el método:

a) combinar la muestra biológica con una composición que comprende el NASP,

15 b) medir el tiempo de coagulación de la muestra biológica,

c) comparar el tiempo de coagulación de la muestra biológica con el tiempo de coagulación de una muestra biológica correspondiente no expuesta al NASP, en el que una disminución en el tiempo de coagulación de la muestra biológica expuesta al NASP, si se observa, es indicativa de un NASP que acelera la coagulación.

20 En determinadas realizaciones, se añaden uno o más NASP de la invención diferentes y/o agentes terapéuticos y/o reactivos a la muestra biológica para mediciones de tiempo de coagulación. Por ejemplo, pueden añadirse uno o más factores, incluyendo, pero sin limitarse a, factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, y factor de von Willebrand, factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa; y/o uno o más reactivos, incluyendo, pero sin limitarse a, reactivo de APTT, factor tisular, tromboplastina, fibrina, TFPI, veneno de víbora de Russell, partículas de sílice micronizadas, ácido elálgico, sulfátidos y caolín.

#### D. Administración

30 En una realización a modo de ejemplo, se administra al menos un ciclo de tratamiento terapéuticamente eficaz con un NASP de la invención a un sujeto. "Ciclo de tratamiento terapéuticamente eficaz" se refiere a un ciclo de tratamiento que, cuando se administra, produce una respuesta terapéutica positiva en un individuo para un trastorno de hemorragia. Resulta de particular interés un ciclo de tratamiento con un NASP que mejora la hemostasia. Por ejemplo, uno o más ciclos de tratamiento terapéuticamente eficaces pueden aumentar la coagulación (por ejemplo, la tasa de coagulación) según se determina mediante ensayos hemostáticos globales y de coagulación (por ejemplo, CAT, aPTT, descritos en detalle a continuación) en aproximadamente el 1 % o más, tal como aproximadamente el 5 % o más, tal como aproximadamente el 10 % o más, tal como aproximadamente el 15 % o más, tal como aproximadamente el 20 % o más, tal como aproximadamente el 30 % o más, tal como aproximadamente el 40 % o más, tal como aproximadamente el 50 % o más, tal como aproximadamente el 75 % o más, tal como aproximadamente el 90 % o más, tal como aproximadamente el 95 % o más, incluyendo aumentar la tasa de formación de coágulos de sangre en aproximadamente el 99 % o más. En otros casos, uno o más ciclos de tratamiento terapéuticamente eficaces pueden aumentar la tasa de formación de coágulos de sangre en aproximadamente 1,5 veces o más, tal como aproximadamente 2 veces o más, tal como aproximadamente 5 veces o más, tal como aproximadamente 10 veces o más, tal como aproximadamente 50 veces o más, incluyendo aumentar la tasa de formación de coágulos de sangre en aproximadamente 100 veces o más. En algunas realizaciones, los sujetos tratados mediante métodos de la invención presentan una respuesta terapéutica positiva. Tal como se usa en el presente documento, "respuesta terapéutica positiva" significa que el individuo que se somete a tratamiento según la invención presenta una mejora de uno o más síntomas de un trastorno de hemorragia, incluyendo mejoras tales como tiempos de coagulación sanguínea acortados y hemorragia reducida y/o necesidad reducida de terapia de reposición de factores.

55 En determinadas realizaciones, se administran múltiples dosis terapéuticamente eficaces de composiciones que comprenden uno o más NASP y/u otros agentes terapéuticos, tales como agentes hemostáticos, factores sanguíneos u otros medicamentos. Las composiciones de la presente invención se administran normalmente, aunque no necesariamente, por vía oral, mediante inyección (por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular), mediante infusión o de manera local. La preparación farmacéutica puede estar en forma de una suspensión o disolución líquida inmediatamente antes de la administración, pero también puede adoptar otra forma tal como un jarabe, crema, pomada, comprimido, cápsula, polvo, gel, matriz, supositorio o similar. También se contemplan modos de administración adicionales, tales como por vía pulmonar, rectal, transdérmica, transmucosa, intratecal, pericárdica, intraarterial, intracerebral, intraocular, intraperitoneal y así sucesivamente. Las composiciones farmacéuticas que comprenden NASP y otros agentes pueden administrarse usando las mismas o diferentes vías de administración según cualquier método médicamente aceptable conocido en la técnica.

65 En una realización a modo de ejemplo, se usa una composición de la invención para el suministro localizado de un NASP de la invención, por ejemplo, para el tratamiento de la hemorragia como resultado de una lesión, herida o

5 cirugía. Las preparaciones según la invención también son adecuadas para tratamiento local. Por ejemplo, puede administrarse un NASP mediante inyección en el sitio de hemorragia o en forma de un sólido, líquido o pomada, preferiblemente mediante una cinta adhesiva o un apósito para heridas. También pueden usarse supositorios, cápsulas, en particular cápsulas resistentes a jugos gástricos, gotas o pulverizaciones. La preparación particular y método de administración apropiado se eligen para seleccionar como diana el sitio de hemorragia.

10 En otra realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden NASP y/u otros agentes se administran de manera profiláctica, por ejemplo, antes de una cirugía planificada. Aunque tienen utilidad general, tales usos profilácticos tienen valor particular para sujetos con trastornos de coagulación sanguínea preexistentes conocidos.

15 En otra realización de la invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden NASP y/u otros agentes se encuentran en una formulación de liberación sostenida o una formulación que se administra usando un dispositivo de liberación sostenida. Tales dispositivos se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, parches transdérmicos, y bombas implantables en miniatura que pueden proporcionar administración de fármaco a lo largo del tiempo de una manera continua, en estado estacionario, a una variedad de dosis para lograr un efecto de liberación sostenida con una composición farmacéutica que no es de liberación sostenida.

20 Una dosis profiláctica o terapéutica varía normalmente con la naturaleza y gravedad del estado que va a tratarse y la vía de administración. La dosificación, y quizás la frecuencia de dosificación, también variarán según la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual. En general, la dosis diaria total (en dosis individuales o divididas) oscila entre aproximadamente 1 mg al día y aproximadamente 7000 mg al día, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg al día a aproximadamente 500 mg al día, por ejemplo, desde aproximadamente 10 mg al día hasta aproximadamente 200 mg al día, por ejemplo, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 100 mg, por ejemplo, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 80 mg, por ejemplo, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 60 mg. En algunas realizaciones, la dosis diaria total puede oscilar entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg al día, por ejemplo, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg al día. Se recomienda además que niños, pacientes de más de 65 años de edad, y aquellos con función renal o hepática alterada, reciban inicialmente dosis bajas y que se ajuste la dosificación basándose en respuestas fisiológicas individuales y/o datos farmacocinéticos. En algunos casos puede ser necesario usar dosificaciones fuera de estos intervalos, tal como resultará evidente para los expertos en la técnica. Además, se indica que el profesional sanitario o médico encargado sabe cómo y cuándo interrumpir, ajustar o terminar la terapia en relación con la respuesta de un paciente individual.

35 La invención también proporciona un método para administrar un conjugado que comprende un NASP de la invención tal como se proporciona en el presente documento a un paciente que padece un estado que es sensible al tratamiento con un NASP contenido en el conjugado o la composición. El método comprende administrar, mediante cualquiera de los modos descritos en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz del sistema de administración de fármaco o conjugado, preferiblemente proporcionada como parte de una composición farmacéutica. El método de administración puede usarse para tratar cualquier estado que es sensible al tratamiento con un NASP. Más específicamente, las composiciones en el presente documento son eficaces para tratar trastornos de hemorragia, incluyendo Hem A, Hem B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de coagulación, tales como factor XI, factor XII, precalicreína, y HMWK, una deficiencia de uno o más factores asociados con hemorragia clínicamente significativa, tal como factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia), y factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, incluyendo afibrinogenemia, hipofibrinogenemia, y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa2-antiplasmina, y hemorragia excesiva tal como provocada por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación, y embarazo.

50 En realizaciones a modo de ejemplo, el NASP de la invención se administra por vía oral, intraperitoneal (i.p.), intravenosa (i.v.) o mediante una combinación de los modos de administración.

55 Los expertos habituales en la técnica apreciarán qué estados puede tratar eficazmente un NASP específico. La dosis real que va a administrarse variará dependiendo de la edad, peso y estado general del sujeto así como de la gravedad del estado que esté tratándose, el criterio del profesional sanitario, y el conjugado que esté administrándose. Los expertos en la técnica pueden determinar cantidades terapéuticamente eficaces, y se ajustan a los requisitos particulares de cada caso particular.

60 Una dosis profiláctica o terapéutica varía normalmente con la naturaleza y gravedad del estado que va a tratarse y la vía de administración. La dosificación, y quizás la frecuencia de dosificación, también variarán según la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual. En general, para los compuestos de la invención, la dosis total en una forma de dosificación unitaria de la invención oscila entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 7000 mg, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 200 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 100 mg, por ejemplo, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 80 mg, por ejemplo, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 60 mg. En algunas realizaciones, la cantidad de un NASP de la invención en una forma de

dosificación unitaria oscila entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg.

Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz oscilará entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 200 mg/kg de un NASP al día, más preferiblemente entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg al día, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 0,02 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg al día. En una realización a modo de ejemplo, tales dosis están en el intervalo de desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 50 mg/kg cuatro veces al día (QID), desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 10 mg/kg QID, desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 2 mg/kg QID, desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 0,2 mg/kg QID, desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 50 mg/kg tres veces al día (TID), desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 10 mg/kg TID, desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 2 mg/kg TID, desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 0,2 mg/kg TID, desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 200 mg/kg dos veces al día, desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 100 mg/kg dos veces al día (BID), desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 10 mg/kg BID, desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 2 mg/kg BID, o desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 0,2 mg/kg BID. La cantidad de compuesto administrada depende de la gravedad del estado del sujeto, la potencia del NASP específico y la magnitud o efecto procoagulante deseado y la vía de administración.

Un NASP (por ejemplo, proporcionado como parte de una preparación farmacéutica) de la invención puede administrarse solo o en combinación con otros NASP o agentes terapéuticos, tales como agentes hemostáticos, factores sanguíneos u otros medicamentos usados para tratar un estado o enfermedad particular según una variedad de pautas posológicas dependiendo del criterio del médico, necesidades del paciente y así sucesivamente. La pauta posológica específica la conocen los expertos habituales en la técnica o puede determinarse experimentalmente usando métodos rutinarios. Las pautas posológicas a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, la administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces por semana, dos veces por semana, una vez por semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquier combinación de las mismas. Las composiciones preferidas son aquellas que no requieren dosificación más de una vez al día.

Un NASP de la invención puede administrarse antes de, simultáneamente con o después de otros agentes. Si se proporciona al mismo tiempo que otros agentes, el NASP puede proporcionarse en la misma composición o en una diferente. Por tanto, los NASP y otros agentes pueden presentarse al individuo mediante terapia simultánea. Por "terapia simultánea" quiere decirse la administración a un sujeto de tal manera que se provoca el efecto terapéutico de la combinación de las sustancias en el sujeto que se somete a terapia. Por ejemplo, puede lograrse terapia simultánea administrando una dosis de una composición farmacéutica que comprende un NASP y una dosis de una composición farmacéutica que comprende al menos otro agente, tal como un agente hemostático o factor de coagulación, incluyendo, por ejemplo, uno o más factores sanguíneos tales como factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa, y factor de von Willebrand. Las composiciones de NASP también pueden incluir otros procoagulantes, tales como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, incluyendo, pero sin limitarse a, factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y VIIIa, precalicreína, y HMWK; o y activador de la ruta de coagulación extrínseca, incluyendo, pero sin limitarse a, factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa, que en combinación comprenden una dosis terapéuticamente eficaz, según un régimen de dosificación particular. De manera similar, pueden administrarse uno o más NASP y agentes terapéuticos en al menos una dosis terapéutica. Cuando los NASP y otro(s) agente(s) terapéutico(s) se administran como composiciones farmacéuticas independientes, la administración de las composiciones farmacéuticas independientes puede realizarse simultáneamente o en momentos diferentes (es decir, secuencialmente, en cualquier orden, el mismo día o en días diferentes), siempre que se provoque el efecto terapéutico de la combinación de estas sustancias en el sujeto que se somete a terapia.

#### F. Aplicaciones

En una realización, se usan NASP de la invención en los métodos de la invención para mejorar la hemostasia en el tratamiento de trastornos de hemorragia, particularmente los asociados con deficiencias de factores de coagulación o para revertir los efectos de anticoagulantes en un sujeto. Pueden administrarse NASP a un sujeto para tratar trastornos de hemorragia, incluyendo trastornos de la coagulación congénitos, trastornos de la coagulación adquiridos, y estados hemorrágicos inducidos por traumatismo. Los ejemplos de trastornos de hemorragia que pueden tratarse con NASP incluyen, pero no se limitan a, Hem A, Hem B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de coagulación, tales como factor XI, factor XII, precalicreína, y HMWK, una deficiencia de uno o más factores asociados con hemorragia clínicamente significativa, tal como factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia), y factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, incluyendo afibrinogenemia, hipofibrinogenemia, y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa2-antiplasmina, y hemorragia excesiva tal como la provocada por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación, y embarazo. En determinadas realizaciones, se usan NASP para tratar trastornos de la coagulación congénitos incluyendo hemofilia A, hemofilia B,

y enfermedad de von Willebrand. En otras realizaciones, se usan NASP para tratar trastornos de la coagulación adquiridos, incluyendo deficiencias de factor VIII, factor de von Willebrand, factor IX, factor V, factor XI, factor XII y factor XIII, particularmente trastornos provocados por inhibidores o autoinmunidad contra factores de coagulación sanguínea, o trastornos hemostáticos provocados por una enfermedad o estado que da como resultado la síntesis reducida de factores de coagulación.

Las necesidades del paciente dependerán del trastorno de hemorragia particular que esté tratándose. Por ejemplo, puede administrarse un NASP de la invención para tratar un estado crónico (por ejemplo, una deficiencia de factor de coagulación congénita o adquirida) en múltiples dosis a lo largo de un periodo prolongado. Alternativamente, puede administrarse un NASP para tratar un estado agudo (por ejemplo, hemorragia provocada por cirugía o traumatismo, o episodios de inhibidor de factor/autoinmunitarios en sujetos que reciben terapia de reposición de la coagulación) en dosis individuales o múltiples durante un periodo relativamente corto, por ejemplo de una a dos semanas. Además, la terapia con NASP puede usarse en combinación con otros agentes hemostáticos, factores sanguíneos, y medicamentos tal como se expuso anteriormente. Además, puede necesitarse la transfusión de hemoderivados para reponer la pérdida de sangre en sujetos que experimentan hemorragia excesiva, y en casos de herida, puede ser apropiada una reparación quirúrgica para detener la hemorragia.

La invención también proporciona un método para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto. El método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASP de la invención al sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto puede haberse tratado con un anticoagulante incluyendo, pero sin limitarse a, heparina, un derivado de cumarina, tal como warfarina o dicumarol, TFPI, AT III, anticoagulante lúpico, péptido anticoagulante de nematodos (NAPc2), factor VIIa bloqueado en el sitio activo (factor VIIai), inhibidores de factor IXa, inhibidores de factor Xa, incluyendo fondaparinux, idraparinax, DX-9065a, y razaxabán (DPC906), inhibidores de factores Va y VIIIa, incluyendo proteína C activada (APC) y trombomodulina soluble, inhibidores de trombina, incluyendo hirudina, bivalirudina, argatroban, y ximelagatrán. En determinadas realizaciones, el anticoagulante en el sujeto puede ser un anticuerpo que se une a un factor de coagulación, incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo que se une a factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor XI, factor XII, factor de von Willebrand, precalicreína, o HMWK.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para mejorar la coagulación en un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico o invasivo, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) de la invención al sujeto. En determinadas realizaciones, el NASP puede administrarse solo o administrarse conjuntamente con uno o más NASP diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos tal como se expuso anteriormente al sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico o invasivo. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa, y factor de von Willebrand. El tratamiento puede comprender además administrar un procoagulante, tal como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, incluyendo factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa, y factor VIIIa, precalicreína, y HMWK; o un activador de la ruta de coagulación extrínseca, incluyendo factor tisular, factor VIIa, factor Va, y factor Xa.

Además de los usos expuestos anteriormente, los compuestos de la invención encuentran uso en una variedad de otras modalidades de tratamiento. Por ejemplo, en una realización, los compuestos de la invención tienen utilidad para tratar cistitis intersticial (véase, por ejemplo, *Urology*, (dic. de 2000) 164(6):2119-2125; *Urology*, (junio de 1999) 53(6):1133-1139; *International Congress Series*, (dic. de 2001) 1223:227-237; *Urology*, (ene. de 2008) 179(1):177-185; *European Urology Supplements*, (sep. de 2003) 2(4):14-16; *Urology*, (sep. de 2011) 78(3):S210-S211; *European Urology Supplements*, (oct. de 2011) 10(6):451-459; *Urology*, (abril de 2011) 185(4):e384).

En diversas realizaciones, los compuestos de la invención también encuentran uso como agentes antiinflamatorios, y en el tratamiento y prevención de trastornos neurodegenerativos (véase, por ejemplo, *Food and Chemical Toxicology*, (ago. de 2011) 49(8):1745-1752; *Food and Chemical Toxicology*, (sept. de 2011) 49(9):2090-2095; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, (sept. de 2003) 1651(1-2)).

En una realización a modo de ejemplo, los compuestos de la invención también encuentran uso por su actividad anticancerígena (véase, por ejemplo, *Carbohydrate Polymers*, (4 de ene. de 2012) 87(1, 4):186-194; *Carbohydrate Polymers*, (23 de mayo de 2010) 81(1, 23):41-48; *Carbohydrate Polymers*, (4 de ene. de 2012) 87(1, 4):186-194; *International Journal of Biological Macromolecules*, (1 de oct. de 2011) 49(3, 1):331-336; *Advances in Food and Nutrition Research*, (2011) 64:391-402).

En diversas realizaciones, los compuestos de la invención también encuentran uso como agentes para la prevención de la formación de adhesión (véase, por ejemplo, *Journal of Surgical Research*, (dic. de 2011) 171(2):495-503; *Fertility and Sterility*, (sept. de 2009) 92(3):S58; *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, (nov. - dic. de 2009) 16(6):S120).

En una realización a modo de ejemplo, los compuestos de la invención también tienen actividad antiviral (véase, por

ejemplo, *Phytomedicine*, (nov. de 1999) 6(5):335-340; Antiviral Research, (feb. de 1991) 15(2):139-148; *Phytochemistry*, (feb. de 2010) 71(2-3):235-242; y *Advances in Food and Nutrition Research*, (2011) 64:391-402).

5 En diversas realizaciones, los compuestos de la invención también son inhibidores del sistema del complemento (véase, por ejemplo, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, (julio de 2000) 126(3):209-215).

10 En cada una de estas modalidades de tratamiento diferentes, el tratamiento de un sujeto que necesita tal tratamiento se realiza administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de la invención. En diversas realizaciones, el compuesto se administra a un sujeto para tratar un estado y este sujeto no necesita por lo demás tratamiento con un compuesto de la invención para un estado diferente.

15 En la puesta en práctica de métodos de la invención, los protocolos para potenciar la coagulación sanguínea en un sujeto pueden variar, tal como por ejemplo según la edad, peso, gravedad del trastorno de coagulación sanguínea, la salud general del sujeto, así como la composición particular y concentración del NASP de la invención que está administrándose. En realizaciones de la invención, la concentración de NASP lograda en un sujeto tras la administración oral y absorción por el sistema gastrointestinal puede variar, en algunos casos, oscilando entre aproximadamente 0,01 nM y aproximadamente 500 nM. Los NASP a modo de ejemplo de interés son procoagulantes a su concentración óptima. Por "concentración óptima" quiere decirse la concentración a la que los NASP muestran la mayor cantidad de actividad procoagulante. Dado que los NASP a modo de ejemplo también demostraron actividad anticoagulante a concentraciones mucho mayores que la concentración óptima, los NASP preferidos de la invención muestran comportamiento no anticoagulante en el intervalo de su concentración óptima. Como tales, dependiendo de la potencia del NASP así como del efecto deseado, la concentración óptima de NASP a modo de ejemplo proporcionados por los métodos de la invención puede oscilar entre 0,01 µg/kg y 500 µg/kg, tal como de 0,1 µg/kg a 250 µg/kg, tal como de 0,1 µg/kg a 100 µg/kg, tal como de 0,1 µg/kg a 75 µg/kg, tal como de 0,1 µg/kg a 50 µg/kg, tal como de 0,1 µg/kg a 25 µg/kg, tal como de 0,1 µg/kg a 10 µg/kg, e incluyendo de 0,1 µg/kg a 1 µg/kg. Las concentraciones óptimas y el nivel de actividad según se determinan mediante ensayo de trombografía automatizada calibrada (CAT) de NASP de interés se describen con más detalle en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 11/140.504, presentada el 27 de mayo de 2005, ahora patente estadounidense n.º 7.767.654, y la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 13/006.396, presentada el 13 de enero de 2011, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. Asimismo, la presente solicitud divulga ejemplos de ensayos de CAT con utilidad en la determinación de la concentración óptima de un NASP de la invención.

35 En la figura 67 se muestran dosificaciones a modo de ejemplo del NASP respectivo en cada una de las combinaciones (tipo de NASP (basándose en el polisacárido de base) con agente adicional) identificadas en las figuras 66A-B. La letra en minúsculas añadida al identificador de la combinación de las figuras 66A-B se refiere a la dosificación del NASP respectivo en esa combinación. Por ejemplo, "C5a" se refiere a una combinación de un NASP que tiene un polisacárido de base de celopentaosa con factor V, en el que la dosis del NASP es de desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1 mg/kg. En la figura 68 se proporcionan dosificaciones a modo de ejemplo para el agente adicional.

45 En las diversas realizaciones de la invención, la dosificación (por ejemplo, dosificación oral) de composiciones que contienen NASP de la invención puede variar, en realizaciones a modo de ejemplo, oscilando entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 500 mg/kg al día, tal como entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 400 mg/kg al día, tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg al día, tal como de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg al día, tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg al día, tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg al día, incluyendo de aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg al día. En otras realizaciones, la dosificación (por ejemplo, dosificación oral) puede oscilar entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg cuatro veces al día (QID), tal como de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg QID, tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg QID, tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg QID, tal como de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2 mg/kg QID. En otras realizaciones, la dosificación (por ejemplo, dosificación oral) puede oscilar entre 0,01 mg/kg y 50 mg/kg tres veces al día (TID), tal como de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg TID, tal como de 0,01 mg/kg a 2 mg/kg TID, e incluyendo tal como 0,01 mg/kg a 0,2 mg/kg TID. En aún otras realizaciones, la dosificación (por ejemplo, dosificación oral) puede oscilar entre 0,01 mg/kg y 100 mg/kg dos veces al día (BID), tal como de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg BID, tal como de 0,01 mg/kg a 2 mg/kg BID, incluyendo de 0,01 mg/kg a 0,2 mg/kg BID. La cantidad de compuesto administrado dependerá de la potencia y concentración del NASP específico, la magnitud o efecto procoagulante deseado, y la capacidad de absorción y/o biodisponibilidad inherente del NASP. Cada uno de estos factores se determina fácilmente por un experto en la técnica usando los métodos expuestos en el presente documento o métodos reconocidos en la técnica.

65 En diversas realizaciones de los métodos en el presente documento, el NASP de la invención se administra por vía oral en combinación con uno o más potenciadores de la penetración. En la solicitud de patente estadounidense provisional n.º 61/509.514, citada anteriormente, se divulgan potenciadores de la penetración apropiados y su uso

con procoagulantes, tales como los proporcionados por la presente invención. En algunas realizaciones el potenciador de la penetración es un potenciador de la penetración de la barrera epitelial gastrointestinal. En diversas realizaciones, la invención proporciona métodos para potenciar la coagulación sanguínea administrando por vía oral una composición que incluye una cantidad procoagulante de un NASP en combinación con un potenciador de la penetración epitelial gastrointestinal a un sujeto. En diversas realizaciones, la invención proporciona métodos para potenciar la coagulación sanguínea administrando por vía oral una composición que incluye una cantidad procoagulante de un NASP en combinación con un potenciador de la penetración epitelial gastrointestinal y un factor de coagulación sanguínea a un sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* de inhibición de la actividad de TFPI con una cantidad suficiente de un NASP de la invención para inhibir la actividad de TFPI. En determinadas realizaciones, la actividad de TFPI se inhibe en un sujeto mediante un método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASP al sujeto. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un método de inhibición de la actividad de TFPI en una muestra biológica, comprendiendo el método combinar la muestra biológica (por ejemplo, sangre o plasma) con una cantidad suficiente de un NASP para inhibir la actividad de TFPI.

Los NASP a modo de ejemplo de la invención para su uso en los métodos de la invención son polisacáridos sulfatados o sulfonatados que tienen actividad procoagulante. Las propiedades de posibles NASP se determinan usando ensayos de coagulación de TFPI-dPT o aPTT. Los polisacáridos sulfatados o sulfonatados no anticoagulantes no muestran más de un tercio, y preferiblemente muestran menos de una décima parte, de la actividad anticoagulante (medida mediante aumento del tiempo de coagulación) de heparina sin fraccionar.

A continuación se presentan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera.

### Ejemplos

#### EJEMPLO 1

Para la sulfatación, se usaron diferentes reactivos de sulfatación:  $\text{SO}_3\text{-NMe}_3$ ,  $\text{SO}_3\text{-NEt}_3$  y  $\text{SO}_3\text{-Py}$ . Se intentó cada uno de estos reactivos para maltotriosa,  $\alpha$ -ciclodextrina y  $\beta$ -ciclodextrina en condiciones idénticas para determinar el reactivo de sulfatación más eficaz. Las características de reacción generales fueron muy similares para cada reactivo con tan solo diferencias minoritarias. Se eligió  $\text{SO}_3\text{-NEt}_3$  en DMF para su uso en los experimentos adicionales. Con el fin de obtener un grado de sulfatación diferente para cada oligosacárido se llevaron a cabo los experimentos a temperatura ambiente y a 70 °C.

Los procedimientos de la bibliografía usan habitualmente columnas de Sephadex para la separación de los componentes de azúcar a partir del reactivo de sulfatación y otra columna de Sephadex o diálisis para intercambio catiónico. La cromatografía con Sephadex para los oligosacáridos dados no fue satisfactoria, de modo que se estableció un protocolo diferente. El nuevo protocolo incluye la precipitación de los componentes de sacárido y la separación mediante lavado del reactivo de sulfatación con cloroformo. Con el fin de realizar un intercambio de trietilamonio frente a iones sodio volvió a disolverse la mezcla en agua y se trató con la forma  $\text{Na}^+$  de una resina de intercambio catiónico (Amberlyst 15).

#### Análisis

El plan de proyecto inicial preveía la caracterización de las mezclas de polisacáridos resultantes usando RMN y análisis elemental. Dado que ambos de estos métodos tienen limitaciones para los sacáridos a modo de ejemplo de la invención, se estableció un método diferente. Usando un método cromatográfico denominado HILIC (cromatografía de líquidos de interacción hidrófila) se obtuvieron resultados significativos, incluyendo la identificación de diferentes productos con un grado de sulfatación variable y cuantificación de las cantidades relativas de los mismos.

#### 1) Resultados

A temperatura ambiente, se produjo celotriosa (1) como el 70 % de celotriosa no sulfatada, el 30 % de mono (4 isómeros); a 70 °C, se produjo celotriosa (2) como el 30 % de celotriosa no sulfatada, el 70 % de mono (varios isómeros).

A temperatura ambiente, se produjo celotetraosa (3) como el 80 % de celotetraosa no sulfatada, el 20 % de mono (2 isómeros); a 70 °C se produjo celotetraosa (4) como el 40 % de celotetraosa no sulfatada, el 30 % de mono (varios isómeros), el 30 % de producto de descomposición ( $M = 693$ ), trazas del producto de descomposición no sulfatado.

A temperatura ambiente, se produjo celopentaosa (5) como el 90 % de celotetraosa no sulfatada, el 10 % de mono

(2 isómeros); a 70 °C se produjo celopentaosa (6) como el 80 % de celopentaosa no sulfatada, el 10 % de mono (varios isómeros), el 10 % de producto de descomposición (M = 855).

5 A temperatura ambiente, se produjo maltotriosa (7) como el 50 % de mono, el 25 % de bis (2 isómeros), el 25 % de tris (4 isómeros); a 70 °C, se produjo maltotriosa (8) como el 60 % de mono (varios isómeros), el 40 % de producto de descomposición (M = 611, la fragmentación muestra sulfatación),

10 A temperatura ambiente, se produjo maltotetraosa (9) como el 70 % de maltotetraosa no sulfatada, el 30 % de mono (varios isómeros); a 70 °C, se produjo maltotetraosa (10) como el 50 % de maltotetraosa no sulfatada, el 50 % de mono (2 isómeros).

15 A temperatura ambiente, se produjo maltopentaosa (11) como el 60 % de maltopentaosa no sulfatada, el 40 % de mono (2 isómeros); a 70 °C, se produjo maltopentaosa (12) como el 50 % de maltopentaosa no sulfatada, el 30 % de mono (3 isómeros), el 20 % de producto de descomposición (M = 855).

A temperatura ambiente, se produjo rafinosa (13) como el 70 % de rafinosa no sulfatada, el 30 % de mono (varios isómeros); a 70 °C, se produjo rafinosa (14) como el 20 % de rafinosa no sulfatada, el 30 % de mono (4 isómeros), trazas de bis, el 50 % de producto de descomposición (M = 171).

20 A temperatura ambiente, se produjo melecitosa (15) como el 40 % de melecitosa no sulfatada, el 50 % de mono (4 isómeros), el 10 % de bis (2 isómeros); a 70 °C, se produjo melecitosa (16) como el 25 % de melecitosa no sulfatada, el 50 % de mono (4 isómeros), el 25 % de bis (2 isómeros), trazas de tris.

25 A temperatura ambiente, se produjo  $\alpha$ -ciclodextrina (17) como el 45 % de  $\alpha$ -ciclodextrina no sulfatada, el 50 % de mono, el 5 % de bis (2 isómeros), trazas de tris; a 70 °C se produjo  $\alpha$ -ciclodextrina (18) como el 50 % de  $\alpha$ -ciclodextrina no sulfatada, el 50 % de mono.

30 A temperatura ambiente, se produjo  $\beta$ -ciclodextrina (19) como el 70 % de  $\beta$ -ciclodextrina no sulfatada, el 30 % de mono, trazas de bis (2 isómeros); a 70 °C se produjo  $\beta$ -ciclodextrina (20) como el 60 % de  $\beta$ -CD no sulfatada, el 40 % de mono.

Se produjo estaquiosa (20) como aproximadamente el 73 % de forma sulfatada, con aproximadamente 10 sulfatos y el 18,4 % de azufre.

35 Se produjo xilohexaosa (21) como aproximadamente el 59 % de polisacárido sulfatado, con aproximadamente 8 sulfatos y el 13,9 % de azufre.

$\gamma$ -Ciclodextrina (22) [el 13-19 % de azufre].

## 40 EJEMPLO 2

### Ensayo de generación de trombina

45 Se sometió a ensayo la actividad procoagulante de los polisacáridos sulfatados mediante el ensayo de generación de trombina (TGA). Se midió por duplicado la influencia de cada polisacárido sulfatado sobre la generación de trombina mediante CAT en un lector Fluoroskan Ascent® (Thermo Labsystems, Helsinki, Finlandia; filtros de 390 nm de excitación y 460 nm de emisión) tras la escisión lenta del sustrato fluorogénico Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Hemker HC, *Pathophysiol Haemost Thromb* (2003) 33(4):15). A cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos (Immulon 2HB, fondo en U transparente; Thermo Electron) se le añadieron 80  $\mu$ l de reserva de plasma normal humano tratado con anticuerpo de cabra anti-FVIII previamente calentado (37 °C). Para desencadenar la generación de trombina mediante factor tisular, se añadieron 10  $\mu$ l de reactivo PPP que contenía una determinada cantidad de factor tisular humano recombinante (rTF) y vesículas de fosfolípidos compuestas por fosfatidilserina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (concentración final de 4  $\mu$ M) (Thrombinoscope BV, Maastricht, Países bajos). Para estudiar la actividad procoagulante de polímeros sulfatados se usó una concentración de TF final de 1 pM para proporcionar sensibilidad a FVIII y TFPI del sistema de prueba. Justo antes de poner la placa en el lector previamente calentado (37 °C), se añadieron 10  $\mu$ l de muestra de prueba o de referencia o compuesto de calibración. Se inició la generación de trombina dispensando 20  $\mu$ l de reactivo FluCa (Thrombinoscope BV, Maastricht, Países bajos) que contenía sustrato fluorogénico y  $\text{CaCl}_2$  tamponado con Hepes (100 mM) en cada pocillo y se registró la intensidad de fluorescencia a 37 °C.

60 Se calcularon los parámetros de las curvas de generación de trombina resultantes usando el software Thrombinoscope™ (Thrombinoscope BV, Maastricht, Países bajos) y compuesto de calibración de trombina para corregir efectos de consumo de sustrato y filtro internos (Hemker HC, *Pathophysiol Haemost Thromb* (2003) 33(4):15). Con el compuesto de calibración de trombina como referencia, se calculó la concentración molar de trombina en los pocillos de prueba mediante el software. Se representaron gráficamente las cantidades de trombina

65

en los picos y los tiempos de pico de cada curva de generación de trombina (trombina pico, nM) frente a las concentraciones de polisacárido sulfatado dando como resultado el perfil procoagulante de estos compuestos. Los resultados del ensayo de generación de trombina se ilustran en las figuras adjuntas al presente documento. A partir de estos gráficos, se determinan las concentraciones eficaces medias ( $CE_{50}$ ) usando un ajuste de curva sigmoidea. La  $CE_{50}$  representa la concentración a la que se alcanza la mitad del pico de trombina máximo.

Los resultados para celotriosa se muestran en la figura 3A, la figura 3B y la figura 21. Los resultados para celotetraosa se muestran en la figura 4A, la figura 4B y la figura 22. Los resultados para celopentaosa se muestran en la figura 5A, la figura 5B y la figura 23. Los resultados para maltotriosa se muestran en la figura 6A, la figura 6B, la figura 18. Los resultados para maltotetraosa se muestran en la figura 7A, la figura 7B y la figura 19. Los resultados para maltopentaosa se muestran en la figura 8A, la figura 8B, la figura 20, la figura 25 - la figura 27, la figura 30, la figura 32 y la figura 34. Los resultados para rafinosa se muestran en la figura 9A, la figura 9B y la figura 17. Los resultados para melecitosa se muestran en la figura 10A, la figura 10B, la figura 15 y la figura 29. Los resultados para  $\alpha$ -ciclodextrina se muestran en la figura 11A, la figura 11B, la figura 13, la figura 28 y la figura 29. Los resultados para  $\beta$ -ciclodextrina se muestran en la figura 12A, la figura 12B, la figura 14A, la figura 14B, la figura 28, la figura 29, la figura 31, la figura 33 y la figura 35. Los resultados para xilohexaosa se muestran en la figura 24. Los resultados para estaquiosa se muestran en la figura 16. Los resultados para xilano se muestran en la figura 40, la figura 41, la figura 57, la figura 58, la figura 59, la figura 61 y la figura 62. Los resultados para icodextrina y 6-carboxiicodextrina se muestran en la figura 42 - la figura 47, la figura 50, la figura 60, la figura 61 y la figura 63.

Los polisacáridos sulfatados son procoagulantes en un amplio intervalo de concentración que abarca al menos dos órdenes de magnitud comenzando a aproximadamente  $0,01 \mu\text{g/ml}$  (por ejemplo, xilano sulfatado, 6-carboxiicodextrina sulfatada), mientras que un polímero no sulfatado es esencialmente inactivo en las condiciones usadas en el presente documento, proporcionando evidencias de la importancia de grupos sulfato con cara negativa. A concentraciones de actividad procoagulante óptima (de  $1$  a  $30 \mu\text{g/ml}$ ) los polisacáridos sulfatados superaron la generación de trombina de una reserva de plasma normal humano. A concentraciones superiores a  $100 \mu\text{g/ml}$  los polisacáridos sulfatados prolongaron el tiempo de tromboplastina parcial activada (figura 29) lo cual es indicativo de su actividad anticoagulante.

### EJEMPLO 3

#### TFPI-dPT y aPTT

##### *Ensayo de tiempo de protrombina diluido con TFPI*

Se usó un ensayo de tiempo de protrombina diluido con TFPI añadido (TFPI-dPT) para evaluar el efecto de inhibición de TFPI de los diferentes NASP. Se incubó previamente plasma humano normal combinado (George King Biomedical, Overland Park, KS) con TFPI de longitud completa  $0,5 \mu\text{g/ml}$  (aa 1-276, producido de manera constitutiva mediante SKHep1) y el NASP respectivo ( $0$ - $5 \mu\text{g/ml}$ ) durante  $15 \text{ min}$  a TA. Se añadió reactivo TF TriniClot PT Excel S (Trinity Biotech, Wicklow, Irlanda), diluido en solución salina tamponada con Hepes  $1:200$  con BSA al  $0,5 \%$ , a las muestras de plasma en un analizador de hemostasia ACL Pro Elite (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA). Se inició la coagulación con  $\text{CaCl}_2$   $25 \text{ mM}$ . La razón en volumen de plasma:TF:CaCl<sub>2</sub> era de  $1:1:1$ .

Para el análisis de los datos, se representa gráficamente TFPI-dPT frente al logaritmo de la concentración. Se determinan los valores de concentraciones eficaces medias ( $CE_{50}$ ) usando un ajuste de curva sigmoidea.

##### *Ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT)*

Se realizó el ensayo de aPTT para estudiar actividades anticoagulantes de NASP. En resumen, se mezclaron  $50 \mu\text{l}$  de reserva de plasma humano normal descongelada (George King Biomedical, Overland Park, KS) con  $5 \mu\text{l}$  de muestra de NASP (concentración en plasma final de  $0$ - $60 \mu\text{g/ml}$ ). Se diluyeron los NASP en tampón de imidazol (imidazol  $3,4 \text{ g/l}$ ; NaCl  $5,85 \text{ g/l}$ , pH  $7,4$ ) que contenía albúmina al  $1 \%$  (Baxter, Austria). Tras la adición de  $50 \mu\text{l}$  de reactivo aPTT (STA APTT, Roche) se incubaron las muestras durante  $4 \text{ min}$  a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se inició la coagulación mediante  $50 \mu\text{l}$  de disolución de  $\text{CaCl}_2$   $25 \text{ mM}$  (Baxter, Austria) y se registró durante hasta  $5 \text{ min}$ . Todas las etapas de pipeteado y mediciones del tiempo de coagulación se llevaron a cabo con un instrumento ACL Pro Elite (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA). Se hicieron pasar las muestras por duplicado.

Para el análisis de datos, se representa gráficamente el tiempo de coagulación frente a la concentración de NASP. Se determinan concentraciones a las que el tiempo de coagulación está aumentado un  $50 \%$  con respecto al control de plasma normal usando un ajuste de curva lineal.

#### Resultados

La figura 34 es un gráfico que muestra TFPI-dPT frente al logaritmo de la concentración de maltopentaosa sulfatada (el  $15 \%$  de S) en plasma humano normal, que muestra que la maltopentaosa sulfatada revierte el efecto de FL-TFPI

rec. en plasma. La CE<sub>50</sub> de este compuesto es de 0,15 µg/ml.

La figura 35 es un gráfico que muestra TFPI-dPT frente al logaritmo de la concentración de β-ciclodextrina sulfatada (2,9 kDa, el 18,9 % de S) en plasma humano normal, que muestra que la β-ciclodextrina sulfatada revierte el efecto de FL-TFPI rec. en plasma. La CE<sub>50</sub> de este compuesto es de 0,08 µg/ml.

En la tabla 1 y la tabla 2 se exponen valores de CE<sub>50</sub> de compuestos representativos de la invención. La tabla 2 proporciona además datos para el tiempo de coagulación al 50 % deducidos a partir de ensayos de aPTT para estos compuestos (figura 29). Los valores de CE<sub>50</sub> se determinaron mediante ensayo CAT.

Tabla 1

Sustancia sulfatada	CE <sub>50</sub> , µg/ml
Maltotriosa	20,6
Maltotetraosa	5,0
Maltopentaosa	2,1
Celotriosa	30,9
Celotetraosa	4,8
Celopentaosa	1,9
α-Ciclodextrina (Sigma)	7,4
β-Ciclodextrina (Sigma)	1,8
γ-Ciclodextrina (Baxter)	0,8

Tabla 2

Sustancia	Aumento del 50 % del tiempo de coagulación, µg/ml	CE <sub>50</sub> , µg/ml	Razón aPTT/CAT
Fucoidano (Control)	7,0	0,3	23,3
Maltopentaosa (Baxter)	3,3	2,4	1,4
β-Ciclodextrina (Sigma)	3,6	0,7	5,1

Se adquirieron NASP a modo de ejemplo de la invención a partir de las fuentes mostradas en la tabla 3.

Tabla 3

Compuesto sulfatado	Proveedor
Celotriosa Celotetraosa Celopentaosa Maltotriosa Maltotetraosa Maltopentaosa Rafinosa Melecitosa alfa-Ciclodextrina beta-Ciclodextrina Xilohexaosa	AnalytiCon, Alemania
gamma-Ciclodextrina Maltopentaosa 6-Carboxi-icodextrinas Icodextrinas Xilanos	Baxter RL
alfa-Ciclodextrina beta-Ciclodextrina	Sigma-Aldrich

α y β-Ciclodextrina, estaquiosa, maltotetraosa, maltopentaosa y celopentaosa sulfatadas muestran actividad procoagulante sustancial. Maltopentaosa sulfatada, β-ciclodextrina sulfatada y otros polisacáridos sulfatados pasan a ser anticoagulantes dentro de su intervalo procoagulante. Su CE<sub>50</sub> es similar a la de maltopentaosa sulfatada (2,4 µg/ml) y β-ciclodextrina sulfatada (0,7 µg/ml) de Sigma. La actividad procoagulante aumenta con el peso molecular del compuesto para ciclodextrinas, maltotriosa/-tetraosa/-pentaosa y celotriosa/-tetraosa/-pentaosa.

#### EJEMPLO 4

Método de tromboelastometría de rotación (ROTEM)

Se estudiaron NASP (0,4- 11 µg/ml) en sangre completa humana tratada con citrato fresca mediante tromboelastometría de rotación (ROTEM), un ensayo que permite la evaluación viscoelástica continua de firmeza y formación de coágulos de sangre completa. Se incubó sangre con plasma anti-FVIII humano producido en cabras (Baxter Bioscience, Austria) a 50 UB/ml para simular condiciones hemófilas. Se desencadenó la coagulación con factor tisular (TF) 0,044 pM (reactivo PRP, Thrombinoscope BV) en presencia de CTI 40 µg/ml (Haematologic Technologies Inc., Essex Junction, VT, EE. UU.). Después volvieron a calcificarse 300 µl de la sangre sometida a inhibición de FVIII previamente calentada (37 °C) con 20 µl de una disolución de CaCl<sub>2</sub> 0,2 M. Se monitorizó la formación de coágulos usando un instrumento ROTEM (Pentapharm Munich, Alemania) a 37 °C. La concentración de ensayo final de rTF era de 44 fM. El registro de ROTEM se inició inmediatamente y se midió durante al menos 120 min. Cada muestra de sangre se analizó en dos medidas independientes.

Se registraron los parámetros tromboelastográficos de tiempo de coagulación (CT), tiempo de formación de coágulo (CFT) y firmeza de coágulo máxima (MCF) según las instrucciones del fabricante. Se representa gráficamente la primera derivada de los datos de tromboelastograma para obtener un gráfico de la velocidad (mm/s) frente al tiempo (s). A partir de este gráfico, también se determinan la velocidad máxima (Vmax) y el tiempo al que se alcanza la velocidad máxima (Vmax-t).

#### Resultados

La figura 30 es un tromboelastograma rotacional (ROTEM) de maltopentosa sulfatada (el 15 % de S) en sangre completa humana (TF 0,044 pM), que muestra que la maltopentosa sulfatada restaura la coagulación a lo normal en sangre sometida a inhibición de FVIII.

La figura 31 es un ROTEM de β-ciclodextrina sulfatada (el 18,9 % de S) en sangre completa humana (TF 0,044 pM), que muestra que β-ciclodextrina sulfatada restaura la coagulación a lo normal en sangre sometida a inhibición de FVIII.

Maltopentosa sulfatada y β-ciclodextrina sulfatada muestran una buena actividad procoagulante y también restauran los parámetros de coagulación de sangre completa sometida a inhibición de FVIII. No se observa activación de la ruta de contacto mediante maltopentosa sulfatada ni β-ciclodextrina sulfatada ni la mayoría de los demás polisacáridos. Los polisacáridos sulfatados revierten el efecto anticoagulante de TFPI de longitud completa exógeno en plasma humano normal.

#### EJEMPLO 5

Preparación de xilano e icodextrina sulfatados y despolimerizados (figura 39)

##### 5.1a Síntesis de xilano sulfatado

Se sulfató xilano tal como se describe en la figura 65. Tras la sulfatación, se trató el polímero con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno durante diversos periodos de tiempo en un intento por proporcionar polímeros con un intervalo de peso molecular objetivo de 1000 a 4000 Da. Tras la etapa de despolimerización, se dializaron las disoluciones a través de una membrana con un MWCO de 3000. Se recogieron los materiales retenidos y los filtrados y se realizó RMN. El análisis mediante RMN reveló que solo los materiales retenidos de 3 K contenían material que parecía hidratos de carbono. A continuación, se dializaron los materiales retenidos de 3 K a través de una membrana con un MWCO de 10 K. Esta vez, solo se conservaron los filtrados y se caracterizaron (RMN y SEC-MALLS). La RMN de los filtrados concuerda con xilano sulfatado. Los pesos moleculares de las muestras variaron entre 11 y 3 kDa. Los pesos moleculares concordaban con las expectativas, ya que los pesos moleculares disminuyeron a medida que aumentó el tiempo de despolimerización.

Se preparó xilano sulfatado según el documento WO 2009/087581. Se añadió ácido clorosulfónico (50 ml) a un matraz de fondo redondo al que se añadió beta-picolina (250 ml) gota a gota mientras se agitaba rápidamente con calentamiento a 40 °C. Una vez que se añadió completamente la picolina, se añadieron 25 g de xilano a la mezcla mientras se agitaba vigorosamente y se calentaba hasta 85 °C. Se mantuvo la reacción a 85 °C durante 3,5 horas, tras lo cual se enfrió la reacción hasta TA y después se añadieron 125 ml de agua. Después se vertió la mezcla en hidróxido de sodio metanólico (500 ml de MeOH + 34 g de NaOH + 58 ml de agua), durante lo cual se formó un precipitado. Se agitó la mezcla durante aproximadamente 20 min y después se recogió el sólido mediante filtración. Se lavó la torta de filtro varias veces con metanol y después se secó finalmente sobre el embudo de filtración. Se transfirió el sólido semiseco a una bandeja de secado tarada y se secó durante la noche a alto vacío a 45 °C para proporcionar 111,2 g. Se disolvió el sólido en 200 ml de agua (pH medido de 4,72) y se ajustó el pH a 12,3 con NaOH 5 M, y después se añadió 1 l de metanol mientras se agitaba vigorosamente. Se ajustó el pH de la mezcla a 6,85 con ácido acético glacial y después se agitó durante 10 min adicionales. Se recogió el sólido que se formó mediante filtración a vacío y se transfirió a una placa de secado tarada y se secó durante la noche a alto vacío a 50 °C para proporcionar 103 g de xilano sulfatado. Se purificó adicionalmente este polvo seco mediante ultrafiltración

tangencial (PALL, Centramate, membrana Omega, 1000 de MWCO). Se liofilizó la disolución dializada para proporcionar un polvo que pesaba 39,9 g.

#### Despolimerización

5 Se disolvieron 5 g de xilano sulfatado en 15 ml de agua y se calentaron hasta 90 °C. En paralelo, se mezclaron entre sí 150 µl de ácido sulfúrico concentrado y 300 µl de peróxido de hidrógeno al 30 % en un vial pequeño, se calentaron hasta 80 °C, y después se añadieron al xilano sulfatado calentado para comenzar el proceso de despolimerización. Se extrajeron alícuotas (3 ml) de la mezcla de reacción a los 15, 30, 60 y 75 min. Se añadieron las alícuotas extraídas a 1080 µl de NaOH 1 M y se enfriaron en un baño con hielo. Se ajustó el pH de la alícuota a 7 con adiciones gota a gota de NaOH 1 M o HCl 1 M. Después se transfirieron las alícuotas a unidades de ultrafiltración independientes (punto de corte de peso molecular de 3000, PALL Corp., Macrosep, membrana OMEGA) y se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 min a 5 °C. Tras la centrifugación, se recogieron los filtrados y se añadió agua desionizada a los materiales retenidos hasta la línea de volumen máximo. Después volvieron a centrifugarse las muestras tal como se realizó anteriormente. Se repitió este ciclo 9 veces más. Después se liofilizaron los filtrados combinados y los materiales retenidos correspondientes. A continuación en la tabla 1 se presentan las muestras resultantes. Se realizó una RMN con cada una de las muestras presentadas en la tabla 1. A continuación se describen los resultados. A continuación, se disolvieron las muestras de material retenido de 3 K en agua y se cargaron en dispositivos de ultrafiltración de 10 K (Amicon Ultra, cat. UFC801008) y se sometieron a ultrafiltración tal como se describió anteriormente con los dispositivos de 3 K. Después se liofilizaron los filtrados recogidos. En la tabla 2 se describen las muestras resultantes. Los materiales retenidos no se liofilizaron.

#### 5.1b Resultados

25 Tabla 1. Xilano sulfatado despolimerizado, sometido a ultrafiltración de 10 K.

ID de muestra	Descripción	Peso (g)
A	15 min de despolimerización (filtrado)	0,031
E	15 min de despolimerización (material retenido)	N/A
B	30 min de despolimerización (filtrado)	0,121
F	30 min de despolimerización (material retenido)	N/A
C	60 min de despolimerización (filtrado)	0,299
G	60 min de despolimerización (material retenido)	N/A
D	75 min de despolimerización (filtrado)	0,276
H	75 min de despolimerización (material retenido)	N/A

#### Analítica

30 <sup>1</sup>H-RMN

#### Preparación de muestra:

35 Se disolvieron aproximadamente 100 mg de cada muestra en aproximadamente 1 ml de óxido de deuterio. Se obtuvo la RMN a temperatura ambiente usando un instrumento de 400 mHz.

Se realizó la RMN del protón con los materiales retenidos y filtrados de 3 K. La <sup>1</sup>H-RMN de los materiales retenidos de 3 K concordaba con xilano sulfatado. Se observan cambios en el espectro a medida que aumenta el tiempo de despolimerización. La <sup>1</sup>H-RMN de los filtrados de 3 K (no mostrada) no concordó con xilano sulfatado, indicando que las condiciones de despolimerización no eran suficientes para producir xilanos sulfatados que pudieran pasar una membrana con un MWCO de 3 K. Los espectros de RMN concordaban con espectros presentados en la bibliografía (Chaidedgumjorn *et al.*, *Carbohydrate Res.*, 337: 925-933 (2002)).

#### SEC-MALLS

45 Basándose en los resultados de RMN, solo se realizó SEC-MALLS con los filtrados de 10 K (D). Los resultados se presentan a continuación en la tabla 2. Además, se analizó polisulfato de pentosano (PPS, obtenido de Bioscience). Los pesos moleculares de las muestras tratadas con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno (D) disminuyeron a lo largo del tiempo (tal como se esperaba).

50

Tabla 2. Pesos moleculares de xilanos sulfatados.

ID de muestra	Mw (Da)	Polidispersidad (Mw/Mn)
A (15 min de despolimerización)	10 990	2,726
B (30 min de despolimerización)	8295	1,982
C (60 min de despolimerización)	6495	1,303

D (75 min de despolimerización)	2811	1,079
1 (xilano sulfatado de partida)	22 200	1,648
Polisulfato de pentosano (Bioscience)	6816	1,457

*Análisis elemental*

5 Se realizó un análisis elemental (QTI-Intertek, Whitehouse, NJ) con las muestras C y D. En la tabla 3 se presentan los resultados. Basándose en el MW mediante SEC-MALLS, los oligómeros de 20 unidades de azúcar monoméricas (icosámero) y 9 unidades de azúcar monoméricas (eneámero) son los que más concuerdan. Basándose en esto, pueden compararse los resultados elementales (encontrados) con los resultados elementales esperados para oligómeros tales como estos. En la tabla 3 se presentan estos resultados.

10 Tabla 3. Análisis elemental (encontrado) de oligómeros de xilano sulfatado.

ID de muestra	C	H	Na	O	S
C	19,24	2,99	10,24	54,66	12,87
D	19,76	3,09	10,19	52,09	14,87

Tabla 4. Análisis elemental (esperado) para oligómeros de xilano sulfatado.

Oligómero	C	H	Na	O	S
Icosámero (20 meros)	17,86	1,83	13,67	47,57	19,07
Eneámero (9 meros)	17,76	1,85	13,60	47,83	18,96

15 A partir de los resultados presentados en la tabla 4, se calcularon las fórmulas empíricas. Se calcularon las fórmulas empíricas usando los pesos moleculares (Mw) obtenidos mediante SEC-MALLS. En la tabla 5 se presentan las fórmulas empíricas para las muestras C y D. De nuevo, en la tabla 6 se presentan las fórmulas empíricas teóricas (esperadas) para el icosámero (20 meros) y eneámero (9 meros).

20 Tabla 5. Fórmulas empíricas (encontradas) para oligómeros de xilano sulfatado.

ID de muestra	C	H	Na	O	S
C	104	192	29	222	26
D	46	86	12	92	13

25 Tabla 6. Fórmulas empíricas (esperadas) para oligómeros de xilano sulfatado.

Oligómero	C	H	Na	O	S
Icosámero (20 meros)	100	122	40	200	40
Eneámero (9 meros)	45	56	18	91	18

También se midió el contenido en sulfato mediante conductividad, y los resultados se presentan en la tabla 7.

30 Tabla 7. Contenido en sulfato de polisacáridos sulfatados.

ID de muestra	% de S (conductividad)	% de S (ICP-OES)
1 (xilano sulfatado) <sup>a</sup>	14,7	No presentado
2 (xilano resulfatado) <sup>b</sup>	15,6	16,5
Polisulfato de pentosano (Bioscience)	13,0, 12,9	10,7
C (oligosacárido de xilano sulfatado) <sup>c</sup>	13,0	12,9
D (oligosacárido de xilano sulfatado) <sup>c</sup>	16,1	14,9

<sup>a</sup> Sulfatado mediante método de ácido clorosulfónico/beta-picolina.

35 <sup>b</sup> Método de sulfatación de ácido clorosulfónico/beta-picolina repetido con xilano sulfatado 1.

<sup>c</sup> Sulfatado mediante método de ácido clorosulfónico/beta-picolina, después despolimerizado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

<sup>d</sup> Sulfatado mediante el método de complejo de trióxido de azufre-piridina

40 *Ensayo de generación de trombina*

En la figura 40, la figura 41 y la figura 56 - la figura 62 y la figura 64 se exponen CAT y datos derivados del ensayo de generación de trombina para los xilanos sulfatados representativos de la invención.

## 5.2a Preparación de 6-carboxi-icodextrina sulfatada

Se sulfató 6-carboxi-icodextrina usando el método de Maruyama (Maruyama, T., *et al.*, *Carbohydrate Research*, 306 (1998) 35-43) como guía (figura 55). Se convirtió 6-carboxi-icodextrina (2,57 g) en el ácido libre mediante tratamiento con resina de intercambio catiónico fuerte (5 g, resina de Bio-Rad AG 50W-X8). Se trató la disolución acuosa de ácido libre de 6-carboxi-icodextrina (100 ml) con tributilamina (TBA) hasta que se obtuvo un pH de 8. Después se sometió la disolución a evaporación rotatoria hasta obtener un sólido. Se disolvió el residuo en aproximadamente 100 ml de agua y después se liofilizó para proporcionar 3,6 g de sal de TBA de 6-carboxi-icodextrina. Se sulfató la sal de TBA de 6-carboxi-icodextrina, de la siguiente manera. Se disolvió sal de TBA de 6-carboxi-icodextrina (3,6 g) en 112 ml de DMF. Se colocó la disolución en un baño de aceite a 40 °C, tras lo cual se añadieron 21,5 g de complejo de trióxido de azufre-piridina. Se agitó la disolución a 40 °C durante 1 h. Durante este tiempo, se formó una "bola" gomosa en la mezcla de reacción. Se retiró la bola de la mezcla de reacción y se disolvió en 100 ml de agua. Se ajustó el pH de la disolución a 9,95 con NaOH 1 M y se extrajo con 3 porciones de 50 ml de diclorometano. Se separó la fase acuosa y se sometió a evaporación rotatoria hasta obtener un volumen de aproximadamente 30 ml. Se trató el concentrado con una resina de intercambio catiónico fuerte. En la disolución resultante se midió un pH de 1,7 y se ajustó a pH 7 con NaOH 1 M. Se transfirió la disolución a un casete de diálisis (membrana con un MWCO de 3500, Pierce Slide-A-Lyzer) y se dializó de manera continua frente a agua DI durante aproximadamente 15 h a TA. Después se liofilizó el material dializado para proporcionar 1,9 g de 6-carboxi-icodextrina sulfatada.

## 5.2b Resultados

Tabla 1. Contenido en sulfato de polisacáridos sulfatados.

ID de muestra	% de S (conductividad)	% de S (ICP-OES)
(6-Carboxi-icodextrina sulfatada, lote 1) <sup>e</sup>	10,6	11,6

<sup>e</sup> Se convirtió 6-carboxi-icodextrina en la sal de tributilamina y después se sulfató mediante el método de complejo de trióxido de azufre-piridina.

Se sometieron a ensayo las 6-carboxi-icodextrinas sulfatadas para determinar su capacidad para alterar la coagulación. Los resultados del ensayo de generación de trombina se muestran en la figura 42 - la figura 47.

Tabla 2. Resultados de ensayo de aPTT y CAT para 6-carboxiicodextrinas sin fraccionar

Sustancia	Aumento del 50 % del tiempo de coagulación, µg/ml	CE <sub>50</sub> , µg/ml	Razón aPTT/CAT
Fucoidano (control)	7,0	0,3	23,3
6-carboxi-icodextrina (sin fraccionar, lote 1)	3,2	0,04	80,0
6-carboxi-icodextrina (sin fraccionar, lote 2)	4,0	0,07	57,0

Tabla 3. Resultados de ensayo de aPTT y CAT para icodextrinas sulfatadas fraccionadas.

Sustancia	Aumento del 50 % del tiempo de coagulación, µg/ml	CE <sub>50</sub> , µg/ml	Razón aPTT/CAT
Fucoidano (control)	7,0	0,3	23,3
Icodextrina >10 K	2,9	0,3	9,7
Icodextrina 3-10 K	3,1	0,5	6,2
Icodextrina <3 K	>60,0	21,8	?

La tabla 4 proporciona datos de ROTEM para 6-carboxi-icodextrina sulfatada (ejemplo 4, figura 45).

Tabla 4.

	CT (s)	CFT (s)	MCF (mm)	Actividad (%)
Sangre sometida a inh. de FVIII	3922	1986	-	0
+0,41 µg/ml de icodex	1542	388	62	108
+1,23 µg/ml de icodex	1078	172	63,5	129
+3,7 µg/ml de icodex	1152	223	63	125
+11,1 µg/ml de icodex	2526	934	-	63
Sangre normal	1711	340	55	100

Xilano sulfatado y 6-carboxi-icodextrina sulfatada muestran una buena actividad procoagulante en ensayos de CAT a concentraciones muy bajas, teniendo una CE<sub>50</sub> de 0,1 µg/ml y 0,07 µg/ml, respectivamente. La 6-carboxi-

icodextrina también restaura la coagulación en sangre completa sometida a inhibición de FVIII según se determina mediante medidas de ROTEM. La 6-carboxi-icodextrina sulfatada tiene una razón aPTT/CE<sub>50</sub> muy buena. En conjunto, la carboxilación de C6-OH da como resultado una actividad procoagulante mejor, quizás debido a una estabilidad superior de la molécula. Las fracciones con peso molecular inferior presentan actividades reducidas. Sin embargo, la fracción 93A (6-carboxi-icodextrina <3 K) todavía alcanzan aproximadamente el doble del nivel en plasma normal con una CE<sub>50</sub> de 0,4 µg/ml. Se observa una ligera activación de la ruta de contacto mediante 6-carboxi-icodextrina sulfatada a concentraciones >33 µg/ml. La 6-carboxiicodextrina sulfatada revierte el efecto anticoagulante de TFPI de longitud completa exógeno en plasma humano normal.

## 10 EJEMPLO 6

Estudios con células Caco-2/*in vivo*

Objetivo:

Una estrategia para mejorar la biodisponibilidad oral de NASP es la aplicación de potenciadores de la penetración moduladores de la unión estrecha tales como quitosano, bromelaína, desoxicolina (DOC) o caprato de sodio. El objetivo de este estudio era determinar la resorción *in vitro* de NASP seleccionados en el modelo de células Caco-2 en ausencia y presencia de potenciadores de la penetración.

Métodos:

Las células de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) cultivadas en filtros semipermeables se diferencian de manera espontánea para formar una monocapa confluyente. Esta capa de células se asemeja, tanto estructural como funcionalmente, al epitelio del intestino delgado. Se cultivaron células Caco-2 en una placa Transwell-24 de PET en medio de crecimiento celular RPMI suplementado con el 10 % de suero de ternera fetal y el 1 % de L-glutamina. Tras 21 días en una incubadora a 37 °C y una atmósfera del 95 % de aire, el 5 % de CO<sub>2</sub>, se obtuvo una monocapa confluyente. Se añadieron cuatro NASP seleccionados disueltos en 200 µl de medio de crecimiento con o sin potenciadores de la penetración sobre las células en el compartimento apical a una concentración de 1 mg/ml y se incubaron a 37 °C. En la tabla 1 se indican los NASP y potenciadores de la penetración usados para este estudio. Se recogieron muestras de medio (100 µl) a las 2, 4, 6 y 8 h a partir del lado basolateral (volumen de 850 µl) y antes de y a las 8 h a partir del lado apical. En cada recogida de muestras, se reemplazó la alícuota extraída por medio de crecimiento nuevo. Para garantizar que la capa de células permanecía intacta durante el experimento, se monitorizó y se registró la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). En cada experimento, se sometieron a prueba pocillos por triplicado y se realizó el experimento de una a tres veces.

Se determinó la cantidad de NASP que se transfirió desde el compartimento apical hasta el basolateral a lo largo de un periodo de tiempo de 8 h mediante un ensayo de generación de trombina (CAT) basado en actividad semicuantitativo para todos los puntos de tiempo y una espectroscopía de masas con cromatografía de líquidos específica de sustancia únicamente para el punto de tiempo de 8 h.

Resultados:

Se estudió la resorción de 4 NASP sintéticos en combinación con 4 o 5 potenciadores en el modelo de células Caco-2. La cantidad de NASP en el lado basolateral de las células aumentó con el tiempo (figuras 69, 70, 71, 72). La concentración máxima teóricamente posible (µg/ml) fue ligeramente diferente para cada punto de tiempo debido al factor de dilución producido por la toma de muestras. A las 8 h, el máximo posible era de NASP 140 µg/ml. La resorción en el punto de tiempo de 8 h también se expresó en % de resorción. Aunque en ausencia de potenciadores de la penetración no se observó ningún transporte, o solo se observó un transporte débil, de todos los NASP a través de las células, la resorción aumentó significativamente en presencia de potenciadores. La mayor resorción se logró con DOC y una combinación de quitosano+bromelaína. El efecto observado fue mayor con los NASP de bajo MW maltopentaosa y β-ciclodextrina que para las 6-carboxi-icodextrinas.

## 55 EJEMPLO 7

Objetivo:

Estudiar la eficacia de 6-carboxi-icodextrina sulfatada sin fraccionar en un modelo de cobaya sometida a inhibición de FVIII con TEG de sangre completa *ex vivo* en la mejora de los parámetros de coagulación.

Métodos:

A cobayas Dunkin Hartley macho se les inyectó por vía intravenosa un plasma de cabra inhibidor anti-FVIII humano a una dosis de 42 UB/kg (1,9 ml/kg) 45 min antes de la toma de muestras. Tras 40 min, se administró por vía intravenosa NASP a los animales a 0,05, 0,15, 0,45 o 1,35 mg/kg (N=5 por grupo). FEIBA 300 U/kg (Baxter,

BioScience, Austria) sirvió como control positivo y solución salina como control de vehículo. Poco después de la inyección, se realizó punción en la vena cava y se extrajo sangre en presencia de citrato (razón de 1:9) para el análisis mediante TEG de sangre completa. Se realizaron mediciones usando un analizador de hemostasia mediante tromboelastografía (TEG) 5000 (Haemonetics Corp, EE.UU.) a 37 °C. Se preparó cada muestra de sangre calentando previamente de 20 µl de una disolución de CaCl<sub>2</sub> 0,2 M en una cubeta de TEG a 37 °C añadiendo 340 µl de sangre, mezclando y después comenzando inmediatamente el registro de TEG. La medición procedió durante al menos 120 min. Se registraron los parámetros de TEG de tiempo de coagulación (tiempo R), rapidez de refuerzo de coágulo (ángulo) y firmeza de coágulo máxima (MA). Se representó gráficamente el criterio de valoración primario, tiempo R, y se comparó la mediana del valor de los diferentes grupos de dosificación entre sí.

Resultados:

Basándose en resultados *in vitro* a partir de ensayos de CAT con 6-carboxi-icodextrina sulfatada, se diseñó un patrón de dosificación para estudiar el efecto procoagulante en cobayas sometidas a inhibición de FVIII ( $n = 5$ ) tras la administración intravenosa de NASP 0,05; 0,15, 0,45 o 1,35 mg/kg. Los animales mostraron una mediana de tiempo R (tiempo de coagulación) ligeramente reducida de 110 min cuando se les administraron dosis de NASP 0,15 y 0,45 mg/kg en comparación con ausencia de signos de coagulación tras 2 horas sin tratamiento (figura 73).

EJEMPLO 8

Objetivo:

Estudiar las propiedades farmacocinéticas de dos 6-carboxi-icodextrinas sulfatadas de diferentes pesos moleculares en ratas CD tras administración oral. El estudio también aborda la cuestión de si dos potenciadores de la penetración que se seleccionaron basándose en experimentos con células Caco-2 mejoran la biodisponibilidad oral *in vivo*.

Métodos:

Tras una noche de ayuno, a ratas CD macho se les administraron por sonda gástrica dos preparaciones líquidas de 6-carboxiicodextrina sulfatada (S-6-Cl) a una dosis de 50 mg/kg y 5 ml/kg. Las preparaciones o bien no estaban fraccionadas (MW promedio de 24 kD) o bien estaban fraccionadas mediante un método de filtración (MW promedio de 14 kD). Las sustancias se prepararon en una solución salina fisiológica sin potenciador o con DOC al 0,8 % en peso o con quitosano al 3 % en peso + bromelaína 0,5 mg/ml. Cada grupo al que se le administraron dosis de NASP consistía en seis ratas. Para cada formulación, tres ratas adicionales sirvieron como controles de vehículo. Se recogieron muestras de sangre en presencia de citrato (razón de 1:9) antes de la dosificación y 15, 30 min, 1, 5 y 7 h tras la dosificación. Se preparó plasma desplaquetado mediante dos etapas de centrifugación a 3000 rpm durante 10 min.

Los NASP en las muestras de plasma se detectaron mediante un ensayo de fluorescencia que usa el colorante HeparinRed que se une específicamente a polisacáridos sulfatados. Se realizaron experimentos en una placa de microtitulación de 96 pocillos de área media negra (Costar). Para las curvas patrón de S-6-Cl (de 0,185 a 2,5 µg/ml), a 10 µl de plasma de rata se le añadieron 5 µl de S-6-Cl y se mezclaron con 40 µl de plasma combinado humano para minimizar el efecto de matriz de animales individuales. Después, se añadieron 5 µl de colorante HeparinRed y se incubaron en la oscuridad a TA durante 5 min. Se trataron en consecuencia muestras de plasma de los animales a los que se administraron dosis, sin embargo, se sustituyeron los 5 µl de S-6-Cl por tampón. Se detectaron señales fluorescentes con un lector de fluorescencia de microplacas Tecan Safire2™ (ex./em. de 580/620 nm) y se cuantificó la S-6-Cl basándose en la curva patrón de S-6-Cl. El límite de detección para S-6-Cl en plasma de rata para este ensayo era de 0,185 µg/ml.

Resultados:

Dos de las seis ratas a las que se administraron dosis orales de 50 mg/kg de S-6-Cl sin fraccionar en solución salina mostraron niveles en plasma de entre 0,2 y 0,6 µg/ml, mientras que tres de las seis ratas tenían niveles en plasma de hasta 3 µg/ml de NASP cuando se les administraron dosis de S-6-Cl fraccionada. El nivel más alto se alcanzó a los 60 min tras la administración de la dosis. Para ambos NASP, la resorción no se mejoró adicionalmente en presencia de DOC en el que se alcanzaron niveles en plasma similares para ambos NASP. Usar una combinación de quitosano+bromelaína como potenciadores dio como resultado un desenlace similar para S-6-Cl. Con quitosano+bromelaína, los niveles en plasma en todos los puntos de tiempo fueron <0,3 µg/ml, lo cual es menor que para el grupo de solución salina. Esta captación reducida puede deberse a la alta viscosidad de la formulación de quitosano+bromelaína. En resumen, la biodisponibilidad oral para S-6-Cl varió entre las ratas individuales, sin embargo, fue posible detectar NASP en el plasma de ratas a las que se les había administrado por vía oral.

EJEMPLO 9

Objetivo:

Estudiar las propiedades farmacocinéticas de tres 6-carboxi-icodextrinas sulfatadas de diferente MW en ratas CD tras administración intravenosa.

5

Métodos:

A ratas CD macho se les administraron por vía intravenosa tres preparaciones diferentes de 6-carboxi-icodextrina sulfatada (S-6-Cl) a una dosis de 5 mg/kg. Las preparaciones o bien estaban sin fraccionar (MW promedio de 63 kD) o bien estaban fraccionadas mediante un método de filtración (lotes A y B con un MW promedio de 12 y 14 kD, respectivamente). Se prepararon las sustancias en una solución salina fisiológica y se inyectaron a 5 ml/kg. Cada grupo consistía en tres animales. Se recogieron muestras de sangre en presencia de citrato (razón de 1:9) antes de la dosificación y 5, 30 min, 1, 3, 6 y 10 h tras la dosificación. Se preparó plasma desplaquetado mediante dos etapas de centrifugación a 3000 rpm. Se analizaron las muestras de plasma mediante una cromatografía de líquidos – espectrometría de masa, un método específico de sustancia para S-6-Cl.

10

15

Resultados:

La recuperación *in vivo* 5 min tras la administración de dosis i.v. de S-6-Cl 5 mg/kg fue de 28-44 µg/ml, lo cual es menos que la mitad de la concentración en plasma esperada (~100 µg/ml). Para el lote A (12 kD) la recuperación fue la más baja. Para las dos S-6-Cl fraccionadas, la concentración en plasma estaba por debajo del límite de detección 6 h tras la administración. Basándose en las concentraciones en plasma de los puntos de tiempo iniciales, se estimó que la semivida era de entre 30-45 min.

20

25

## REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n de dosificaci3n unitaria para su uso en un m3todo para tratar a un sujeto que necesita coagulaci3n sanguinea potenciada que comprende administrar una cantidad terap3uticamente eficaz de una composici3n que comprende un polisac3rido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) al sujeto, en el que el polisac3rido sulfatado o sulfonatado es un miembro seleccionado de  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina, melecitosa, estaquiosa, rafinosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa, icodextrina, 6-carboxiicodextrina, comprendiendo la formulaci3n de dosificaci3n unitaria el NASP en una cantidad de desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 1000 mg.
2. Formulaci3n de dosificaci3n unitaria seg3n la reivindicaci3n 1 para el uso seg3n la reivindicaci3n 1, en el que el NASP est3 en una cantidad suficiente para proporcionar una dosificaci3n de desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o de aproximadamente 0,01 mg/kg a 20 mg/kg.
3. Formulaci3n de dosificaci3n unitaria seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para el uso seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el NASP est3 en una cantidad suficiente para potenciar la coagulaci3n sanguinea en un sujeto al que se le administra la formulaci3n de dosificaci3n unitaria.
4. Formulaci3n de dosificaci3n unitaria seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para el uso seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la formulaci3n de dosificaci3n unitaria es una formulaci3n de dosificaci3n unitaria oral.
5. Formulaci3n de dosificaci3n unitaria seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el uso seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el NASP se administra por v3a oral.
6. Formulaci3n de dosificaci3n unitaria seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el sujeto tiene un trastorno de hemorragia seleccionado del grupo que consiste en un trastorno de hemorragia cr3nico o agudo, un trastorno de la coagulaci3n cong3nito provocado por una deficiencia de factor sanguineo y un trastorno de la coagulaci3n adquirido.
7. Formulaci3n de dosificaci3n unitaria seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para el uso seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la deficiencia de factor sanguineo es una deficiencia de uno o m3s factores seleccionados del grupo que consiste en factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, protrombina, fibrin3geno y factor de von Willebrand.
8. Formulaci3n de dosificaci3n unitaria seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para el uso seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la causa de la necesidad de coagulaci3n sanguinea potenciada es previa a la administraci3n de un anticoagulante, cirug3a u otro procedimiento invasivo.
9. Formulaci3n de dosificaci3n unitaria seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para el uso seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el m3todo comprende adem3s administrar un agente seleccionado del grupo que consiste en un procoagulante, un activador de la ruta de coagulaci3n intr3nseca, un activador de la ruta de coagulaci3n extr3nseca y un segundo NASP.
10. Formulaci3n de dosificaci3n unitaria seg3n la reivindicaci3n 9 para el uso seg3n la reivindicaci3n 9, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en factor tisular, factor II, factor V, factor Va, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor X, factor Xa, factor IX, factor IXa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, precalicre3na, calicre3na y HMWK y factor de von Willebrand.
11. Formulaci3n de dosificaci3n unitaria seg3n la reivindicaci3n 8 para el uso seg3n la reivindicaci3n 8, en la que el anticoagulante se selecciona del grupo que consiste en heparina, un derivado de cumarina, tal como warfarina o dicumarol, inhibidor de la ruta de factor tisular (TFPI), antitrombina III, anticoagulante l3pico, p3ptido anticoagulante de nematodos (NAPc2), factor VIIa bloqueado en el sitio activo (factor VIIai), inhibidores de factor IXa, inhibidores de factor Xa, incluyendo fondaparinux, idraparinux, DX-9065a y razaxab3n (DPC906), inhibidores de factores Va y VIIIa, incluyendo prote3na C activada (APC) y trombomodulina soluble, inhibidores de trombina, incluyendo hirudina, bivalirudina, argatroban y ximelagatr3n, y un anticuerpo que se une a un factor de coagulaci3n.
12. Formulaci3n de dosificaci3n unitaria seg3n la reivindicaci3n 8 para el uso seg3n la reivindicaci3n 8, en la que el anticoagulante es un anticuerpo que se une a un factor de coagulaci3n seleccionado del grupo que consiste en factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor XI, factor XII, factor de von Willebrand, precalicre3na y HMWK.

13. Método de inhibición de la actividad del inhibidor de la ruta de factor tisular (TFPI) en una muestra biológica, comprendiendo el método combinar la muestra biológica con una cantidad suficiente de un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) para inhibir la actividad de TFPI, en el que el NASP es un miembro seleccionado de  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina, melecitosa, estaquiosa, rafinosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa, icodextrina y 6-carboxiicodextrina.
14. Composición que comprende: (a) un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) que es un miembro seleccionado de  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina, melecitosa, estaquiosa, rafinosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa, icodextrina y 6-carboxiicodextrina; y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable; y uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II y factor de von Willebrand, factor tisular, factor VIIa, factor Va, factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y factor VIIIa.
15. Método de medición de la aceleración de la coagulación sanguínea mediante un polisacárido sulfatado o sulfonatado no anticoagulante (NASP) en una muestra biológica, en el que el NASP es un miembro seleccionado de  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina, melecitosa, estaquiosa, rafinosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa, icodextrina y 6-carboxiicodextrina, comprendiendo el método: a) combinar la muestra biológica con una composición que comprende el NASP; y b) medir el tiempo de coagulación de la muestra biológica, c) comparar el tiempo de coagulación de la muestra biológica con el tiempo de coagulación de una muestra biológica correspondiente no expuesta al NASP, en el que una disminución en el tiempo de coagulación de la muestra biológica expuesta a NASP es indicativa de un NASP que acelera el tiempo de coagulación.

25

FIG. 1

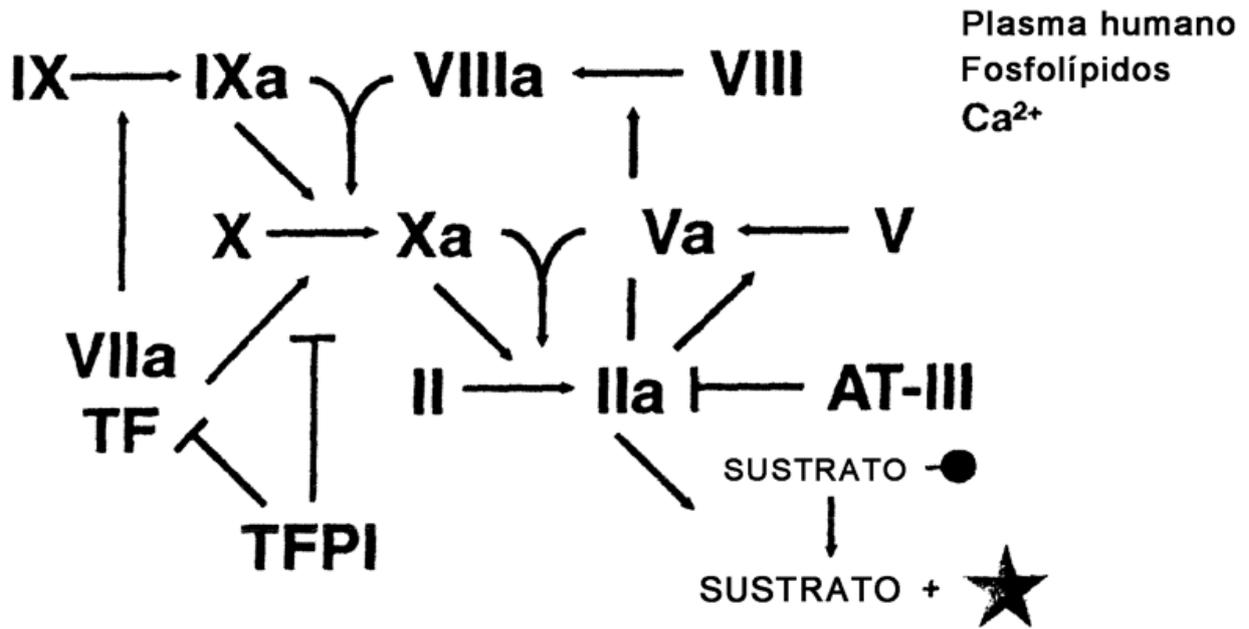
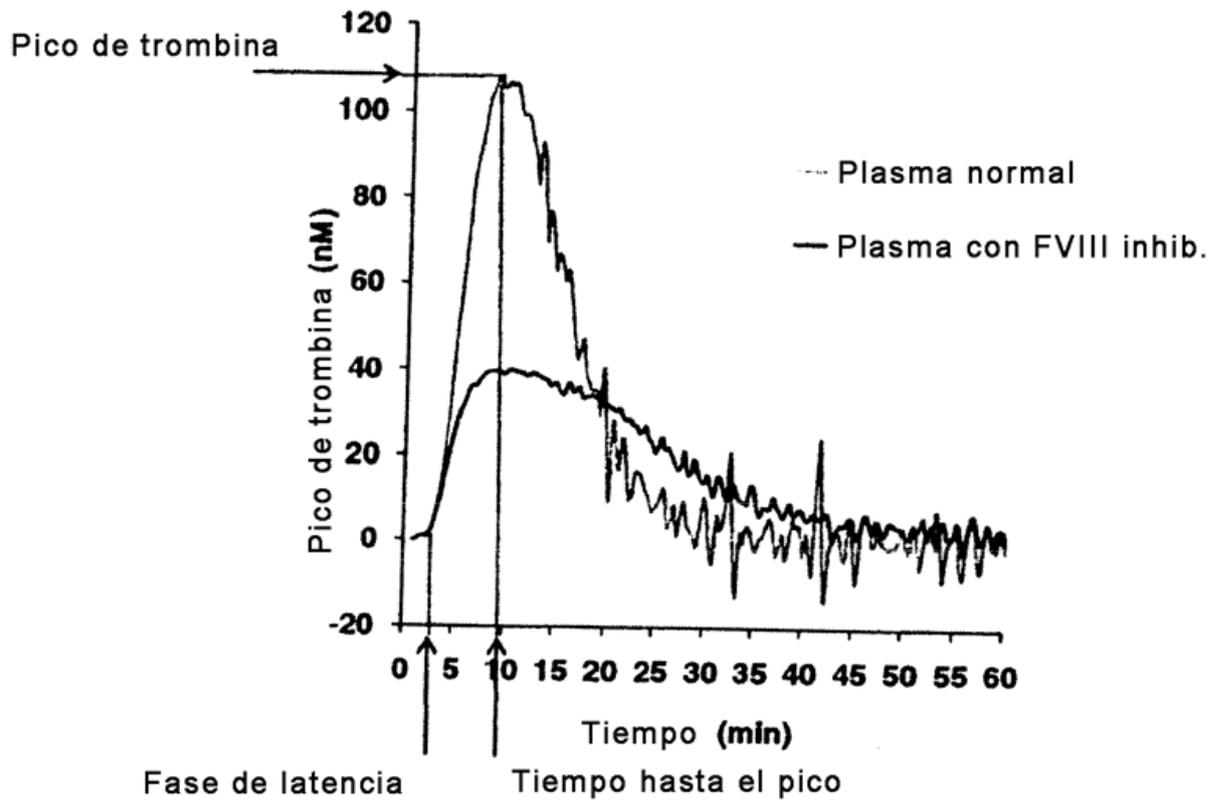
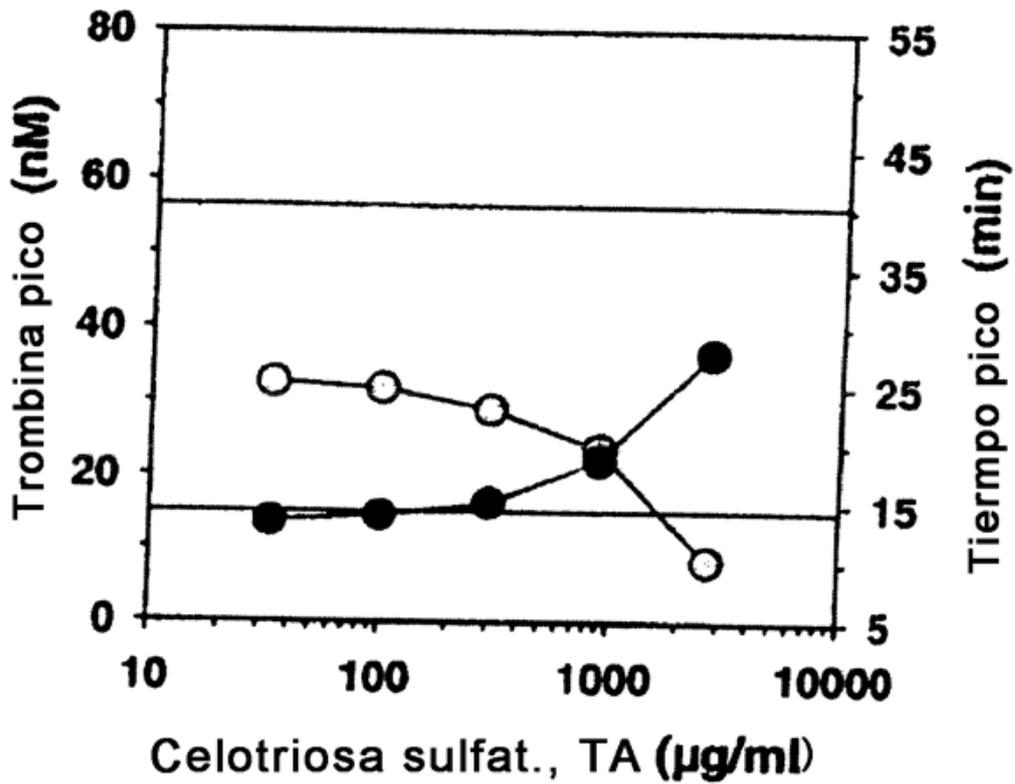


FIG. 2



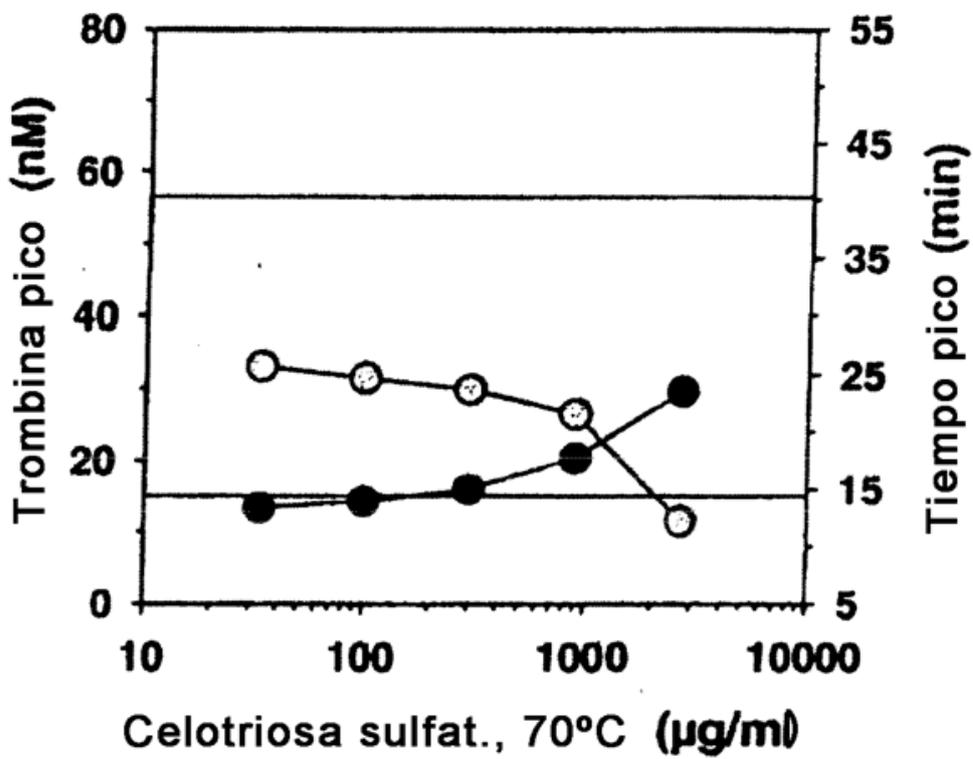
**FIG. 3A**

Celotriosa, TA, el 70% no sulfatada, el 30% mono <1% de S



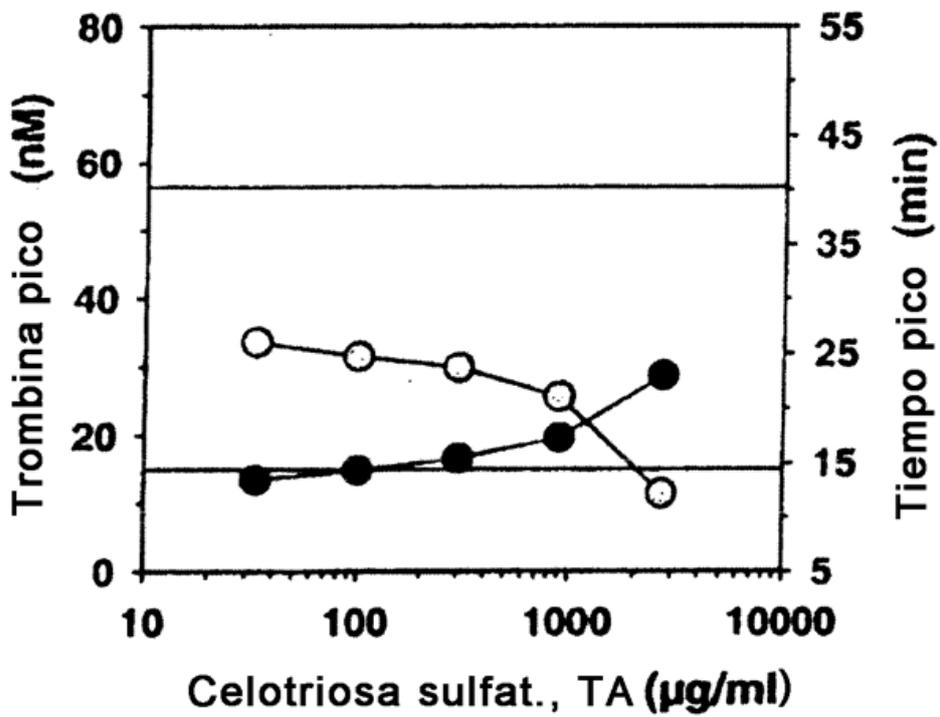
**FIG. 3B**

Celotriosa, 70°C, el 30% no sulfatada, el 70% mono < 2% de S



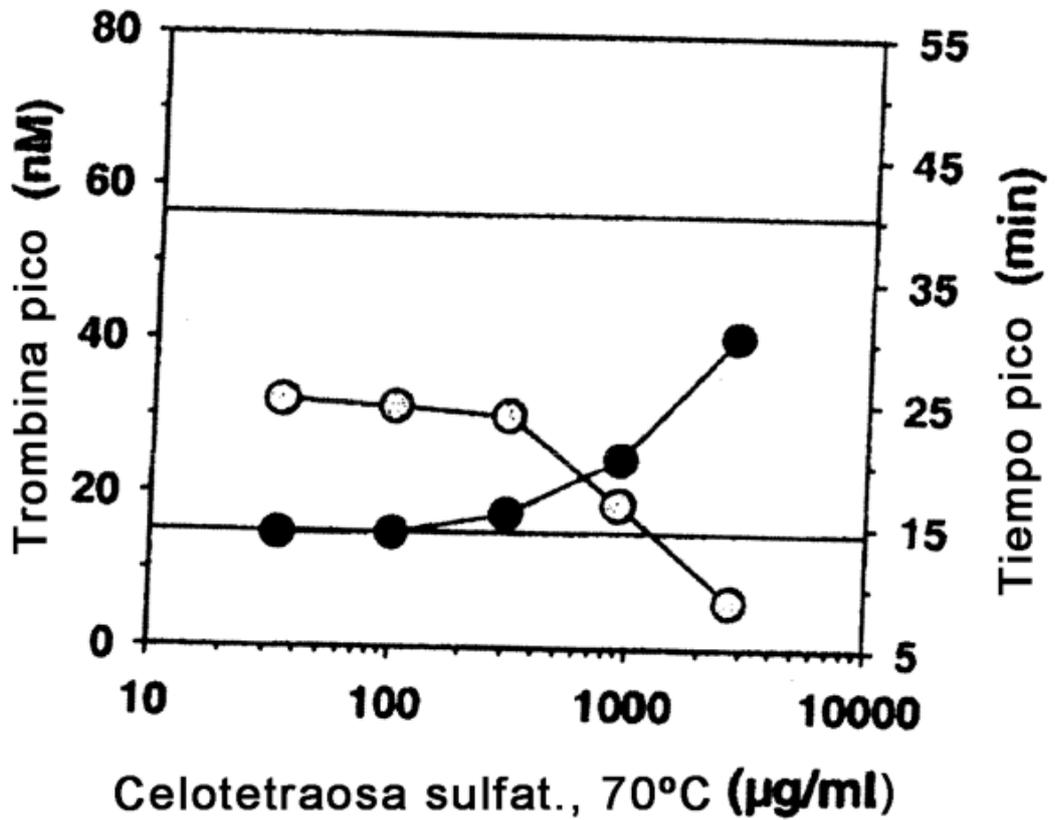
**FIG. 4A**

Celotetraosa, TA, el 80% no sulfatada, el 20% mono < 0.5% de S



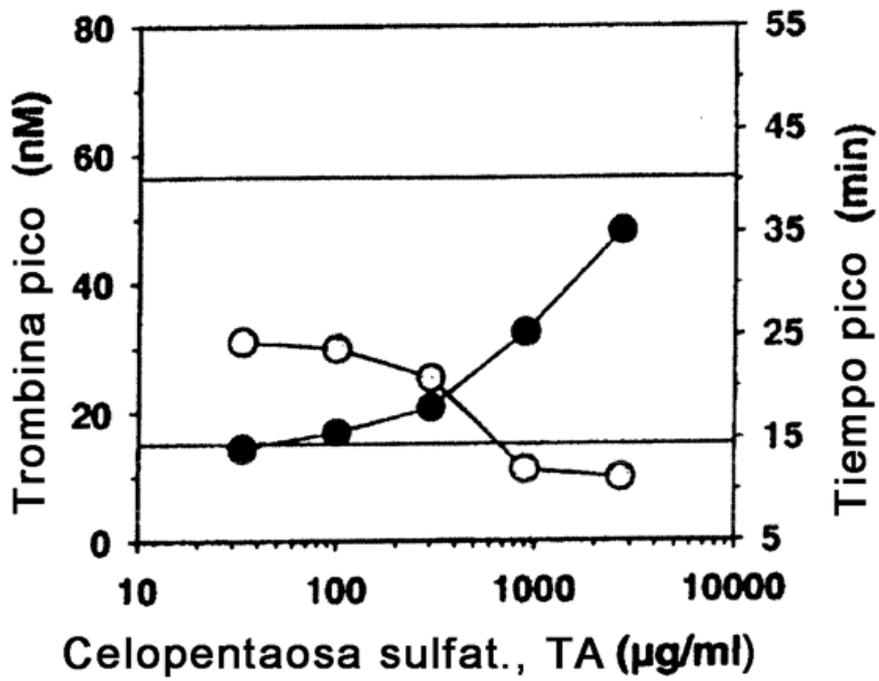
**FIG. 4B**

Celotetraosa, 70°C, el 40% no sulfatada, el 30% mono,  
30% de degradación de producto < 1% de S



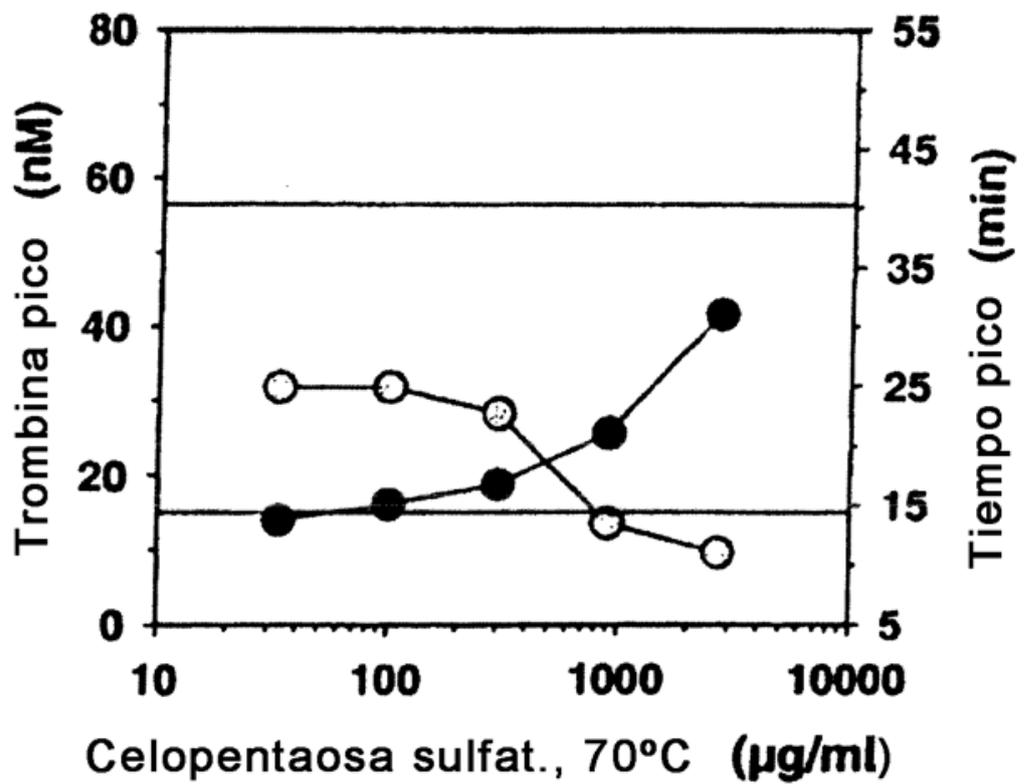
**FIG. 5A**

Celopentaosa, TA, el 90% no sulfatada, el 10% mono < 0.5% de S



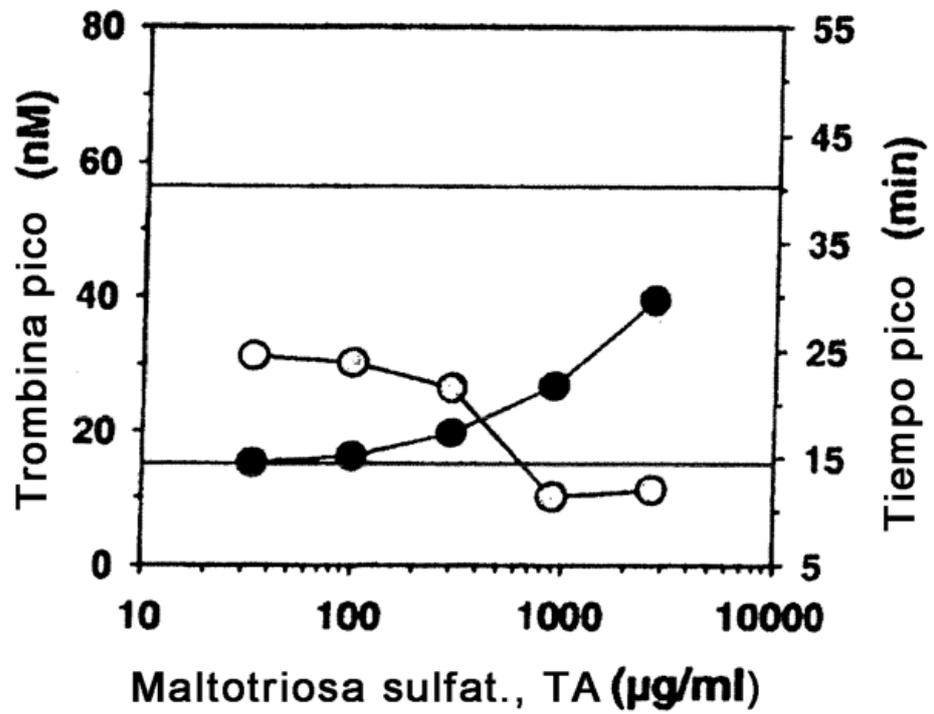
**FIG. 5B**

Celopentaosa, 70°C, el 80% no sulfatada, el 10% mono,  
 10% de degradación de producto < 0.5% de S



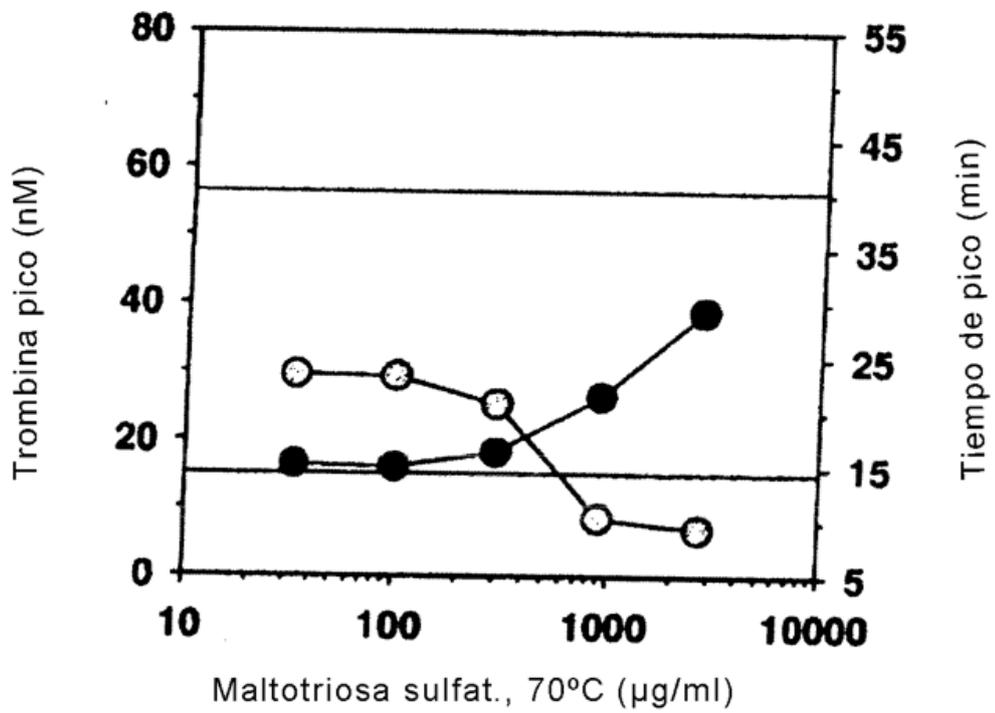
**FIG. 6A**

Maltotriosa, TA, el 50 % monosulfatada, 25% disulfatada,  
25% trisulfatada, ~ 4% de S



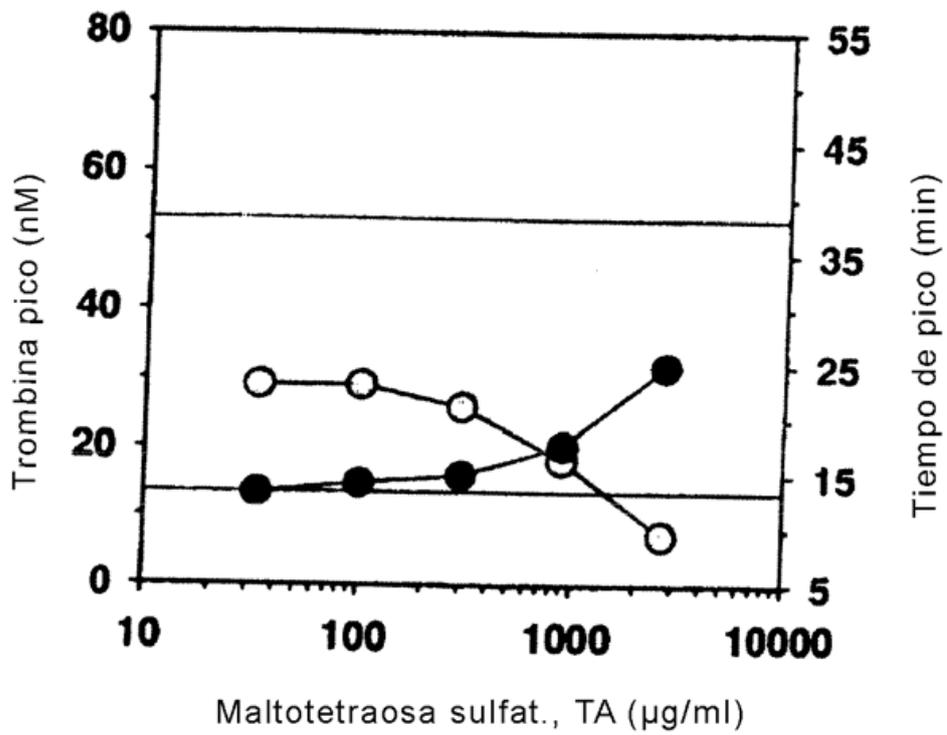
**FIG. 6B**

Maltotriosa, 70°C, 60% monosulfatada, 40% de producto de degradación,  
< 2% de S



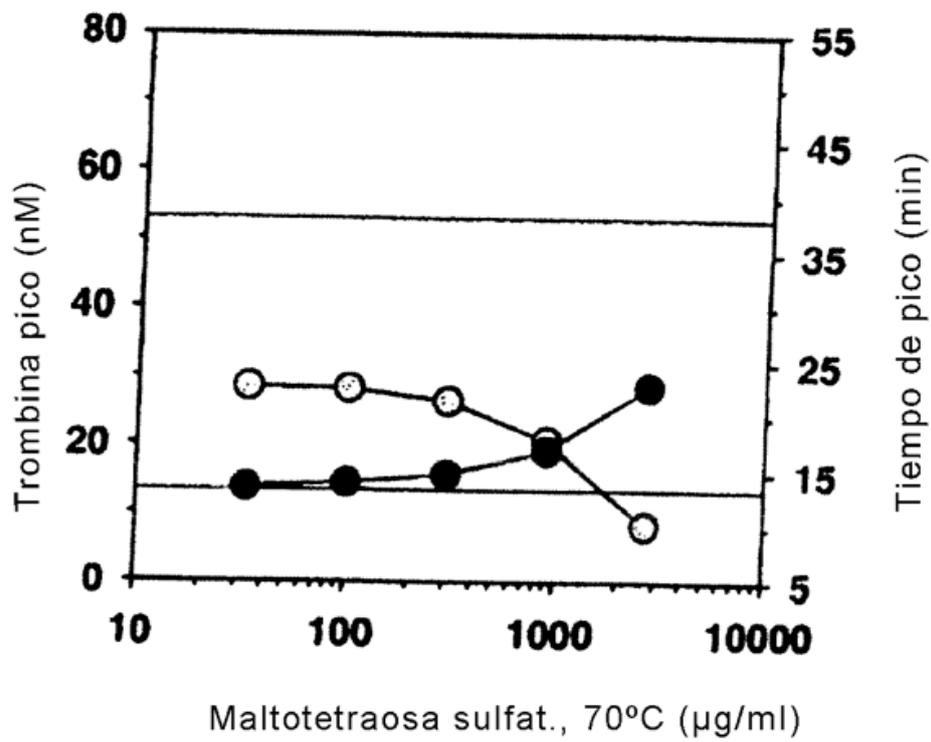
**FIG. 7A**

Maltotetraosa, TA, 70% no sulfatada, 30% monosulfatada, < 1% de S



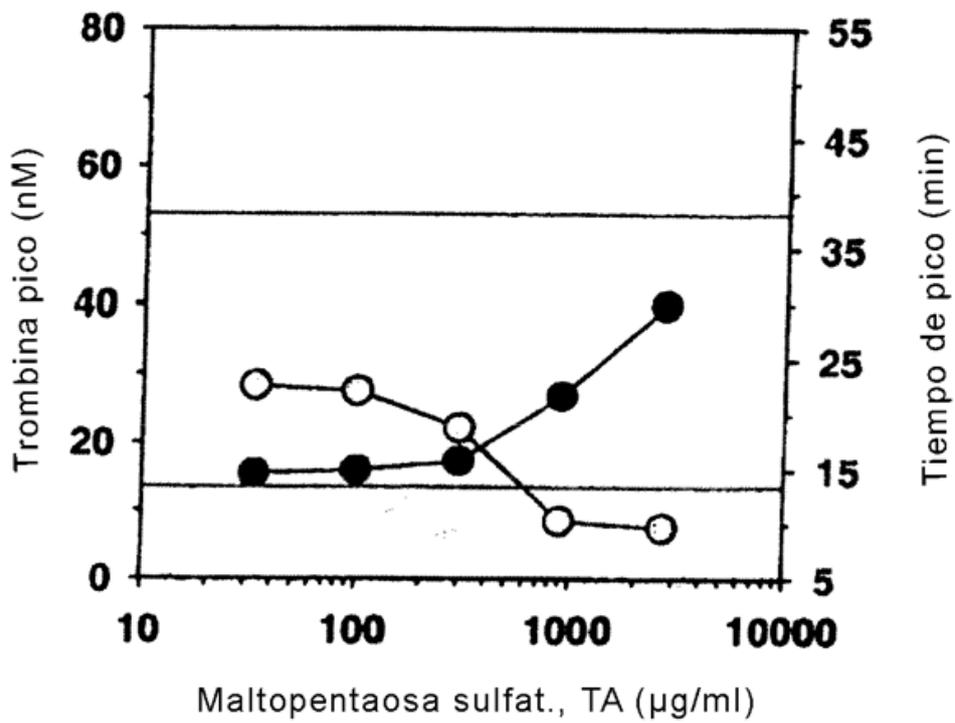
**FIG. 7B**

Maltotetraosa, 70°C, 50% no sulfatada, 50% monosulfatada, < 1% de S



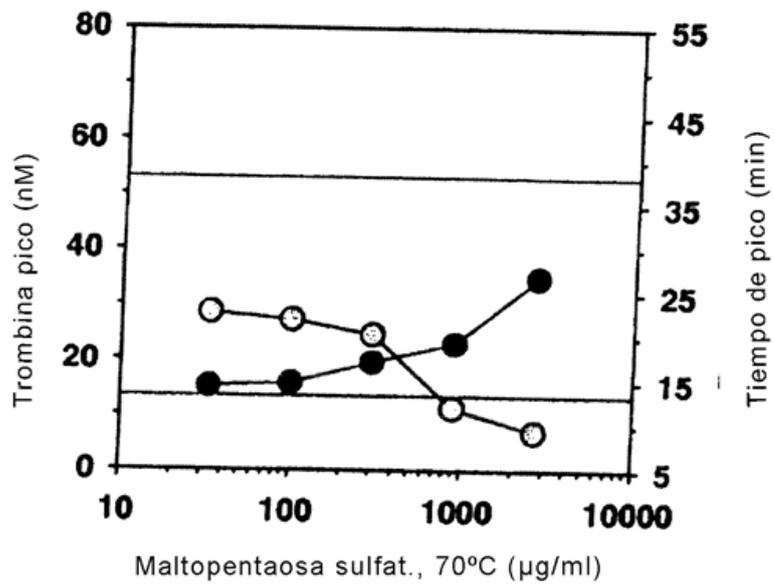
**FIG. 8A**

Maltopentaosa, TA, 60% no sulfatada, 40% monosulfatada, < 1% de S



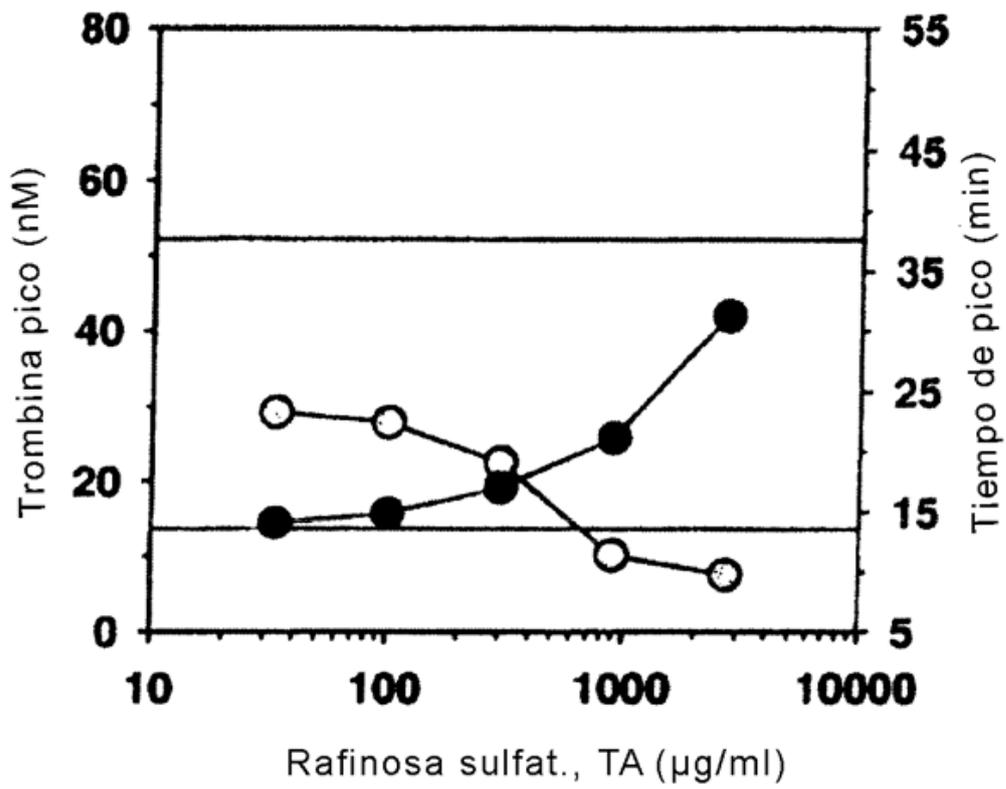
**FIG. 8B**

Maltopentaosa, 70°C, 50% no sulfatada, 30% monosulfatada, 20% de producto de degradación, < 0,5% de S



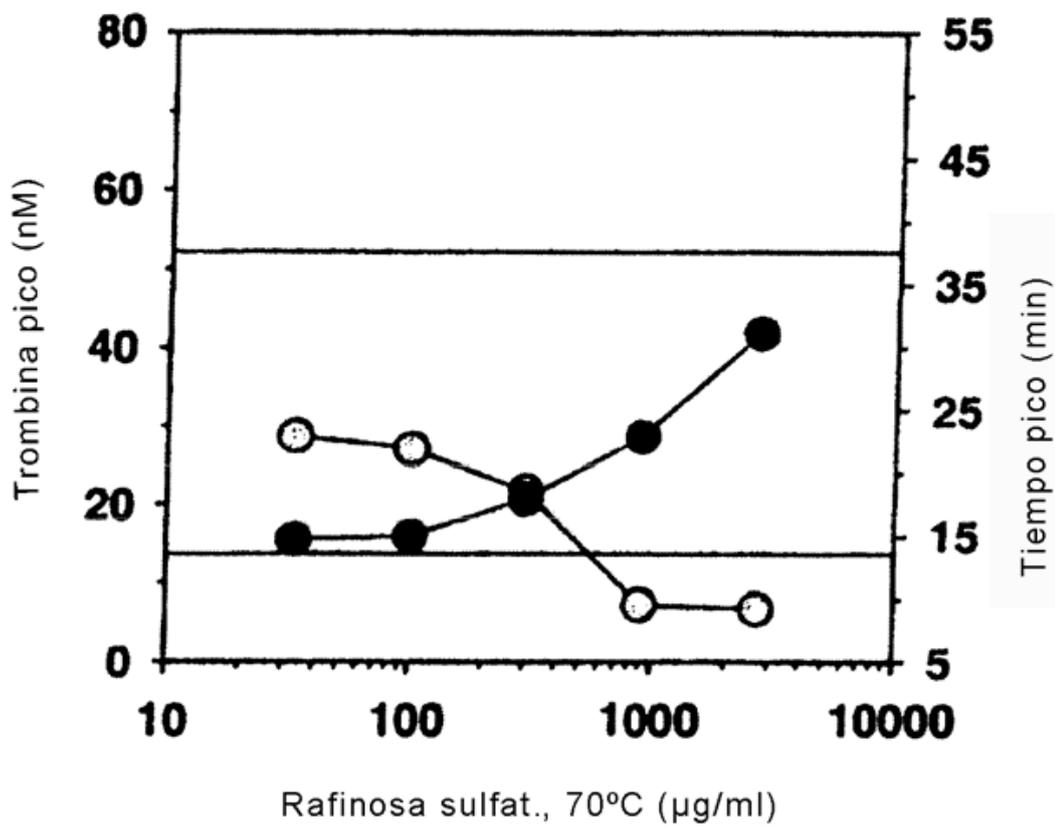
**FIG. 9A**

Rafinosa, TA, 70% no sulfatada, 30% monosulfatada, < 1 % de S



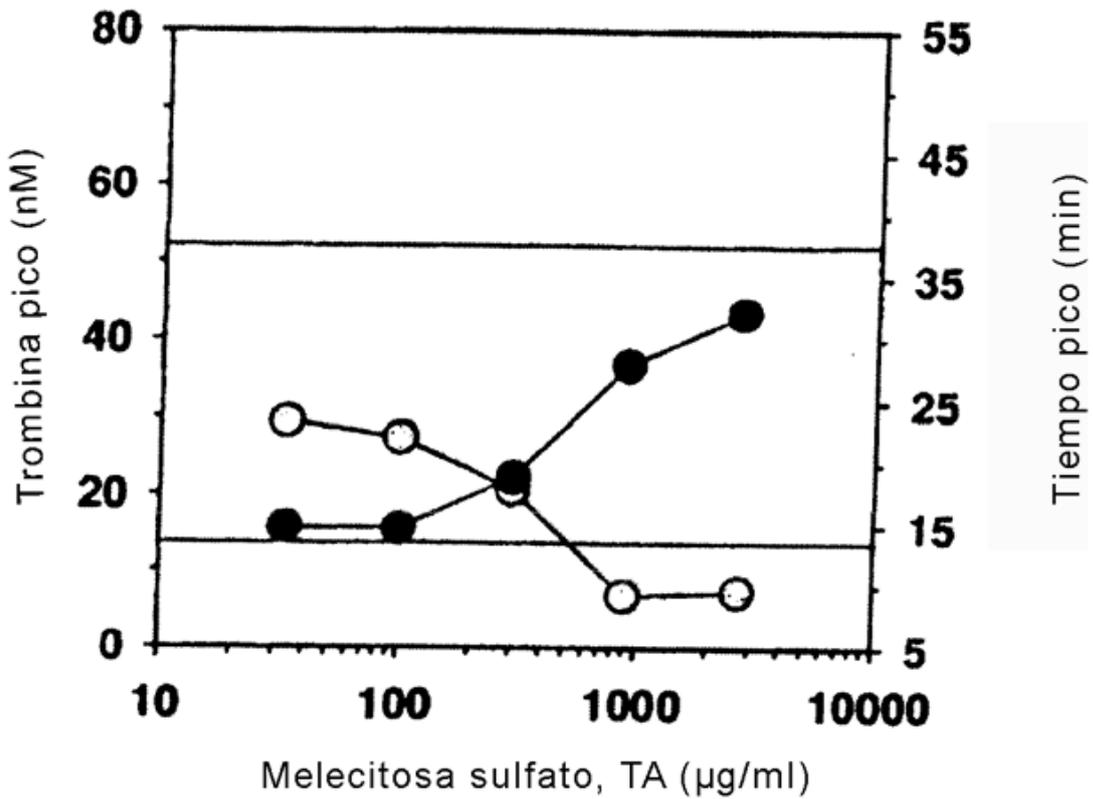
**FIG. 9B**

Rafinosa, 70°C, 20% no sulfatada, 30% monosulfatada, 50% de producto de degradación, < 1% de S



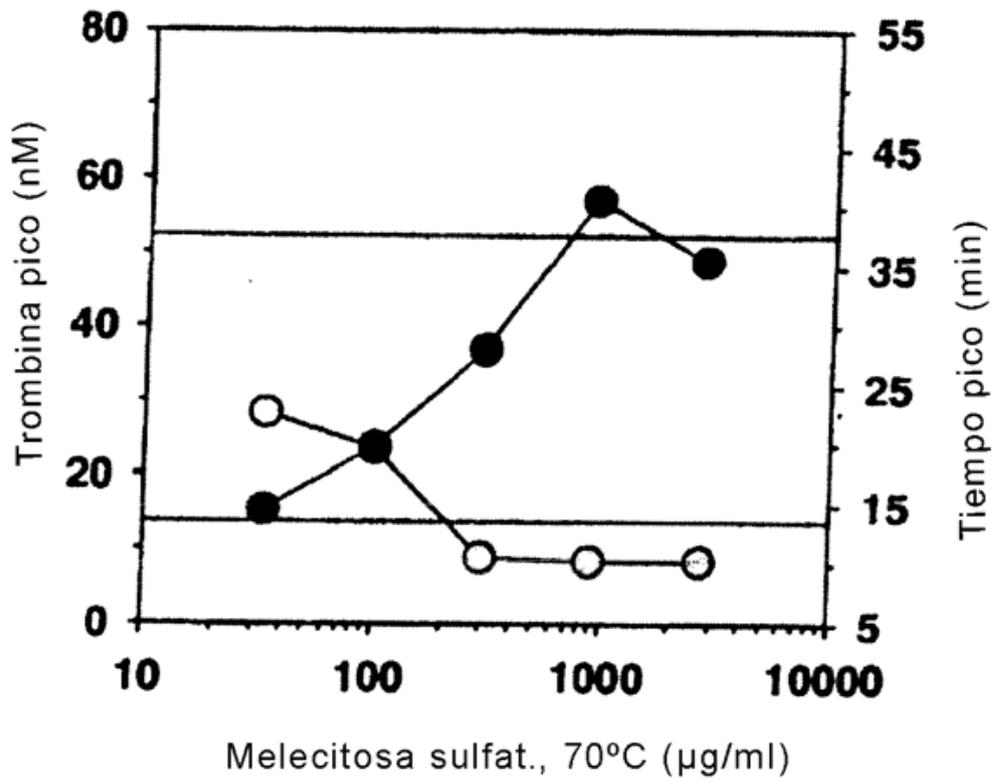
**FIG. 10A**

Melecitosa, TA, 40% no sulfatada, 50% monosulfatada, 10% disulfatada, < 2% de S



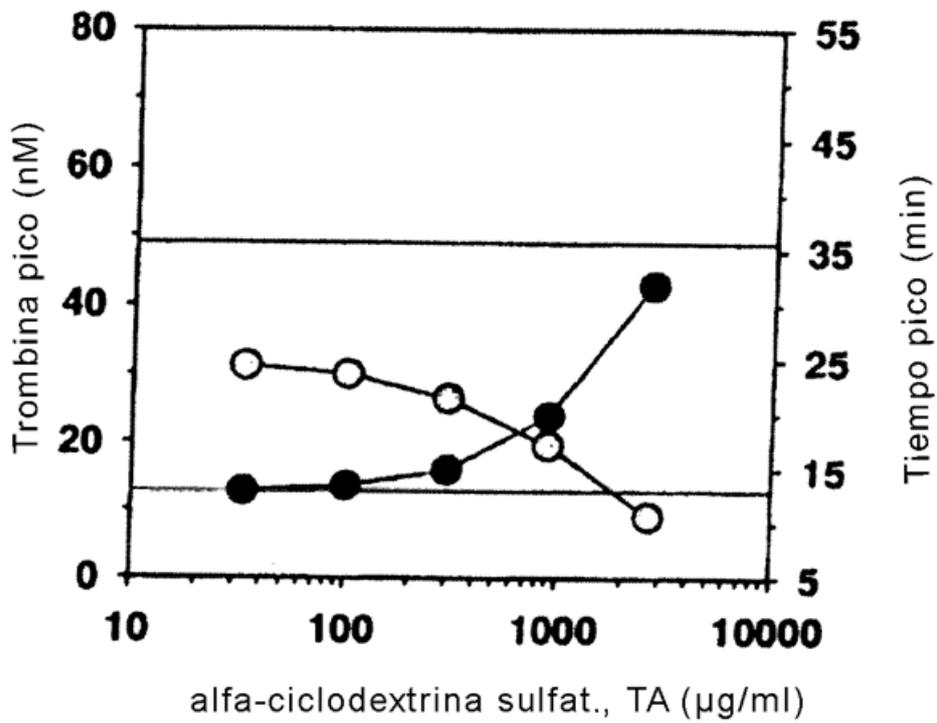
**FIG. 10B**

Melecitosa, 70°C, 2% no sulfatada, 50% monosulfatada, 25% disulfatada, < 3% de S



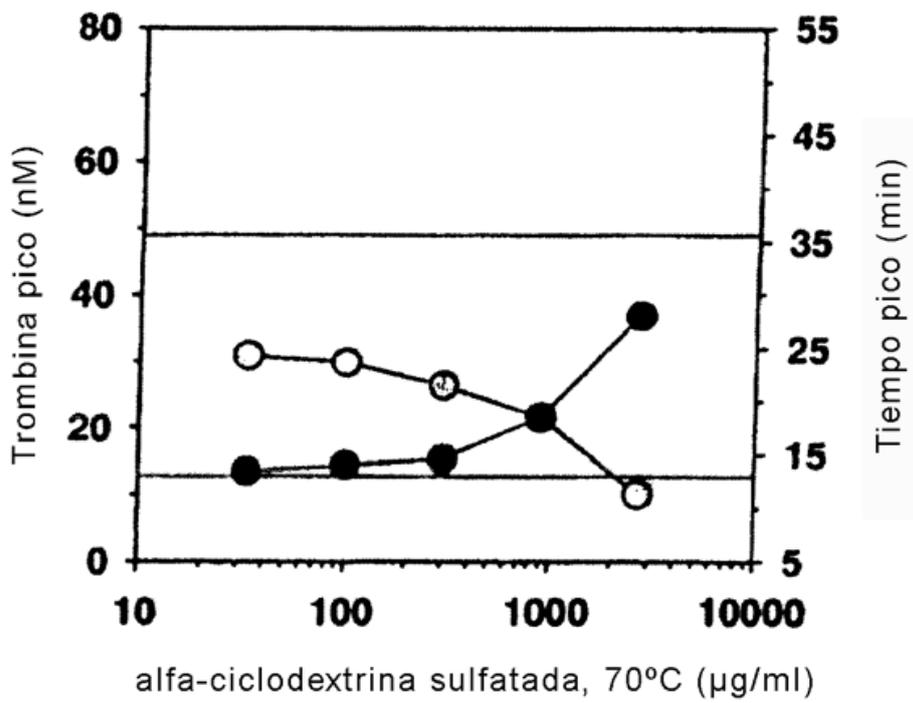
**FIG. 11A**

$\alpha$ -ciclodextrina, TA, 45% no sulfatada, 50% monosulfatada, 5% disulfatada, < 1% de S



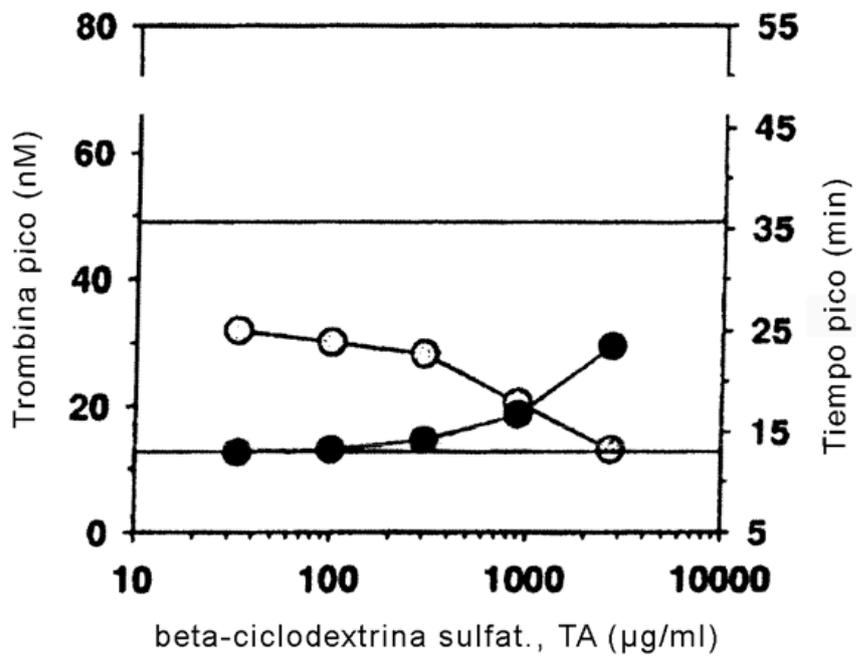
**FIG. 11B**

$\alpha$ -ciclodextrina, 70°C, 50% no sulfatada, 50% monosulfatada, < 1% de S



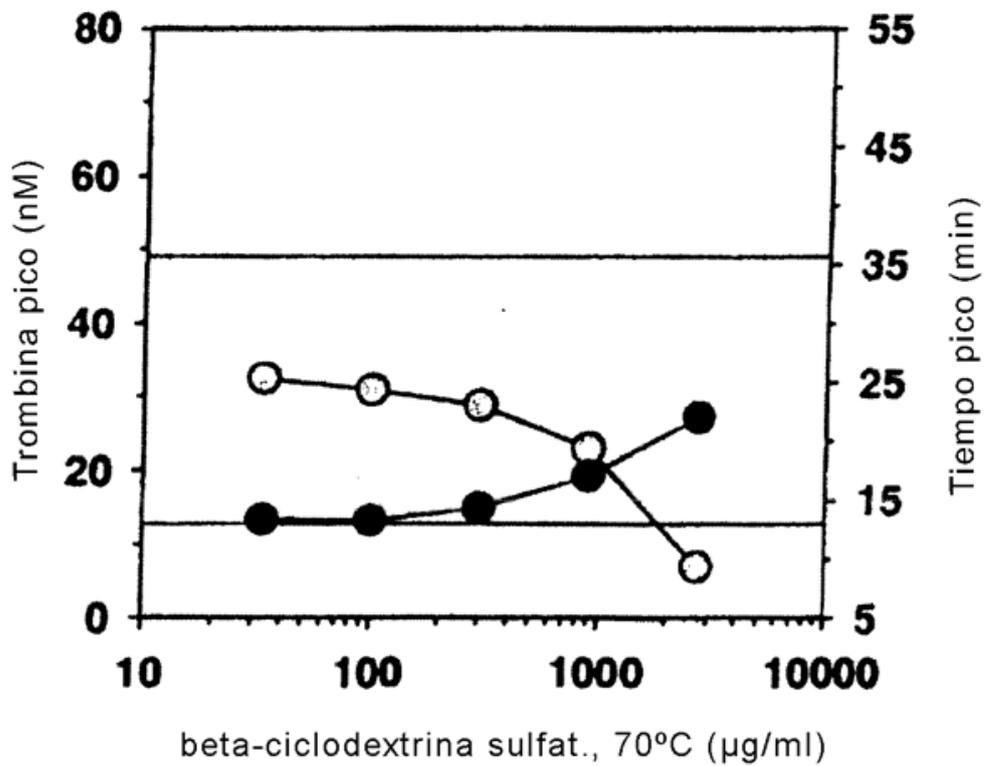
**FIG. 12A**

$\beta$ -ciclodextrina,TA, 70% no sulfatada, 30% monosulfatada, < 0,5% de S



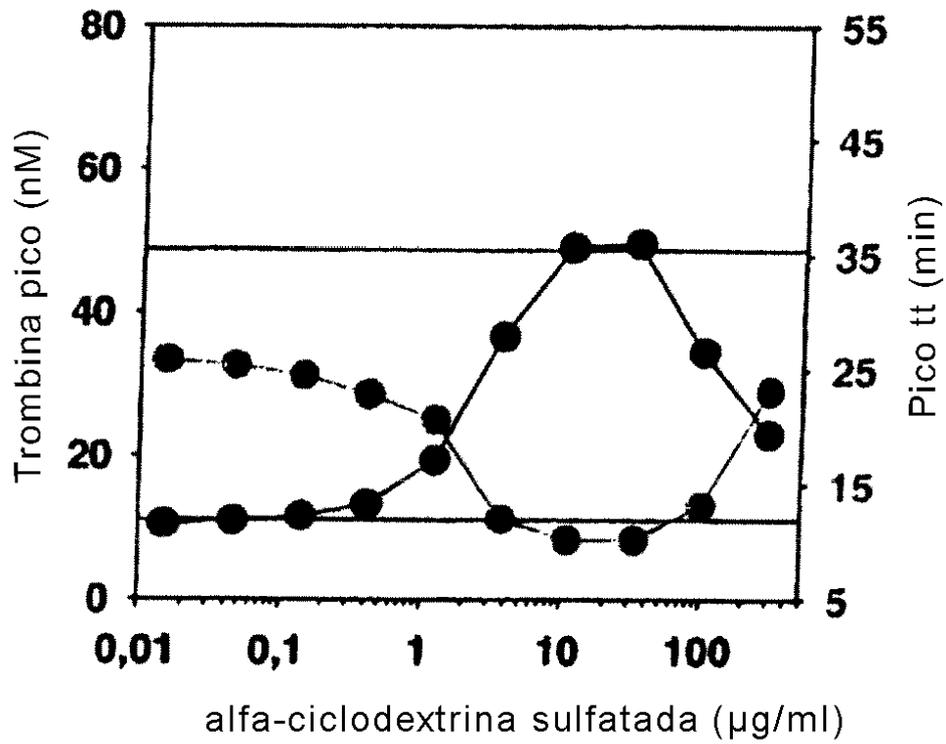
**FIG. 12B**

$\beta$ -ciclodextrina, 70°C, 60% no sulfatada, 40% monosulfatada,  
< 0,5 % de S



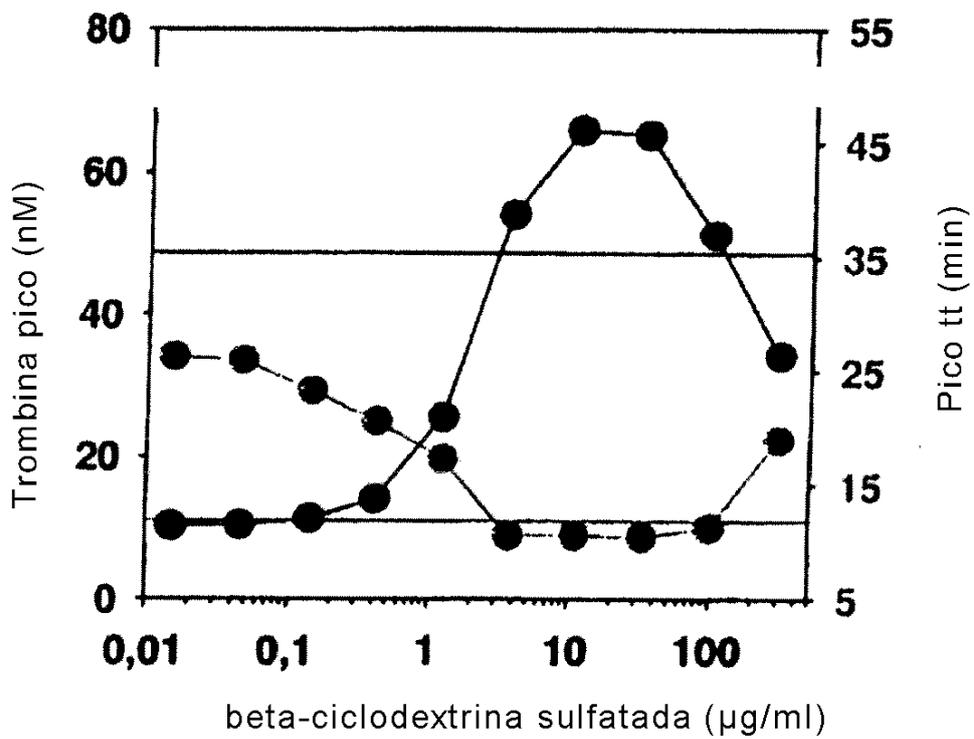
**FIG. 13**

$\alpha$ -ciclodextrina, 15,3% de S, ~64% de sulfatación, ~11 sulfatos



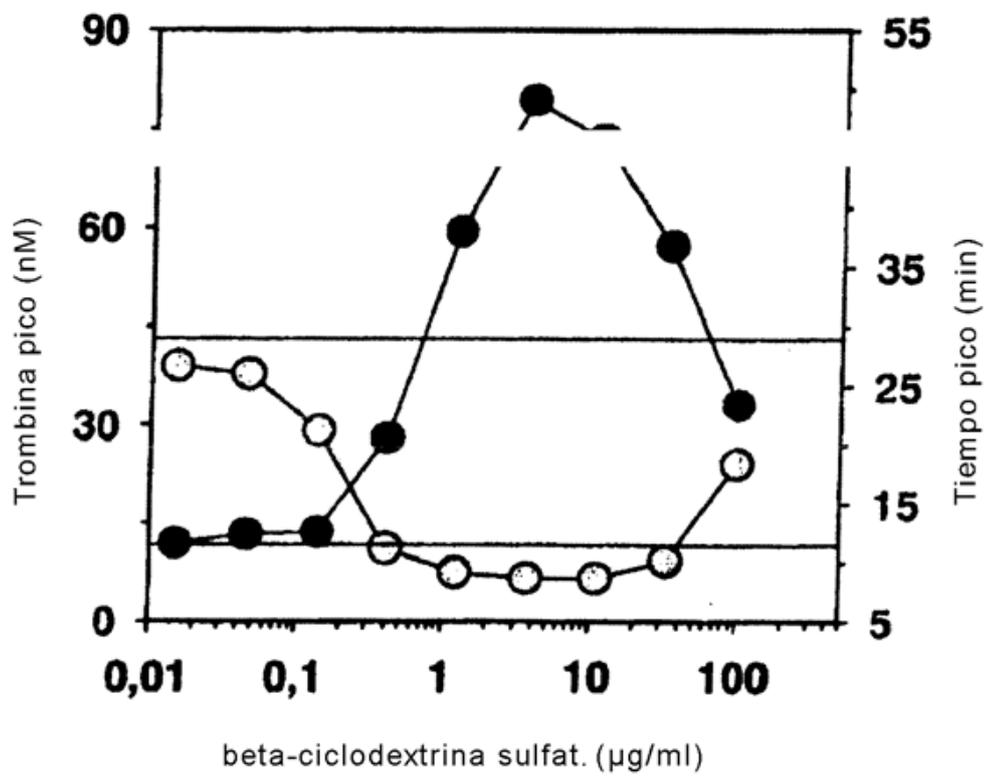
**FIG. 14A**

$\beta$ -ciclodextrina, 13,5% de S, ~56% de sulfatación, ~12 sulfatos



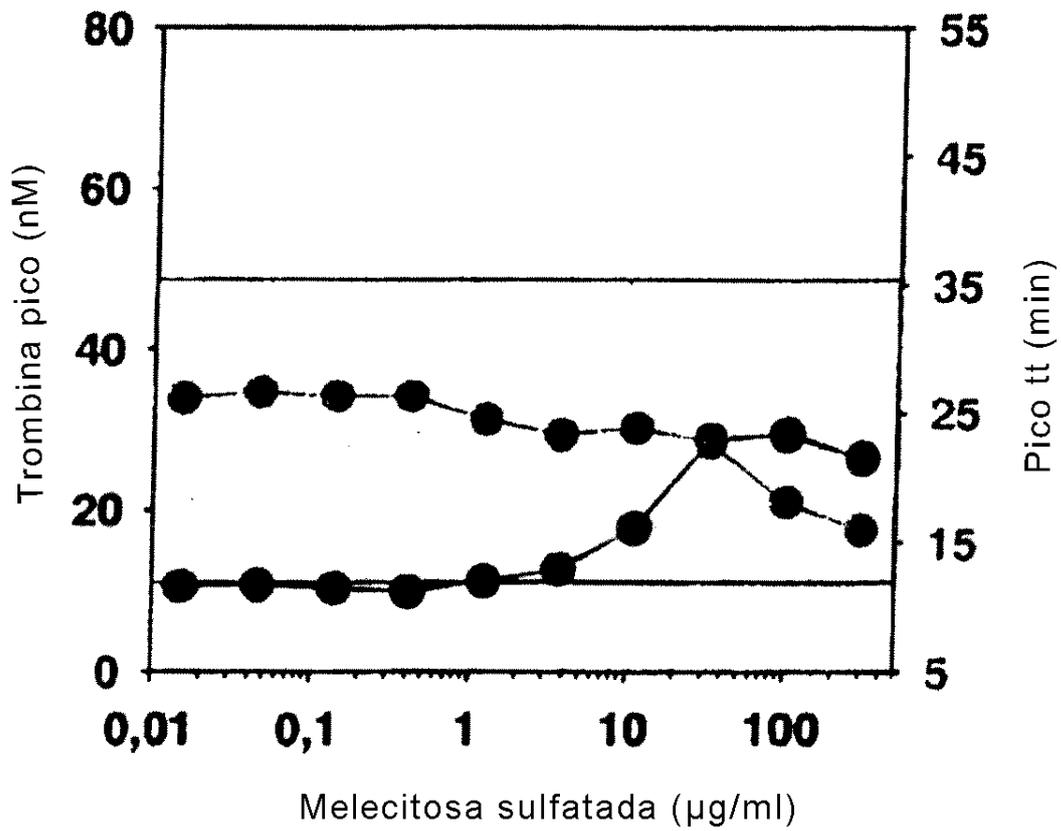
**FIG. 14B**

$\beta$ -ciclodextrina sulfatada: Sigma; ~2,9 kDa, 18,9% de S



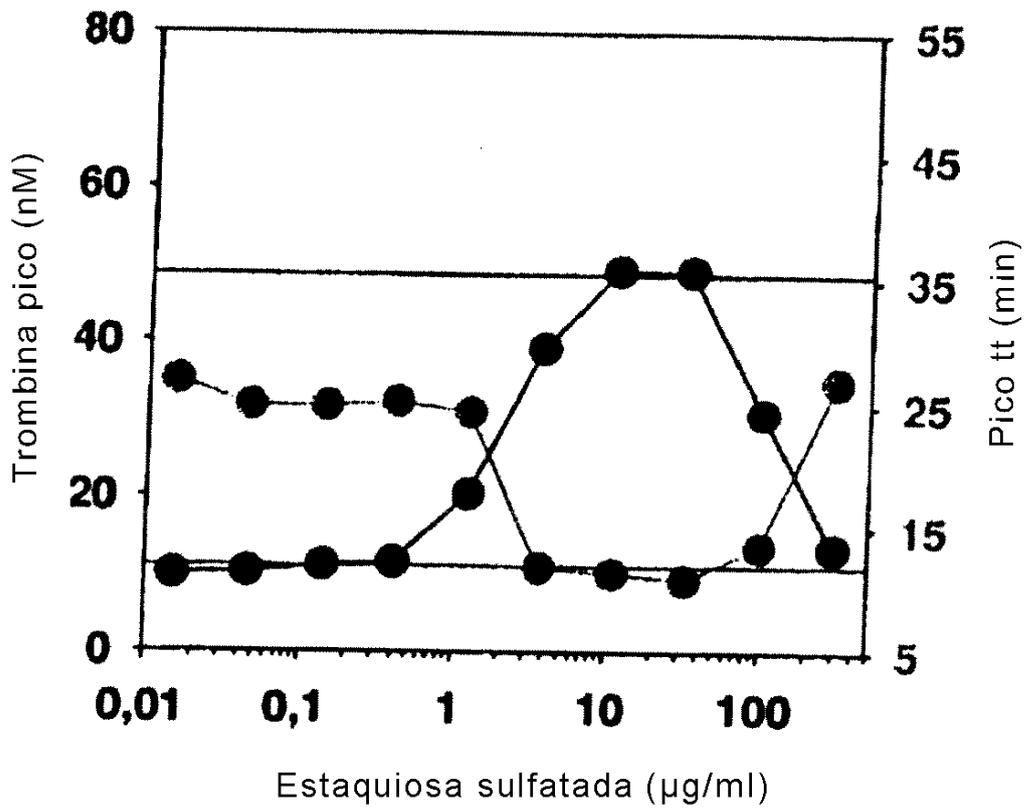
**FIG. 15**

Melecitosa 18,7% de S, ~73% de sulfatación, ~8 sulfatos



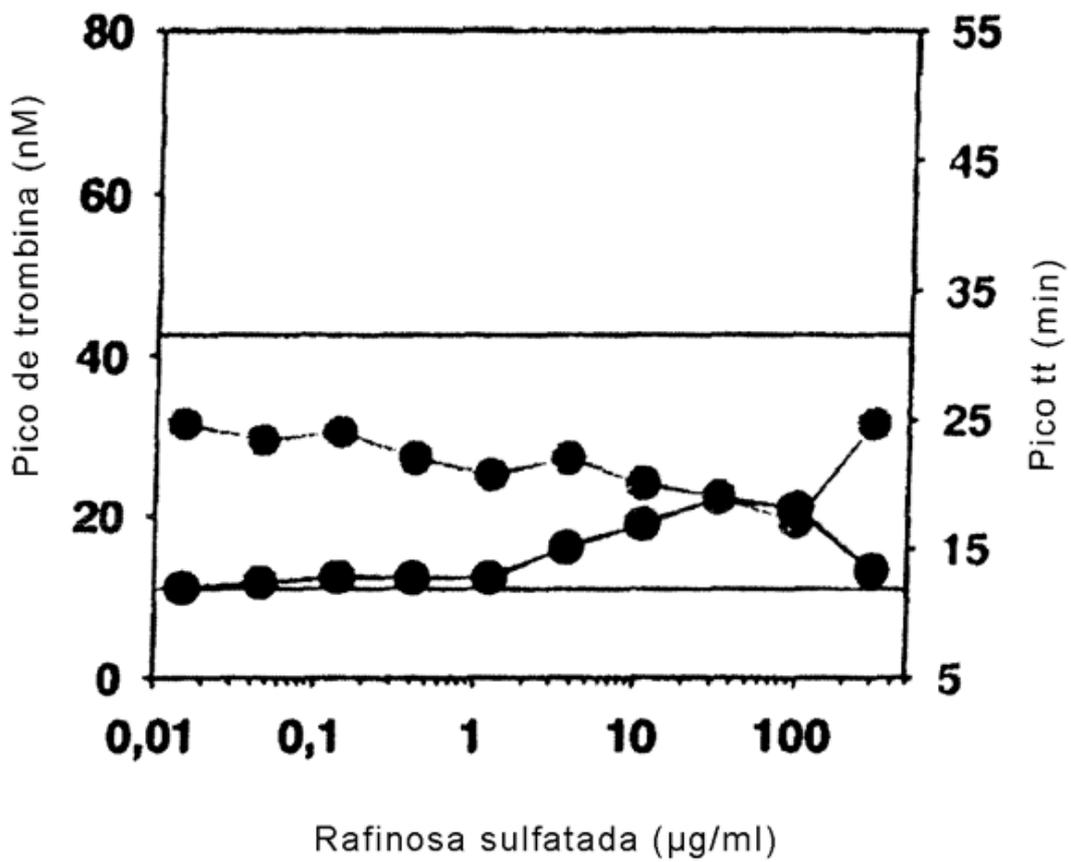
**FIG. 16**

Estaquiiosa, 18,4% de S, ~73% de sulfatación, ~10 sulfatos



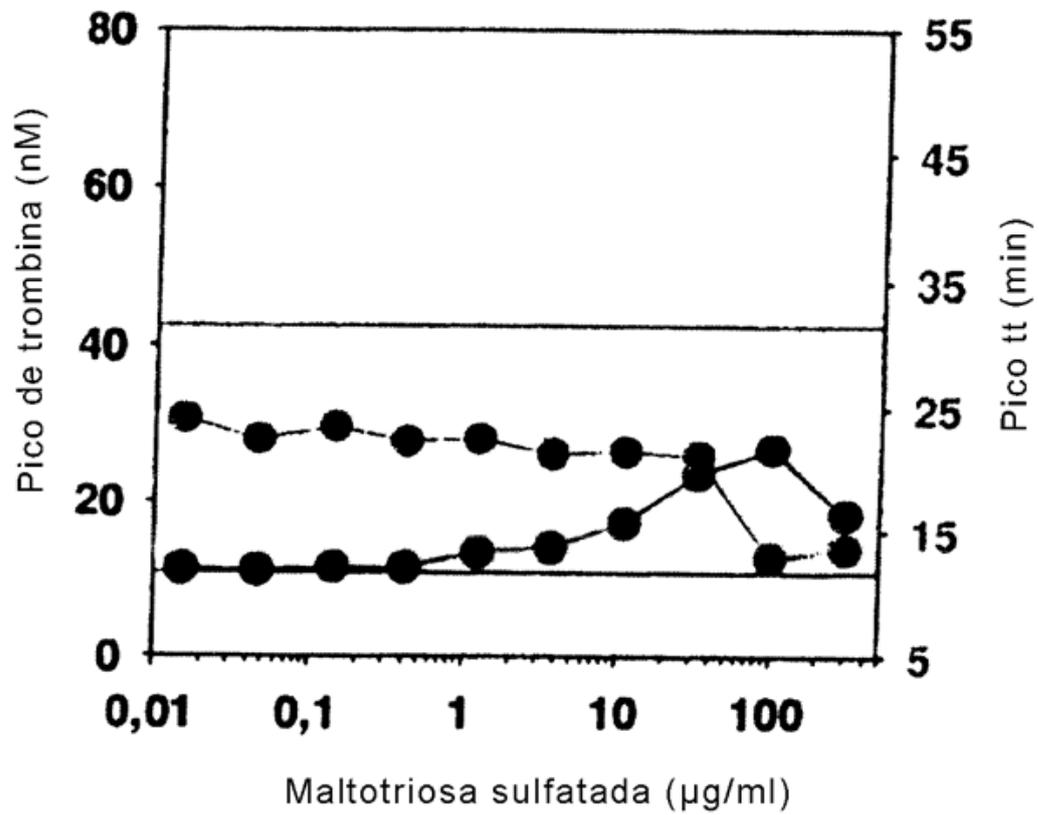
**FIG. 17**

Rafinosa, 14,9% de S, ~58% de sulfatación, ~6 sulfatos



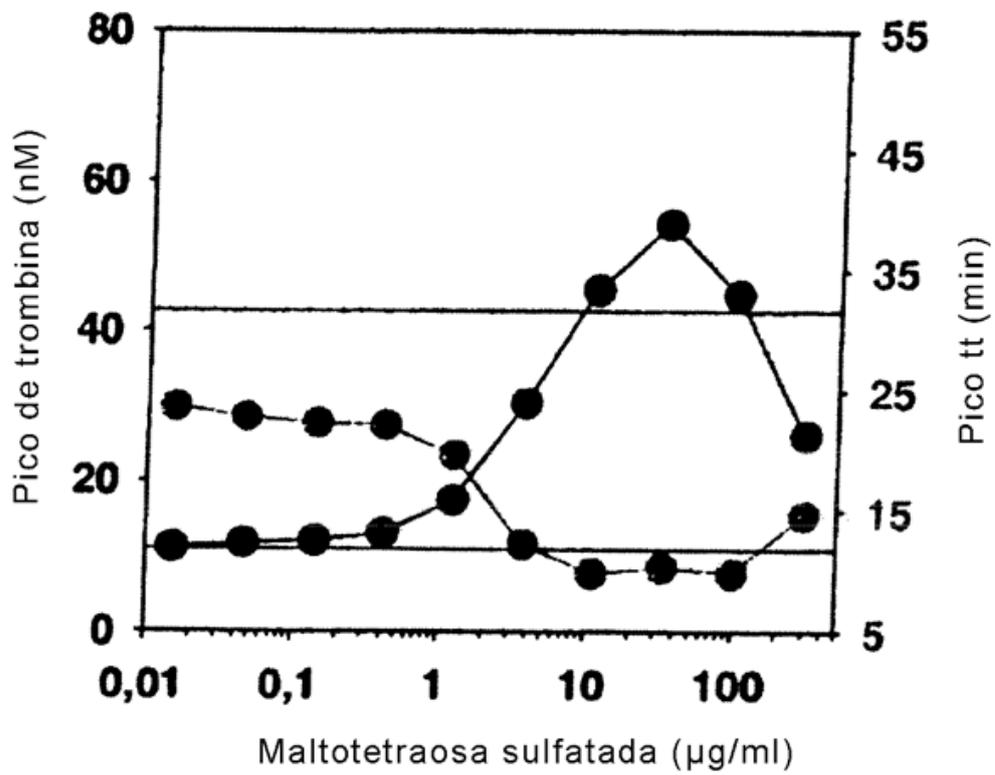
**FIG. 18**

Maltotriosa, 15,7% de S, ~61% de sulfatación, ~7 sulfatos



**FIG. 19**

Maltotetraosa, 13,8% de S, ~55% de sulfatación, ~8 sulfatos



**FIG. 20**

Maltopentaosa, 13,9% de S, ~56% de sulfatación, ~9 sulfatos

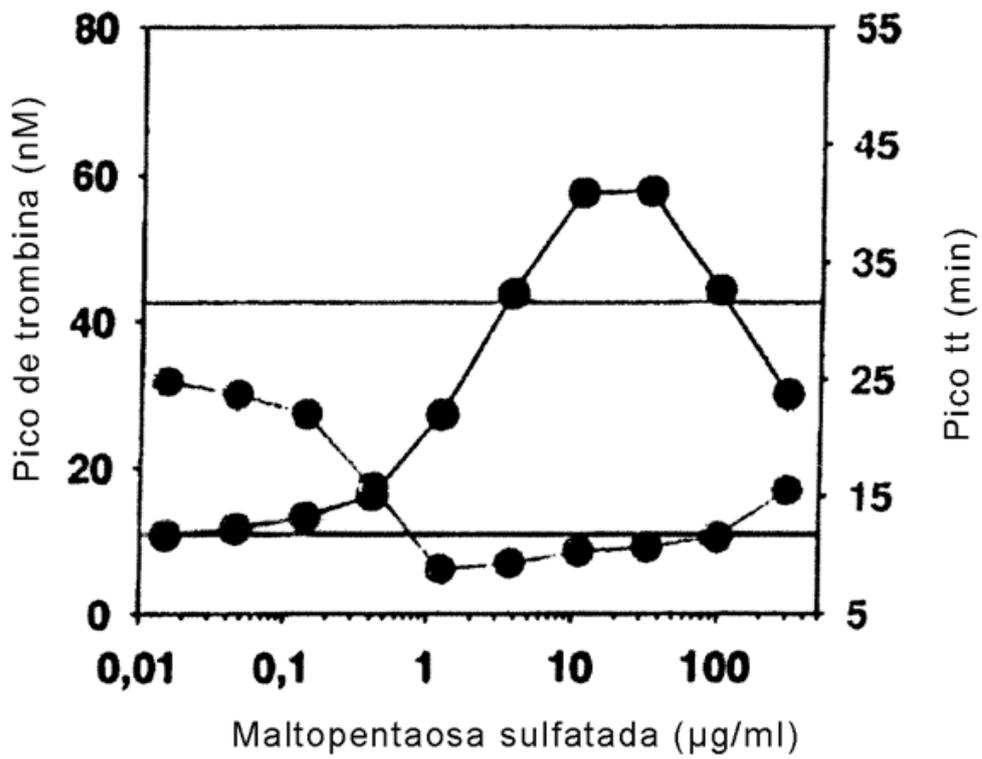


FIG. 21

Celotriosa, 12,8% de S, ~50% de sulfatación, ~5 sulfatos

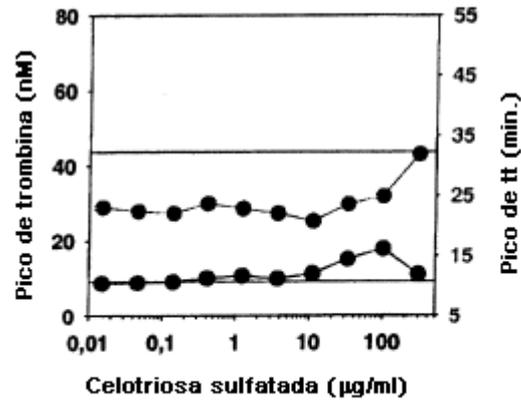


FIG. 22

Celotetraosa, 13% de S, ~51% de sulfatación, ~7 sulfatos

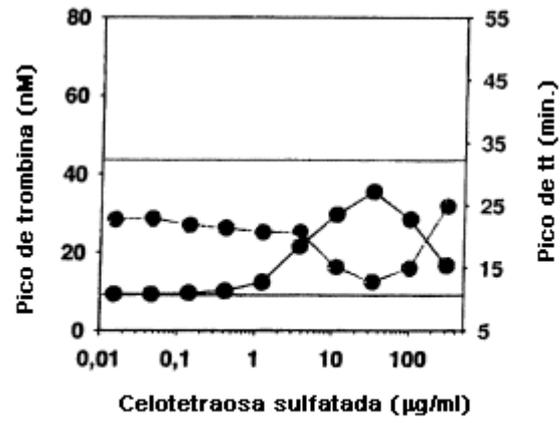


FIG. 23

Celopentaosa, 18% de S, ~72% de sulfatación, ~12 sulfatos

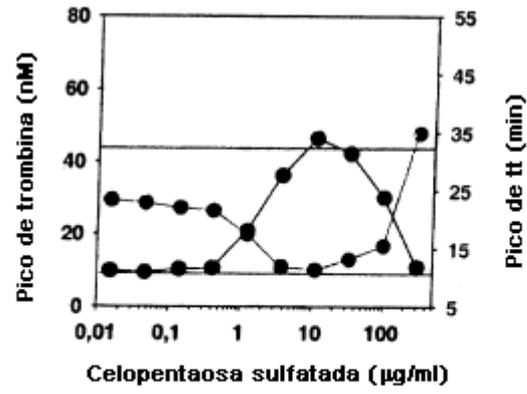


FIG. 24

Xilohexaosa, 13,9% de S, ~59% de sulfatación, ~8 sulfatos

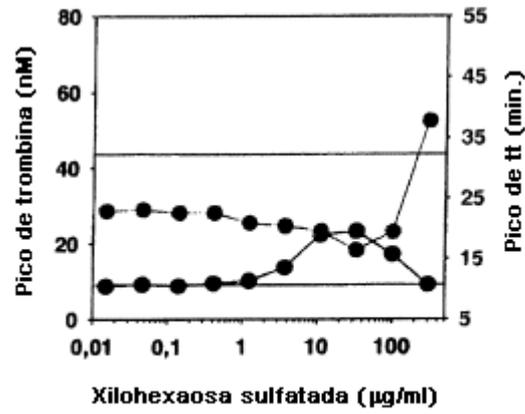


FIG. 25

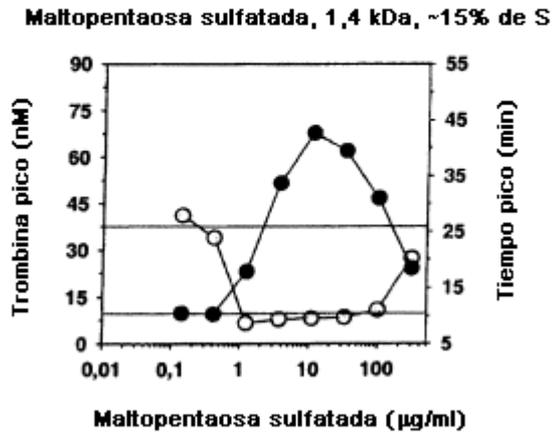


FIG. 26

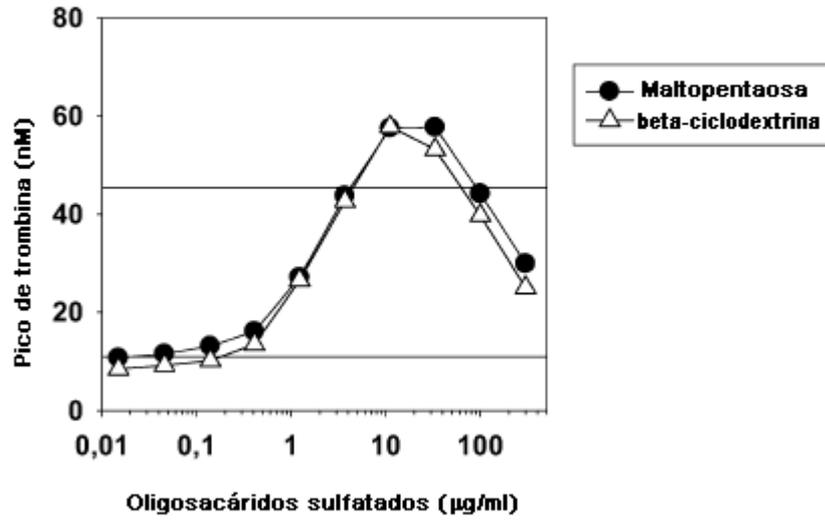


FIG. 27

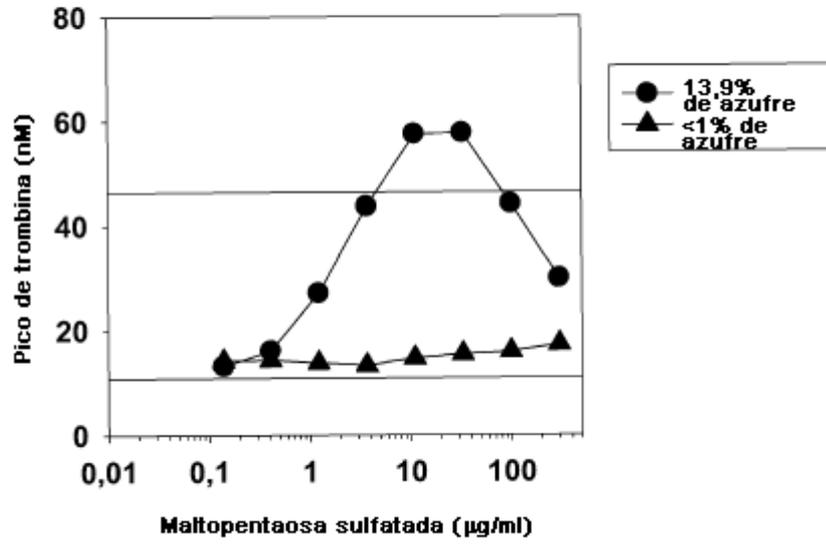


FIG. 28

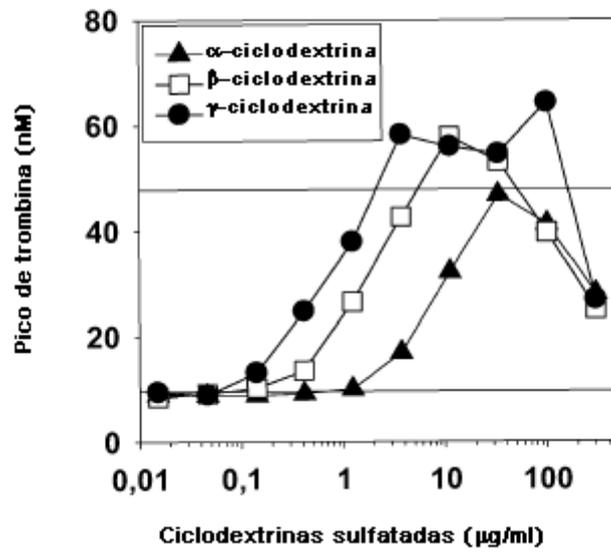
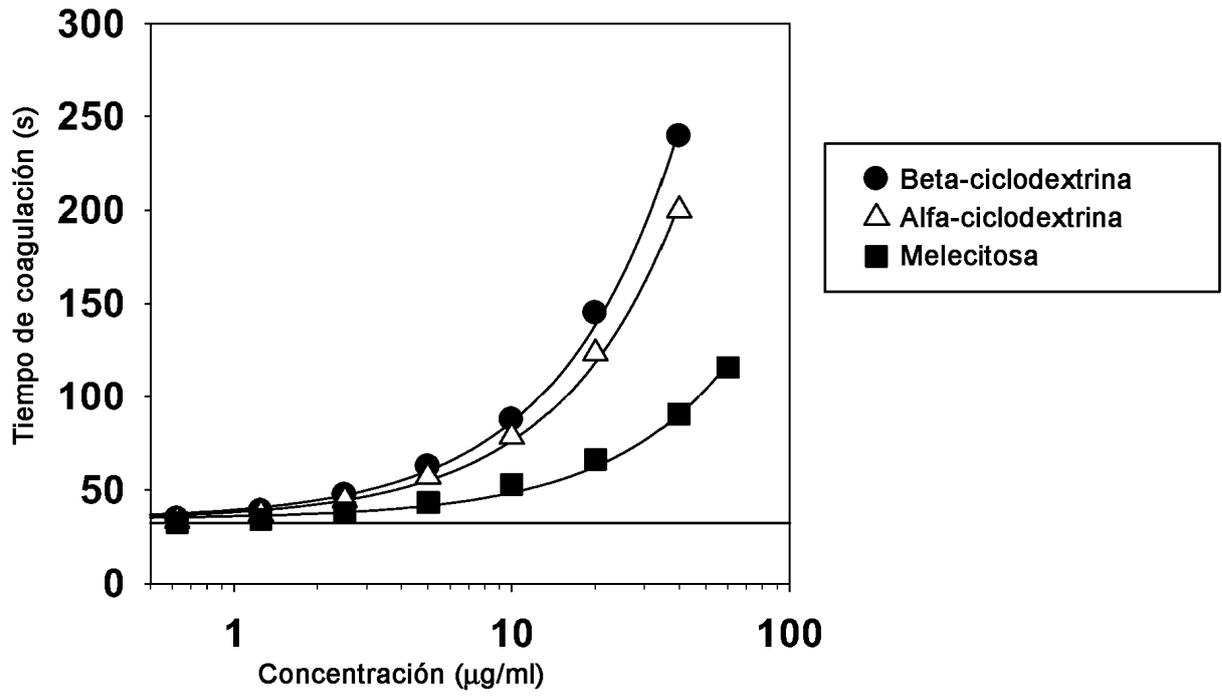
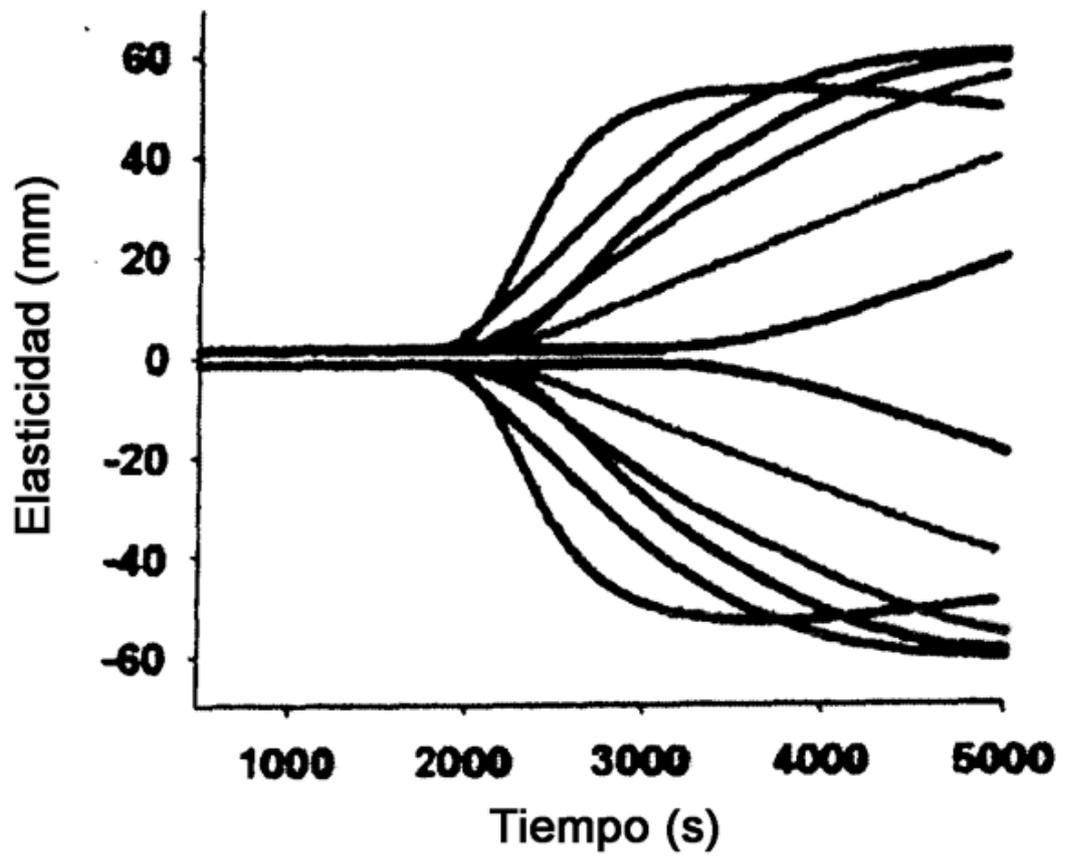


FIG. 29



**FIG. 30**

**Maltopentaosa sulfatada, ~15% de S**



**FIG. 31**

$\beta$ -ciclodextrina sulfatada, ~2,9 kDa, 18,9% de S

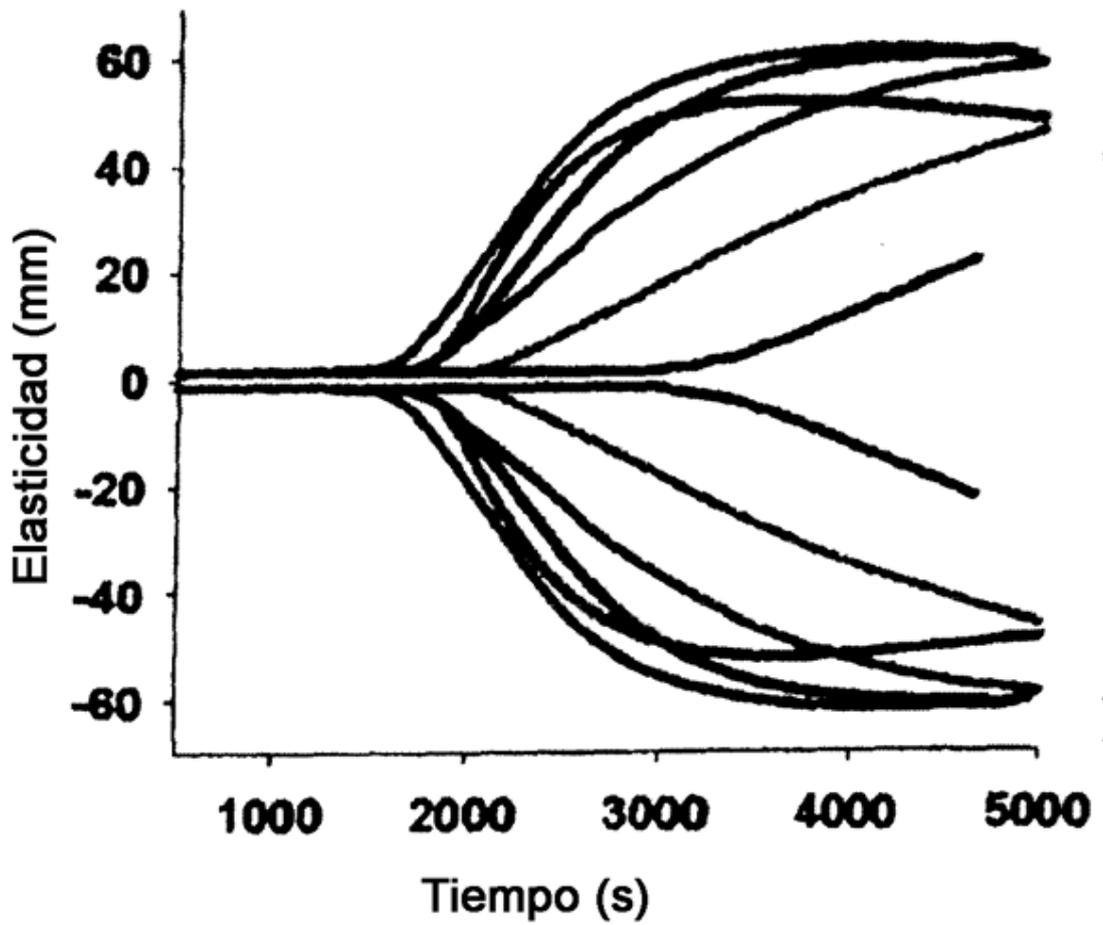


FIG. 32

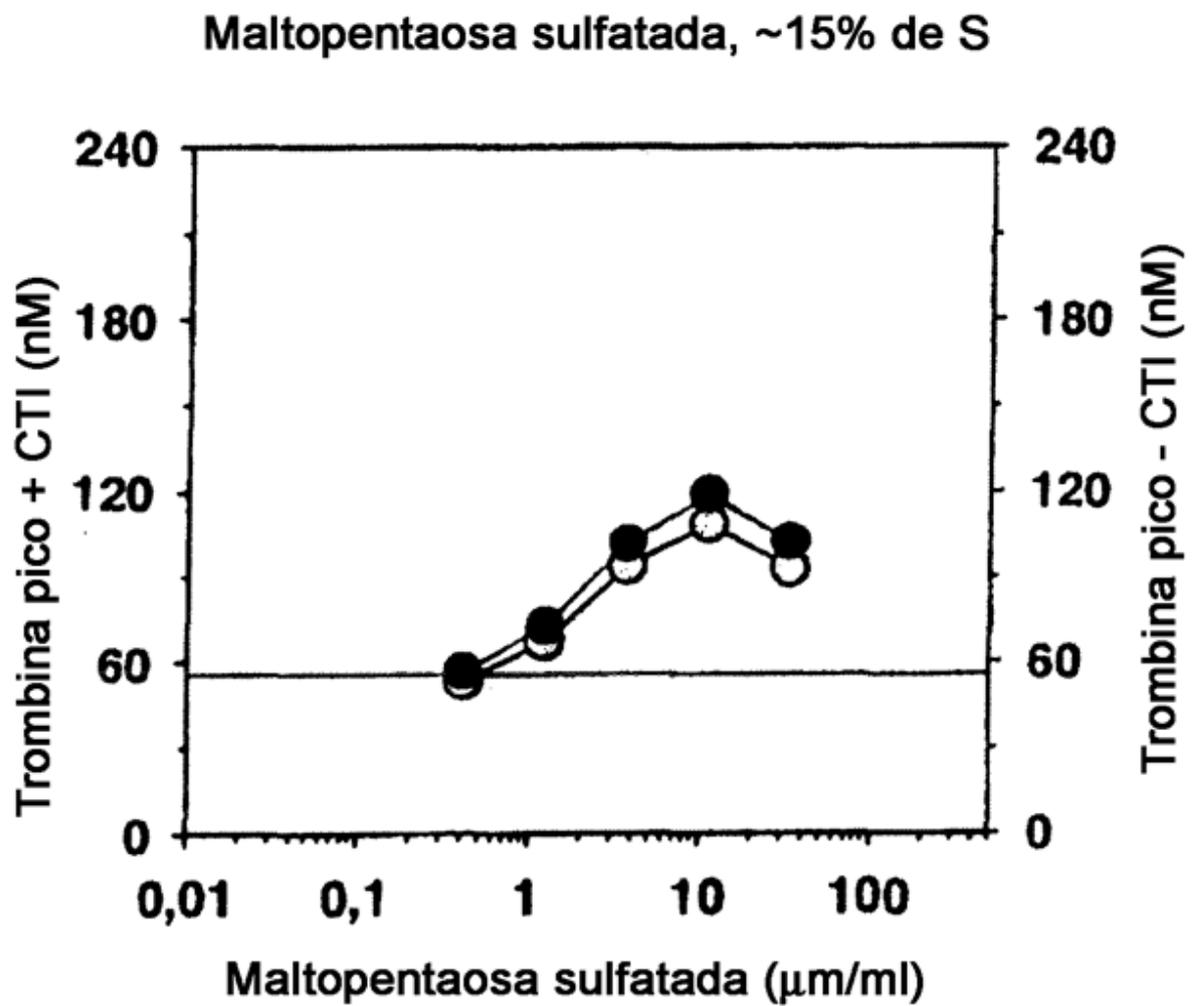


FIG. 33

$\beta$ -ciclodextrina sulfatada, ~2,9 kDa, 18,9% de S

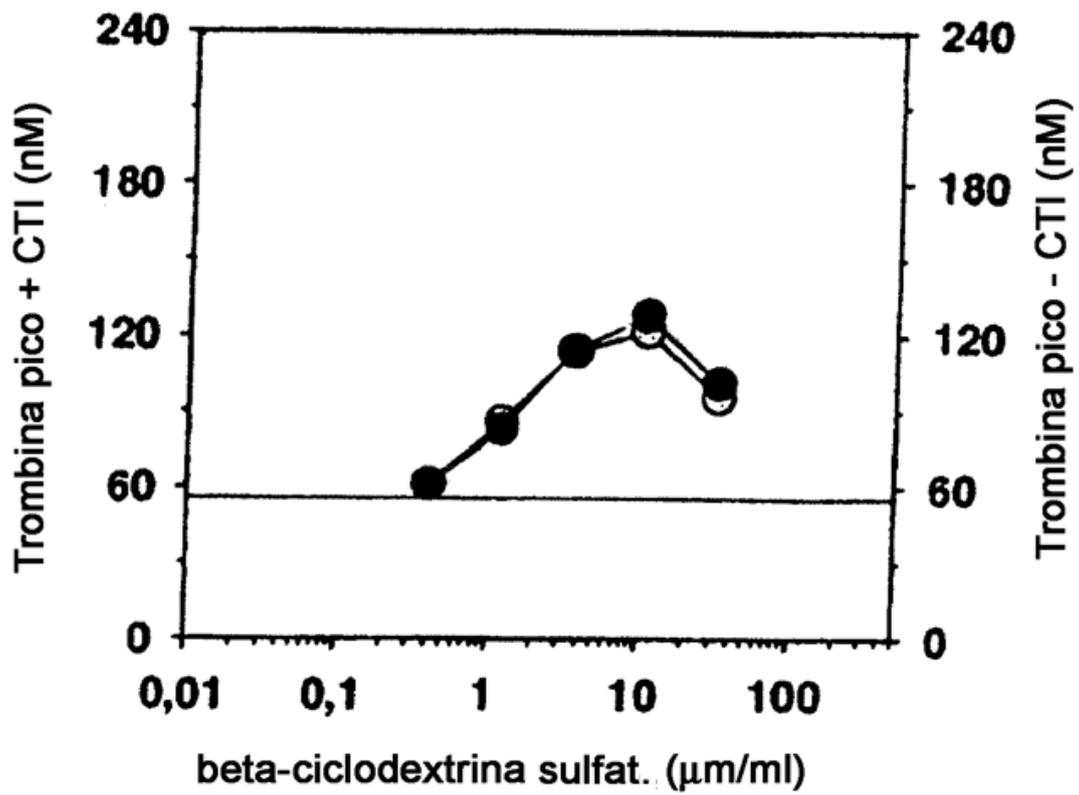


FIG. 34

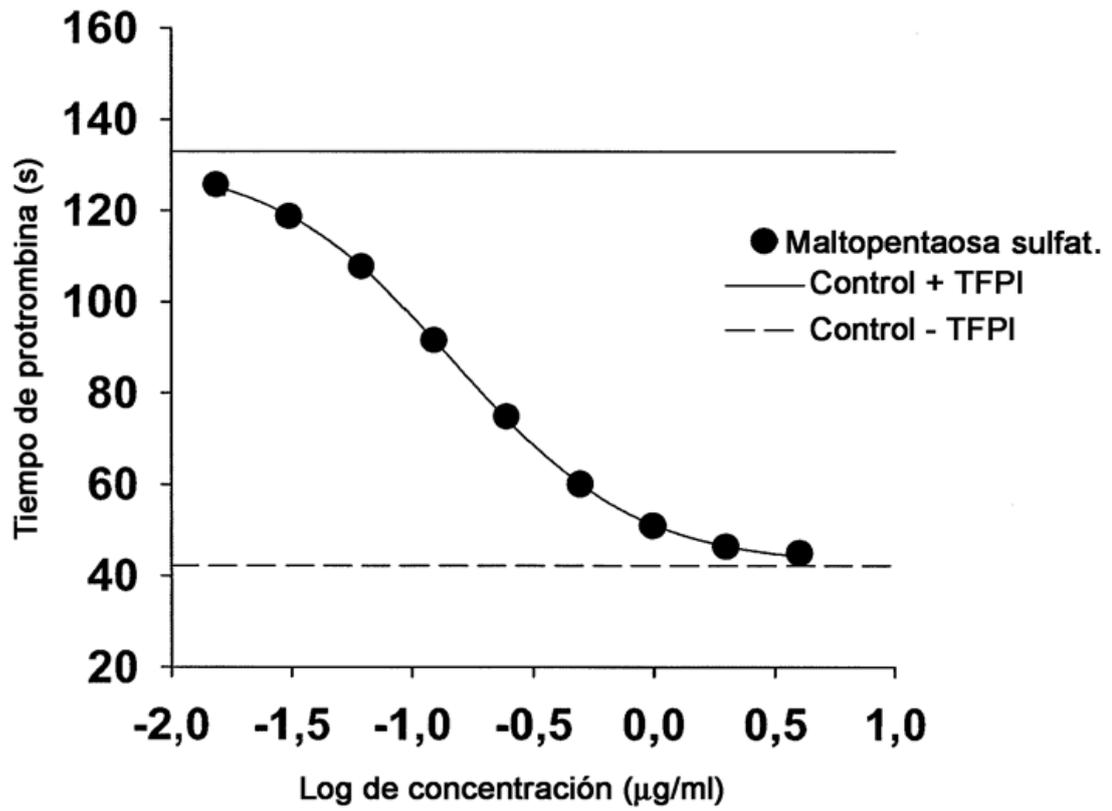


FIG. 35

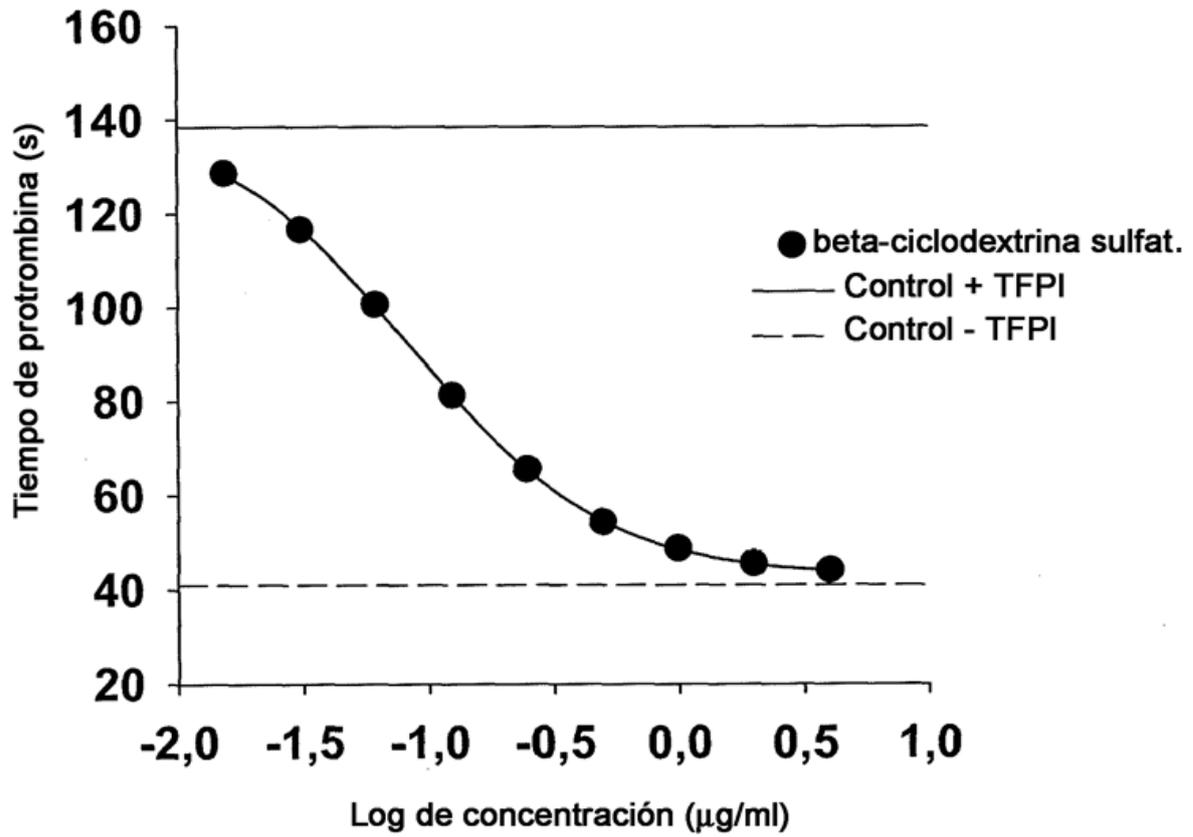
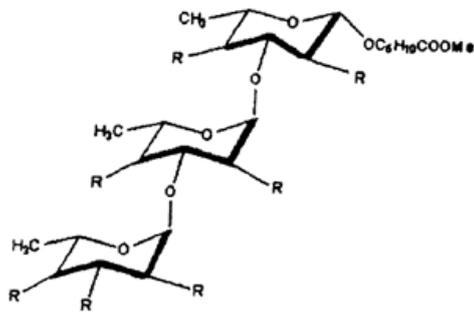


FIG. 36

*todo*- $\alpha$ -(1->3)-trisacárido



R = -OH o -OSO<sub>3</sub>Na

$\alpha$ -(1->3), $\alpha$ -(1->4)-pentasacárido

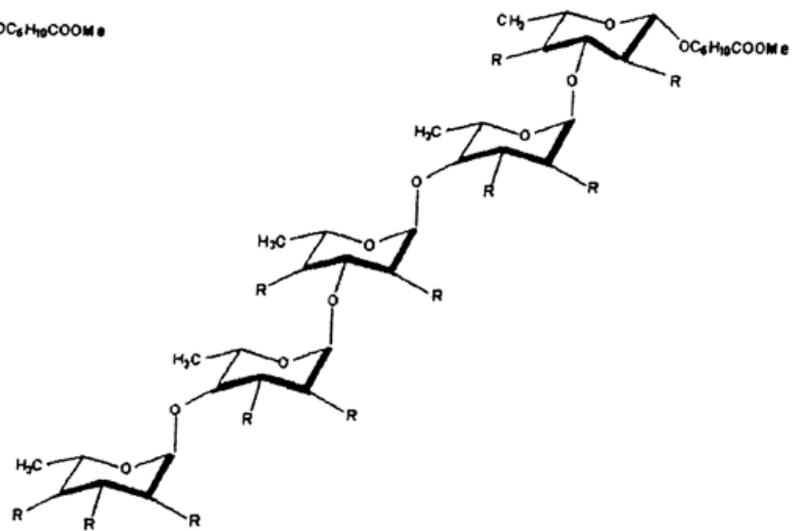
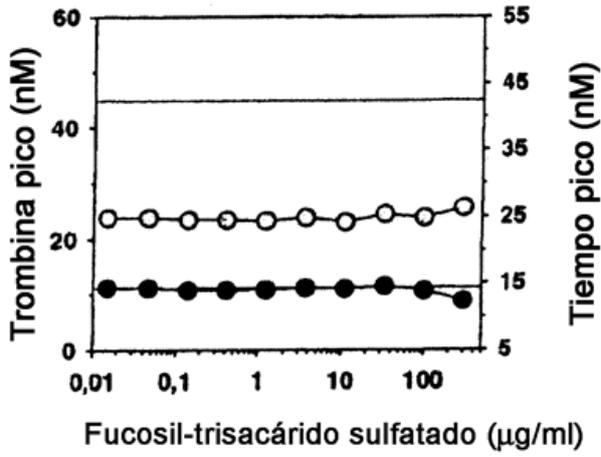
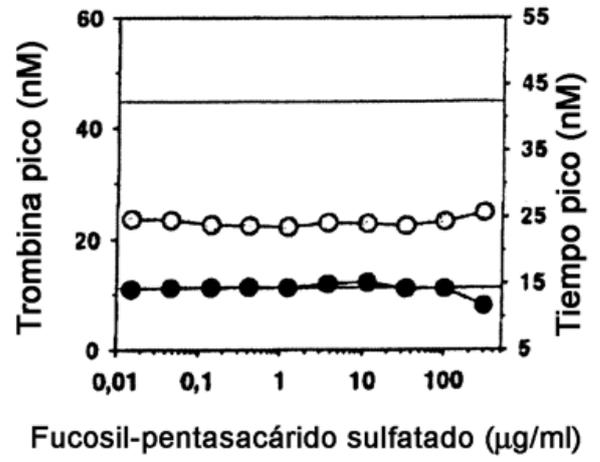


FIG. 37

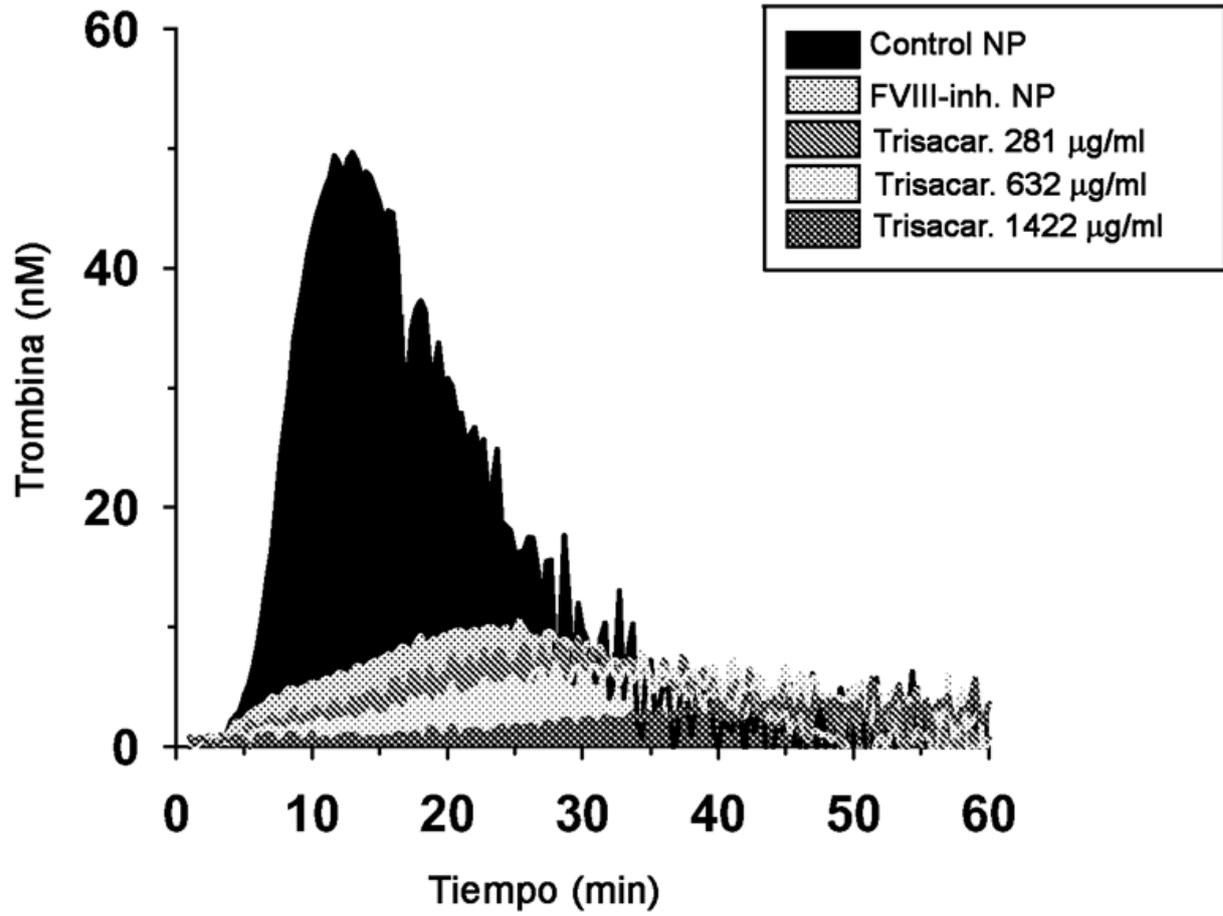
*todo*- $\alpha$ -(1- $\rightarrow$ 3)-trisacárido



$\alpha$ -(1- $\rightarrow$ 3), $\alpha$ -(1- $\rightarrow$ 4)-pentasacárido



**FIG. 38A**



**FIG. 38B**

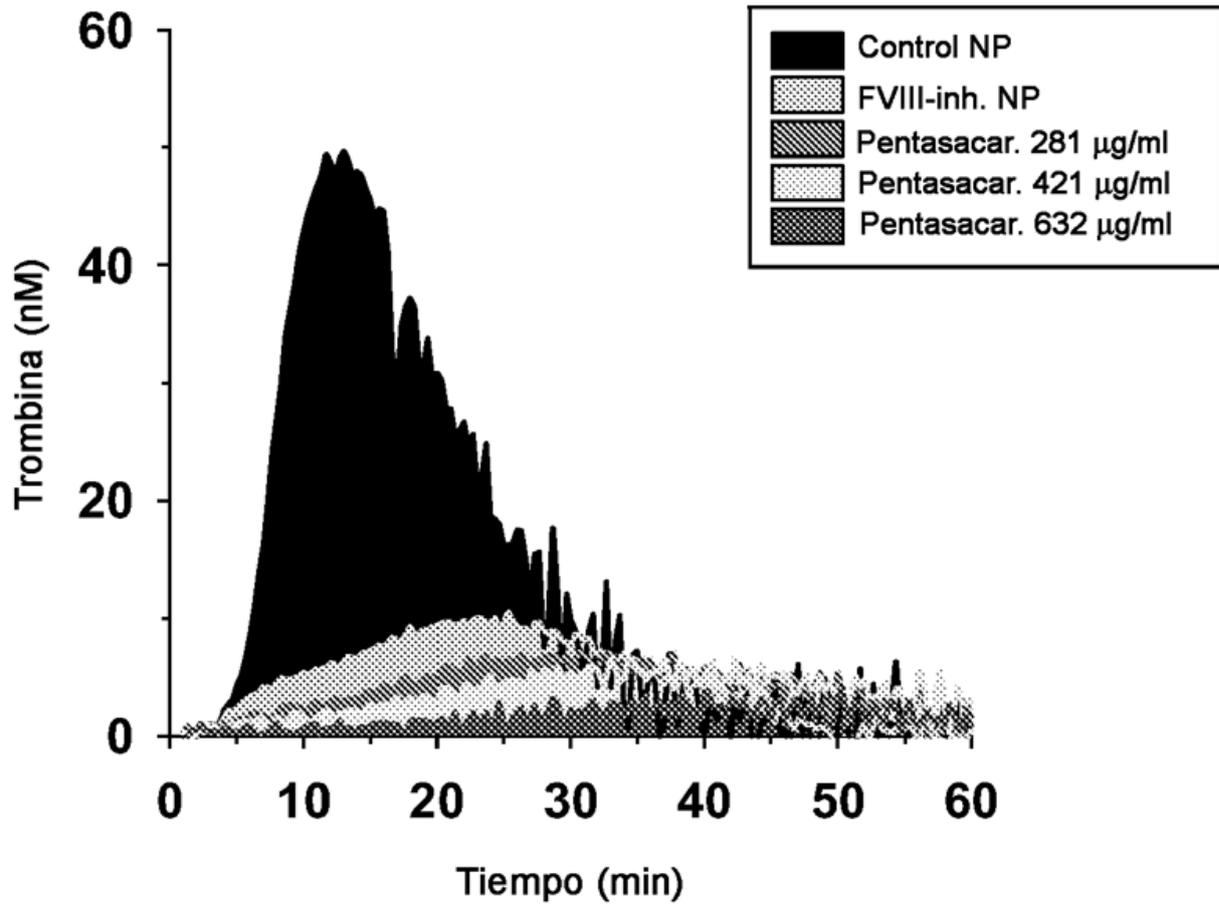
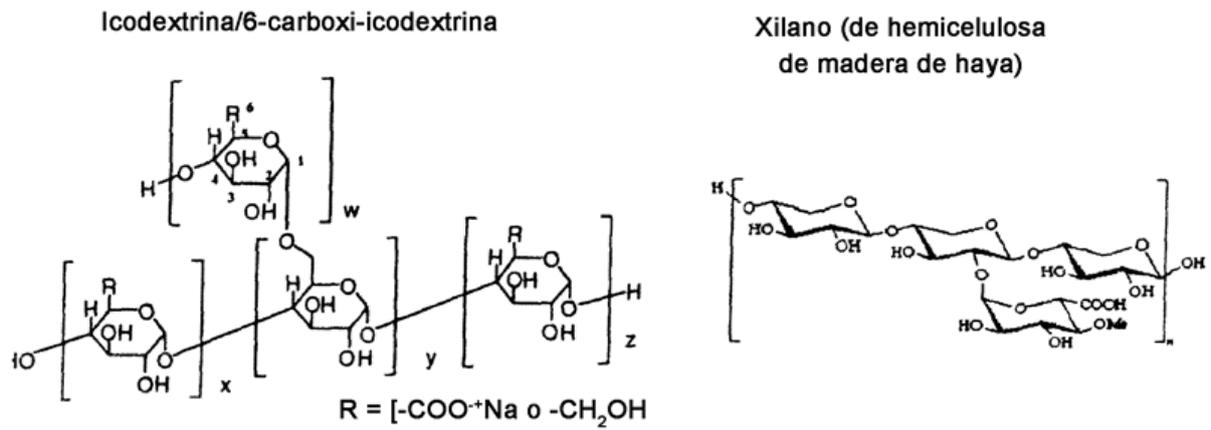


FIG. 39



- Polímero de glucosa soluble en agua, derivado de almidón, unido mediante enlaces glicosídicos alfa-(1->4) y menos del 10% de alfa-(1->6)
- Polímero de D-xilosa unido mediante enlaces glicosídicos alfa-(1->4), parcialmente ramificado

**FIG. 40**

Xilano sulfatado, 22,2 KDa; 14,7% de S

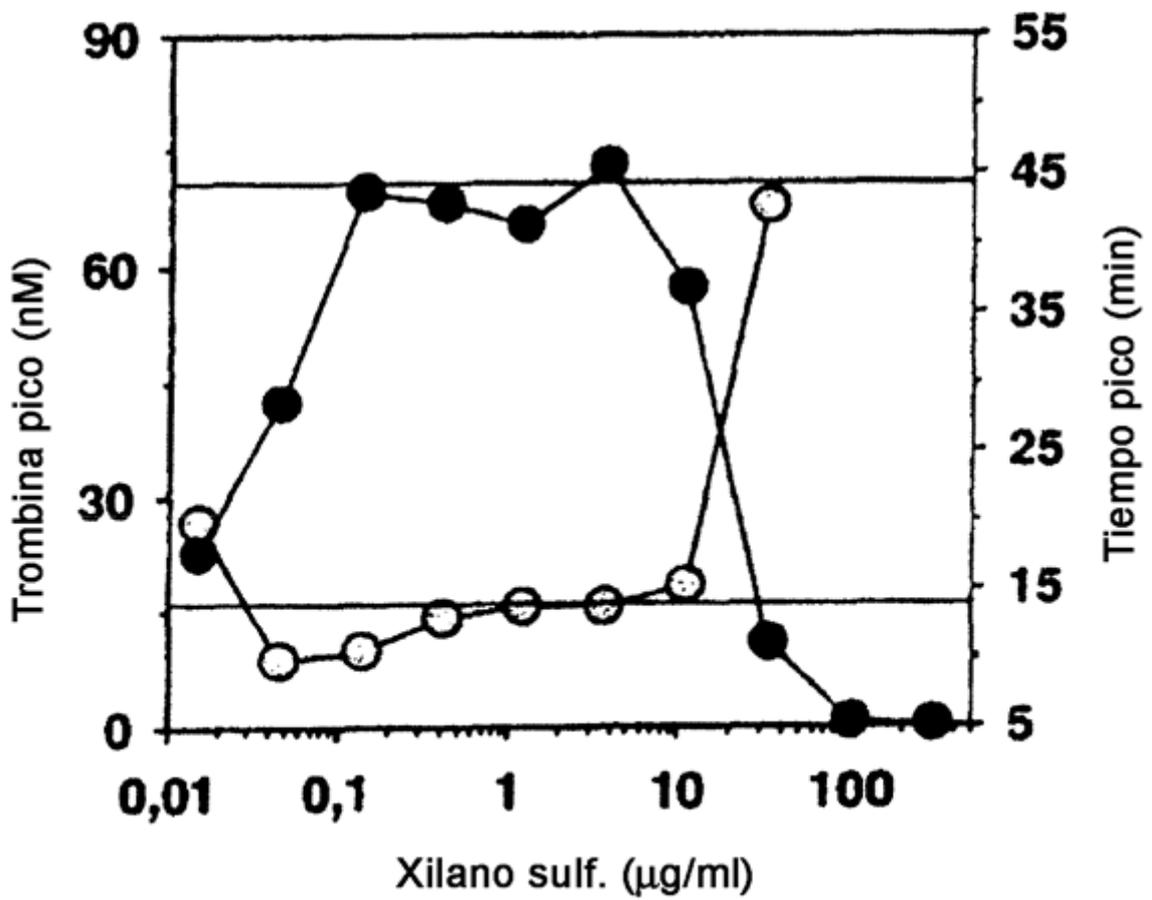


FIG. 41

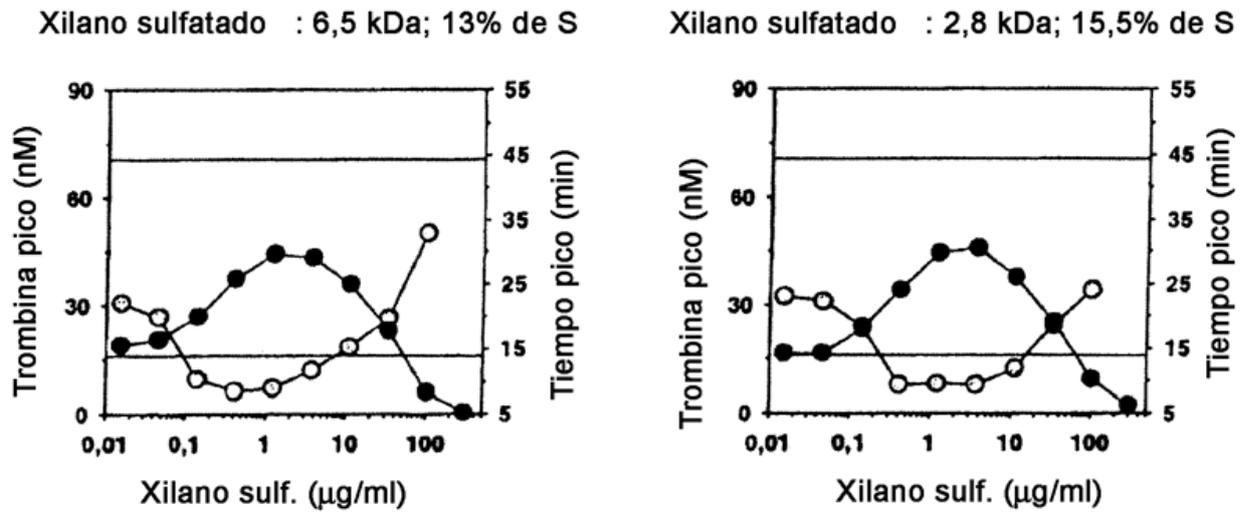
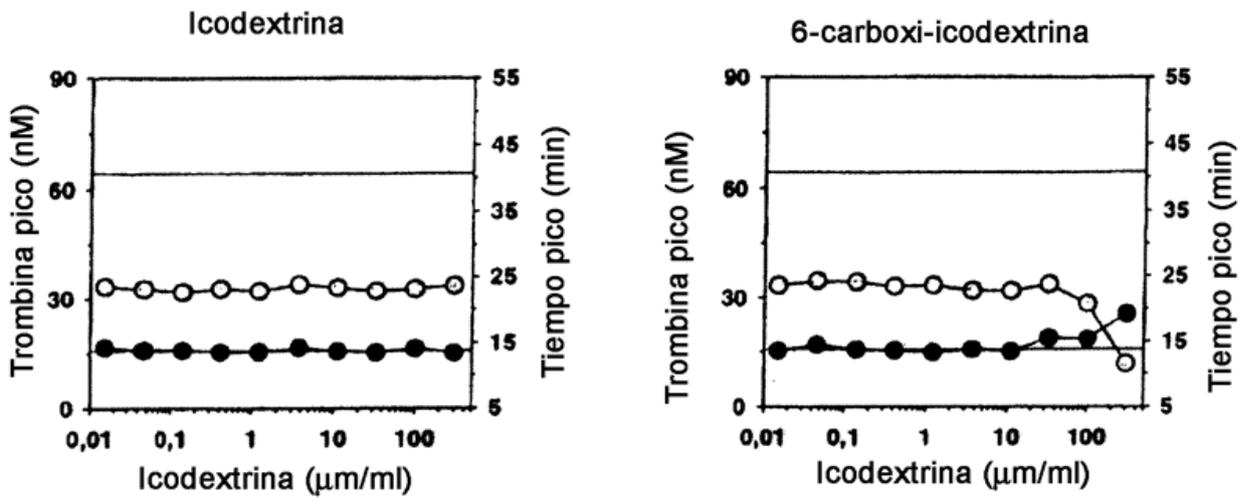
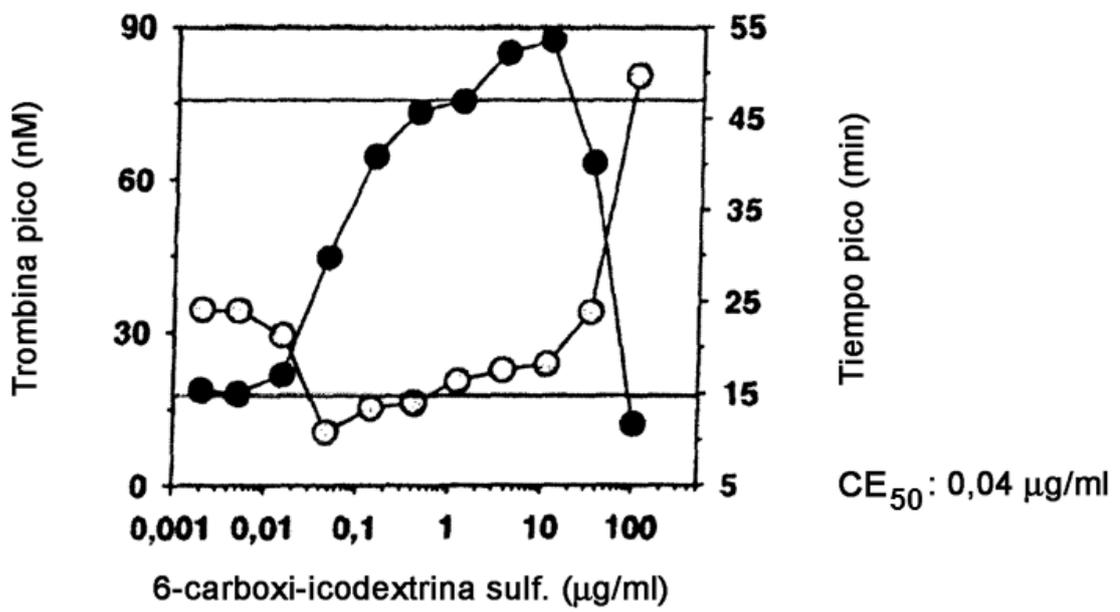


FIG. 42



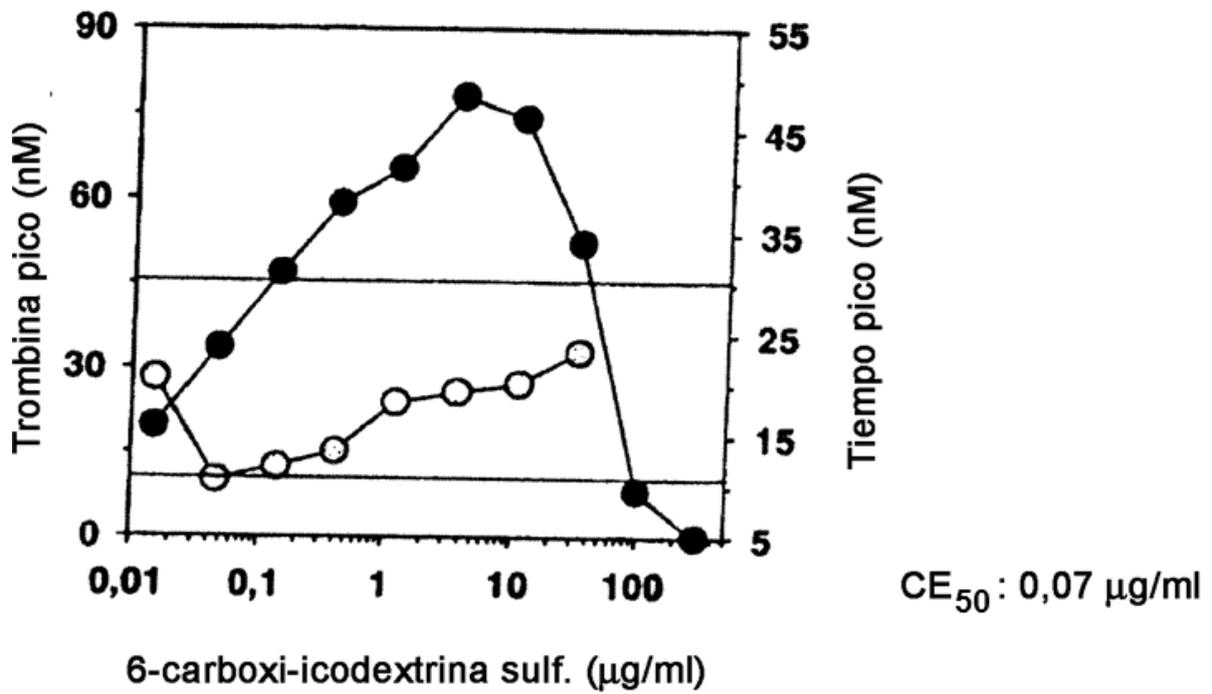
**FIG. 43**

6-carboxi-icodextrina sulfatada, ~21,6 kDa, 10,6% de S



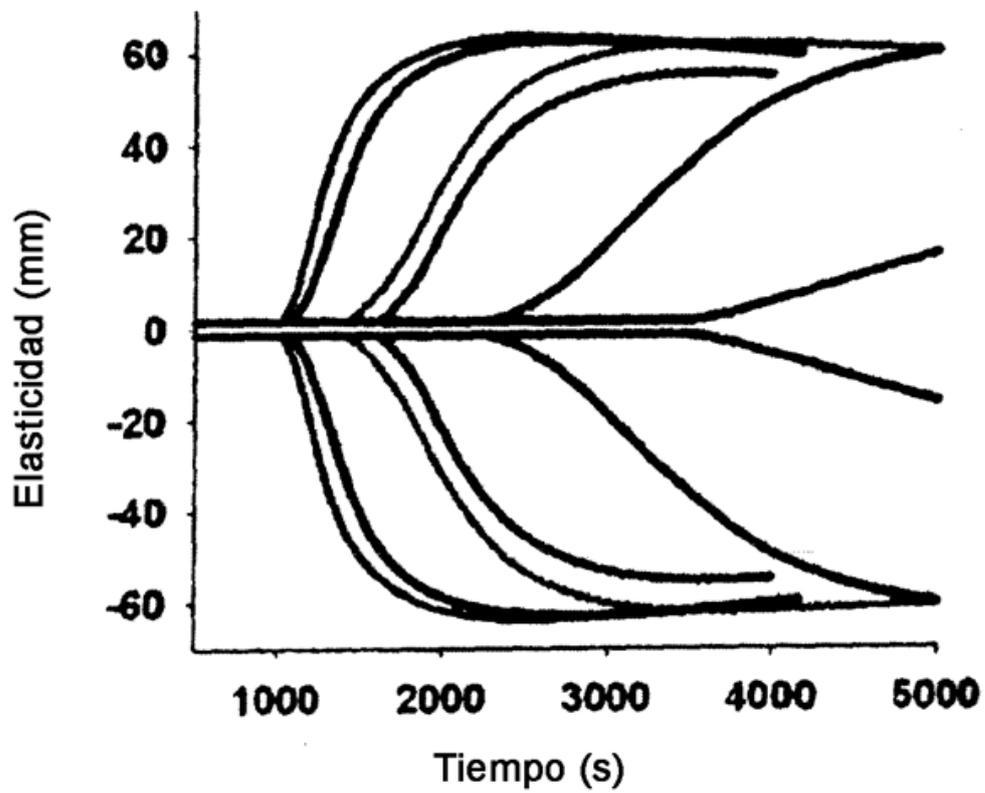
**FIG. 44**

6-carboxi-icodextrina sulfatada, ~35,5 kDa, 10,1% de S



**FIG. 45**

6-carboxi-icodextrina sulfatada, ~35,5 kDa, 10,1% de S



**FIG. 46**

6-carboxi-icodextrina sulfatada, ~35,5 kDa, 10,1% de S

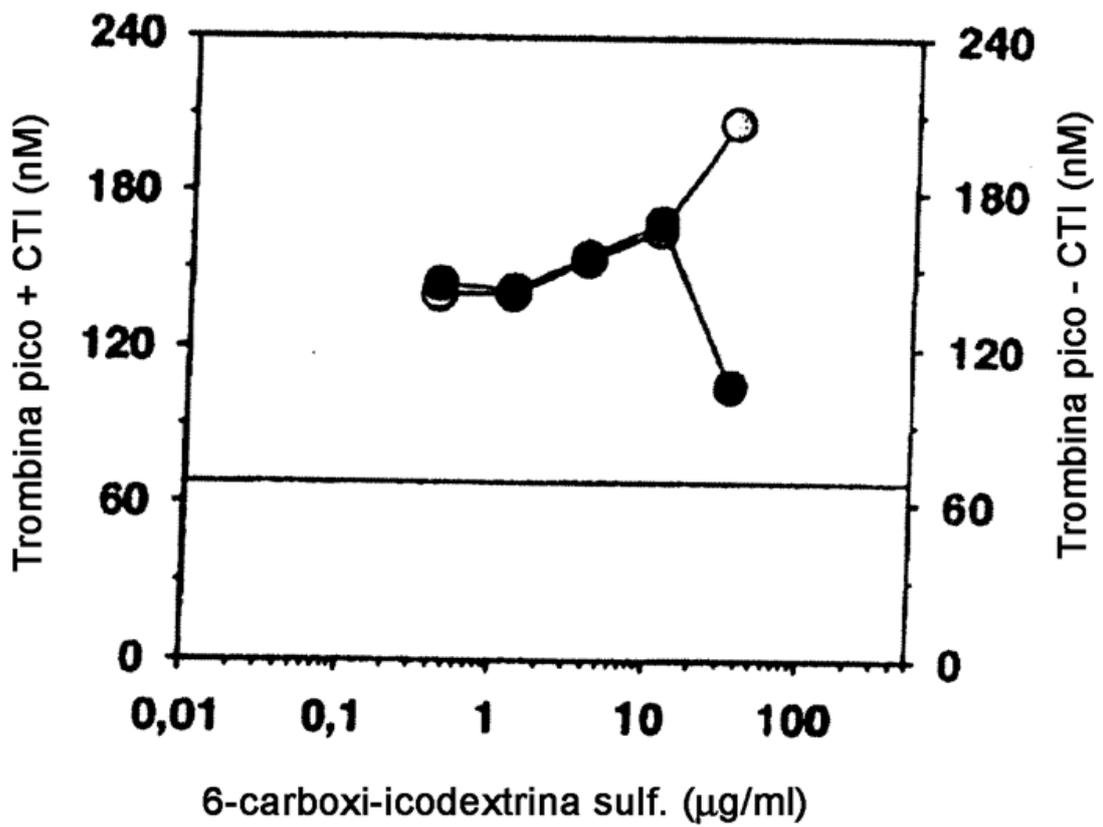


FIG. 47

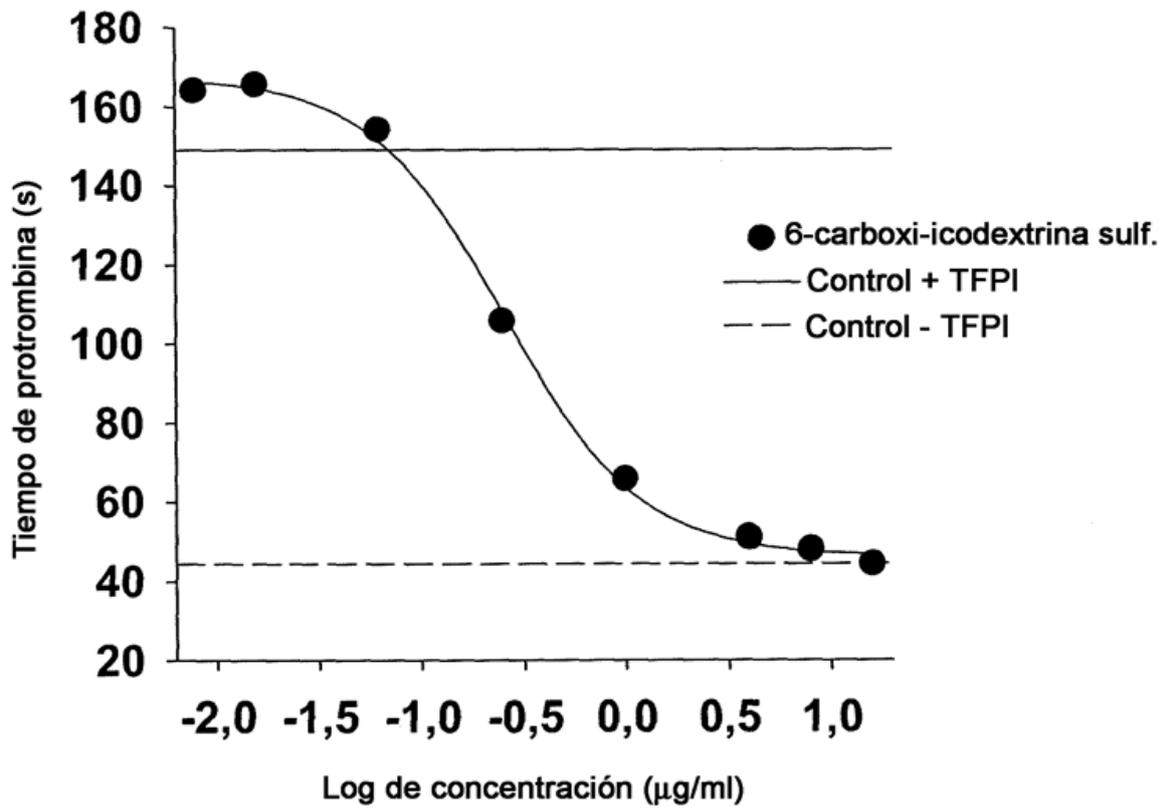


FIG. 48

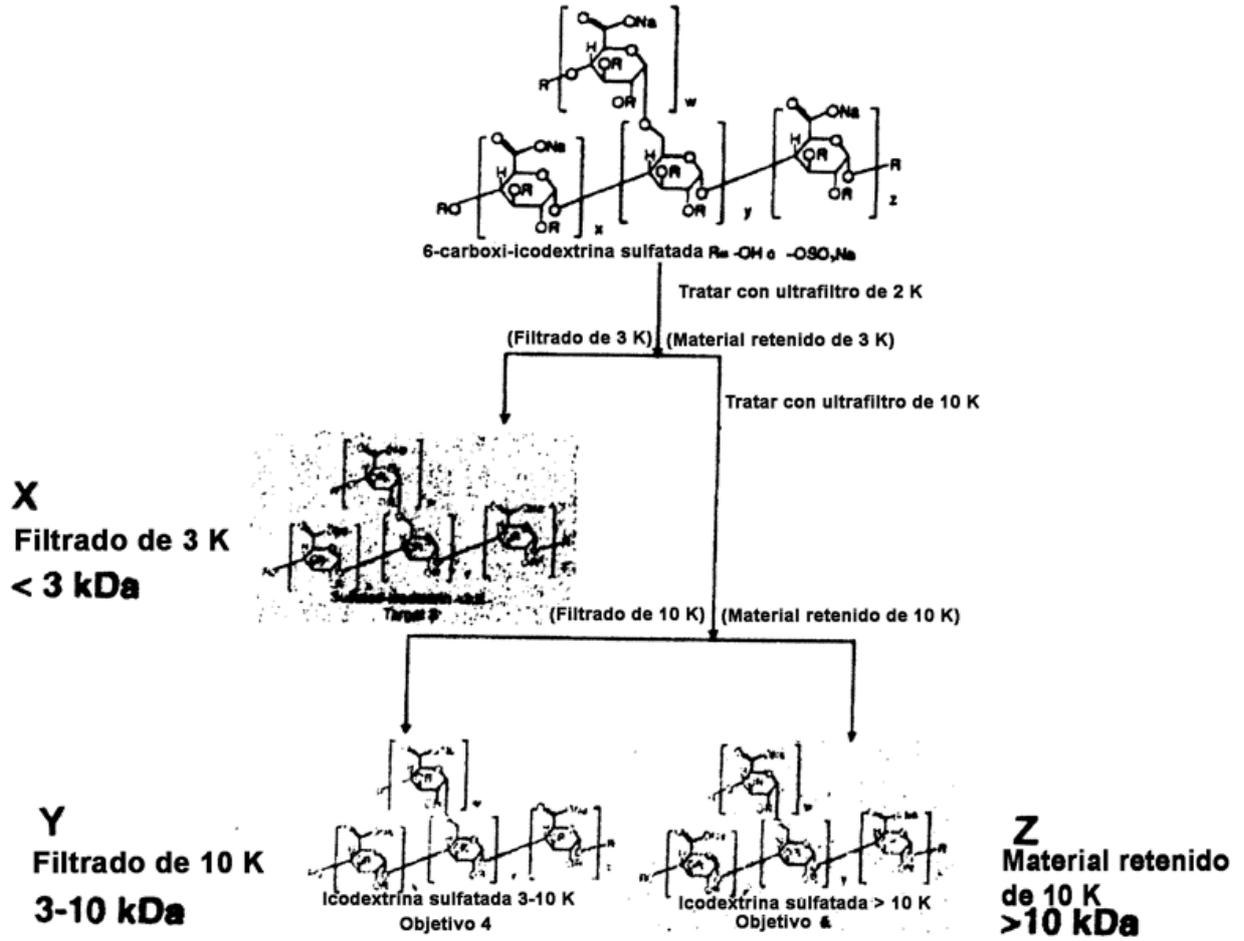


FIG. 49

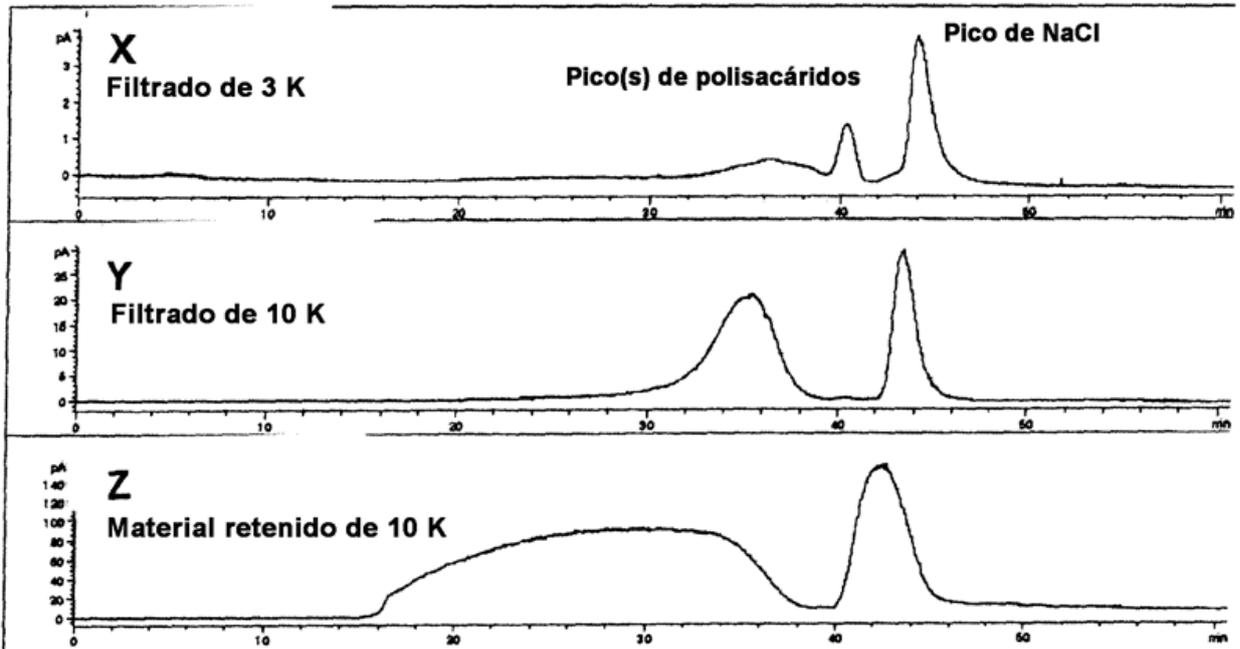
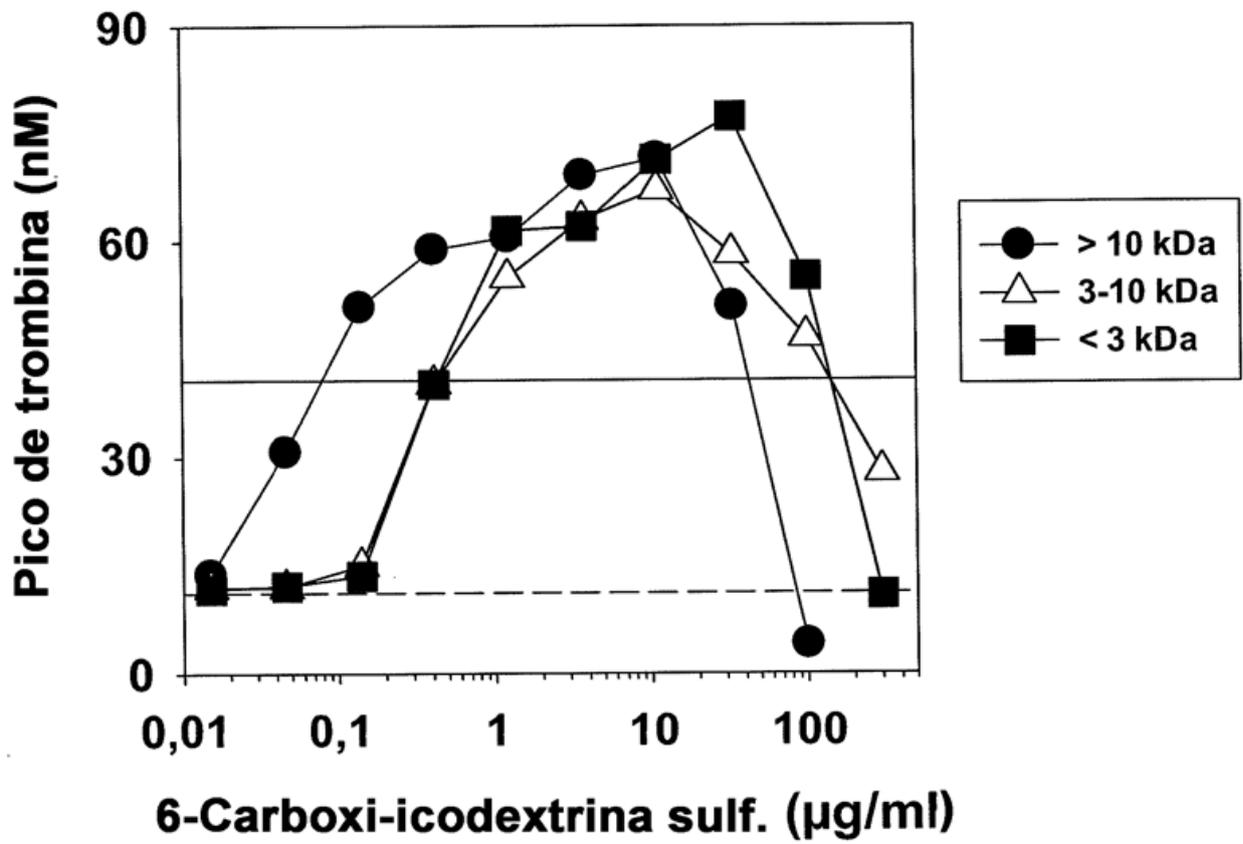
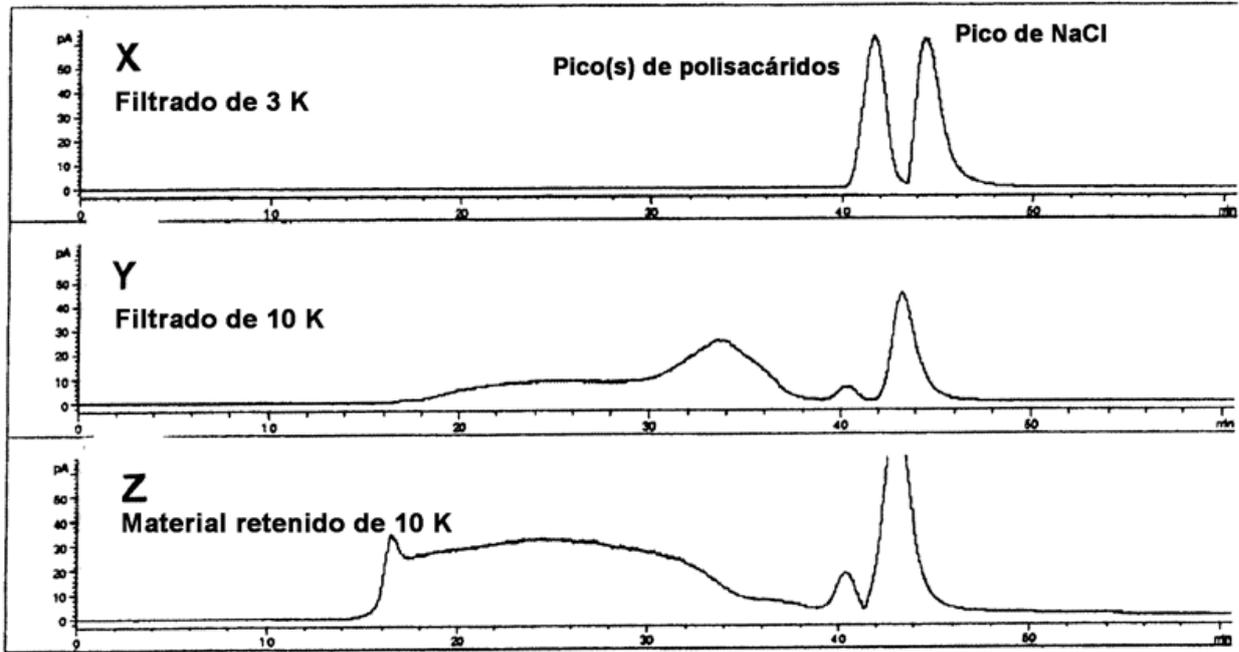


FIG. 50



**FIG. 51**



**FIG. 52**

Sustancia	Aumento del 50%	CE <sub>50</sub>	Razón aPTT/CAT
	Tiempo de coagulación µg/ml	µg/ml	
control	7.0	0.3	23.3
6-carboxi-icodextrina	4.0	0.1	40.0
6-carboxi-icodextrina >10K	3.5	0.1	35.0
6-carboxi-icodextrina 3-10K	6.1	0.4	15.3
6-carboxi-icodextrina <3K	9.3	0.4	23.3

FIG. 53

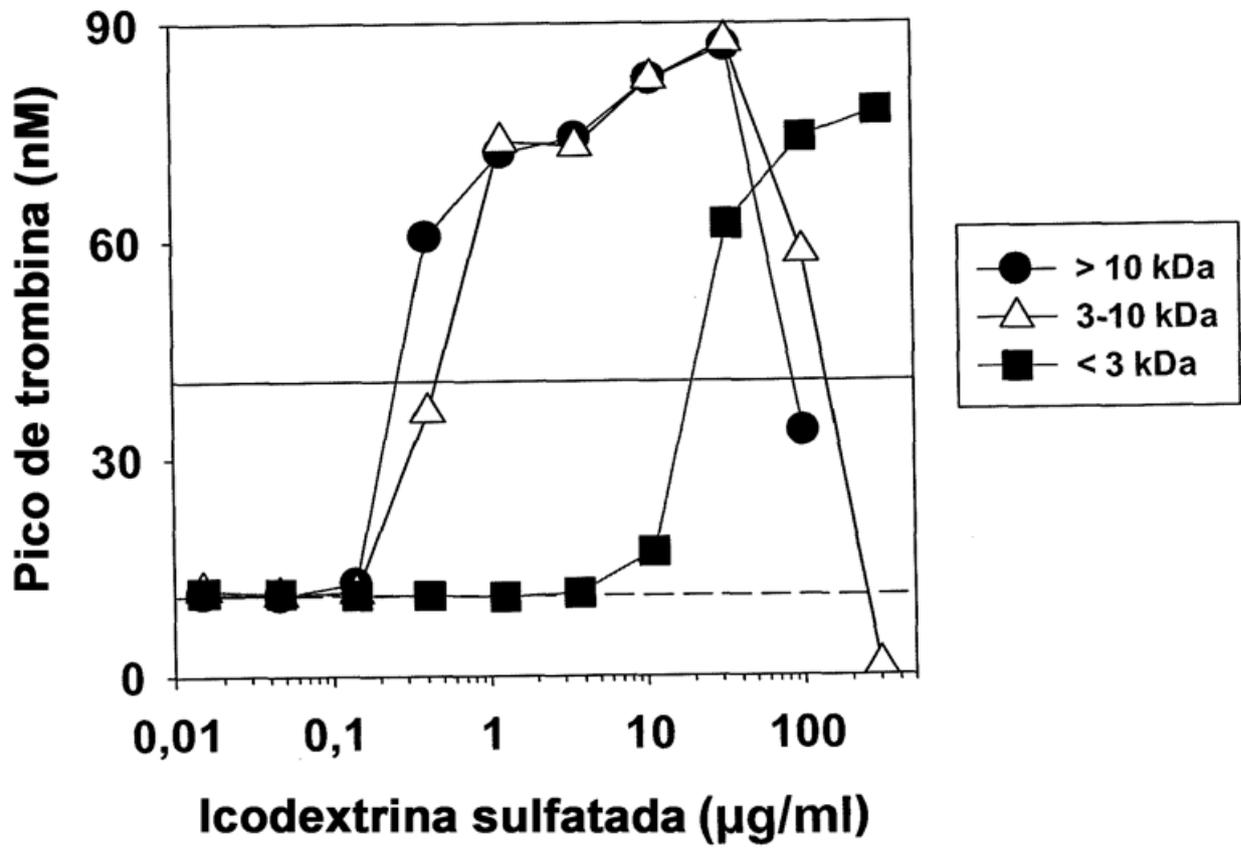
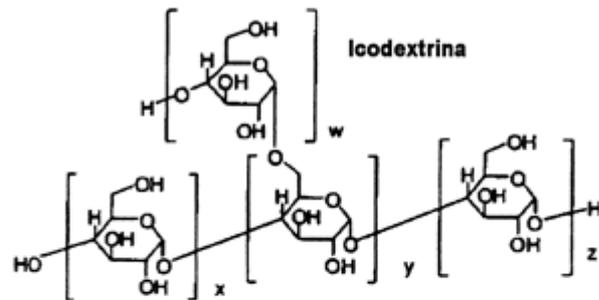


FIG. 54

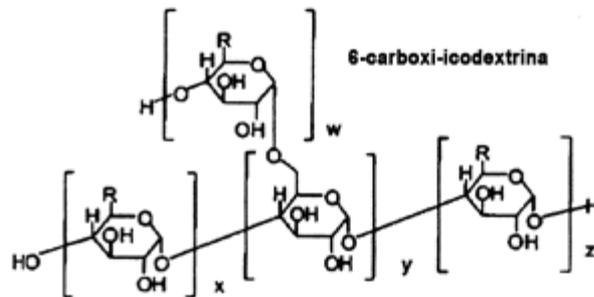
<b>Sustancia sulfatada</b>	<b>CE<sub>50</sub> μg/ml</b>
<b>Maltotriosa</b>	<b>20.6</b>
<b>Maltotetraosa</b>	<b>5.0</b>
<b>Maltopentaosa</b>	<b>2.1</b>
<b>Celotriosa</b>	<b>30.9</b>
<b>Celotetraosa</b>	<b>4.8</b>
<b>Celopentaosa</b>	<b>1.9</b>

<b>Sustancia sulfatada</b>	<b>CE<sub>50</sub> μg/ml</b>
<b>α-Ciclodextrina (Sigma)</b>	<b>7.4</b>
<b>β-Ciclodextrina (Sigma)</b>	<b>1.8</b>
<b>γ-Ciclodextrina (TR)</b>	<b>0.8</b>

FIG. 55

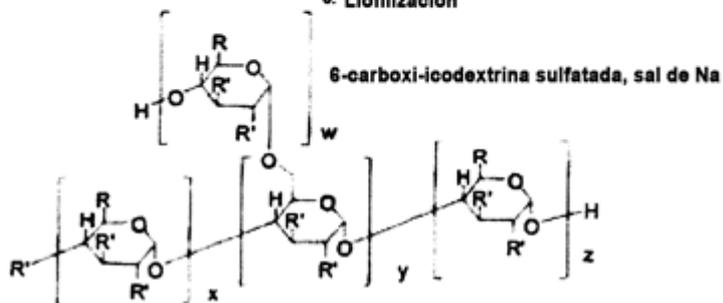


1. TEMPO/NaOCl/NaBr, pH 10.7-10.8, 0-5 C
2. Reducir con borohidruro de sodio
3. Ajustar el pH a 7,4
4. UF tangencial frente a agua, MWCO de 1.000
5. Liofilizar



R = -COOH o -CH<sub>2</sub>OH

1. Formar la sal de TFA
2. SO<sub>3</sub>/piridina
3. Extinguir con agua  
concentrar  
ultrafiltrar  
dializar
4. Intercambio iónico ácido  
en agua
5. NaOH 1 N  
o Ca(OH)<sub>2</sub> 0,01 N
6. Liofilización



R = [-COO<sup>-</sup>Na] o -CH<sub>2</sub>OH

R' = [-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na] o -OH

FIG. 56

<b>NASP</b>	<b>Ventana terapéutica <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>Conc. óptima <math>\mu\text{g/ml}</math></b>
Un xilano sulf. (22kDa)	<b>0.02-11</b>	<b>0.15-3.7</b>
Xilano sulf. (? kDa)	<b>0.1-33</b>	<b>1.23-11.1</b>
Xilano sulf. (29, 2 kDa)	<b>0.1-33</b>	<b>1.23-11.1</b>
Xilano sulf. (30, 4 kDa)	<b>0.1-33</b>	<b>1.23-11.1</b>
Xilano sulf. (24, 1 kDa)	<b>0.1-33</b>	<b>1.23-11.1</b>
Xilano sulf. (24, 9 kDa)	<b>0.1-33</b>	<b>1.23-11.1</b>
Control	<b>0.1-20</b>	<b>1.23-3.7</b>
Xilano sulf. (2, 8 kDa)	<b>0.1-30</b>	<b>1.23-3.7</b>

FIG. 57

**Xilanos sulfatados**

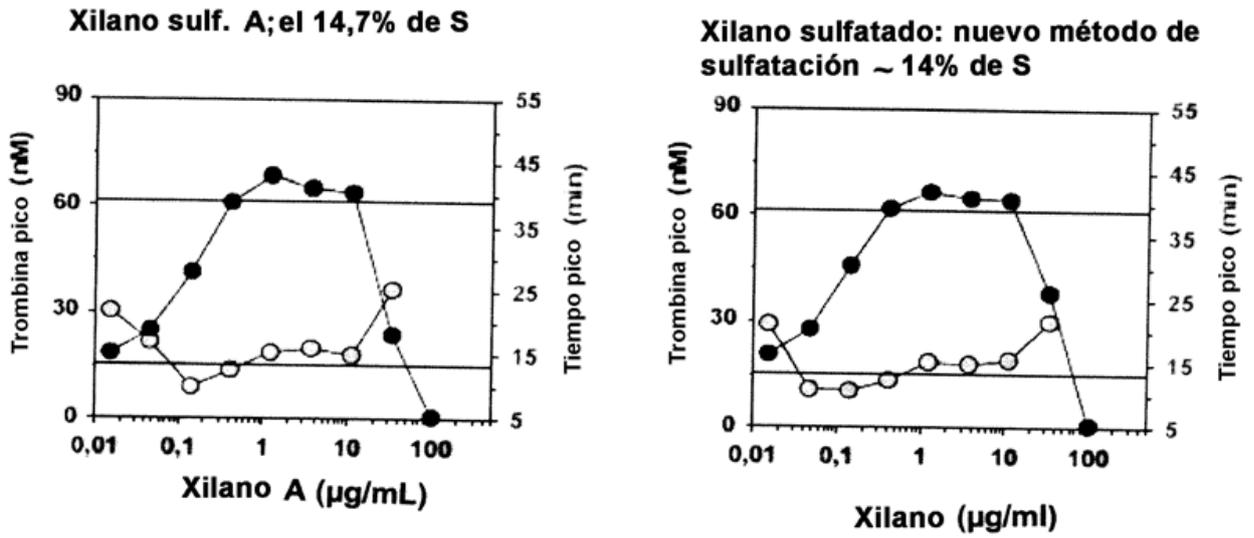
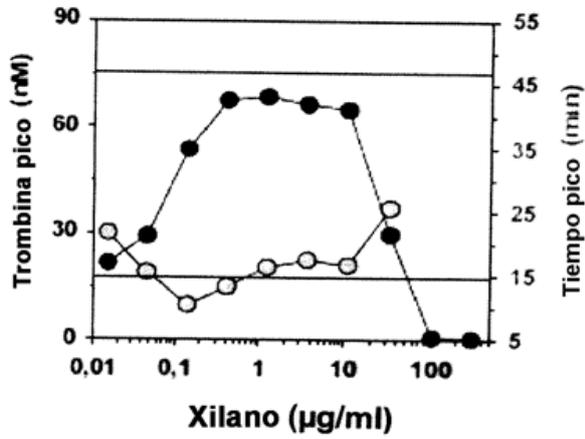


FIG. 58

**Xilanos sulfatados**

**Xilano sulfatado: sulfatación a 50°C durante 24 h: el 14,4% de S**



**Xilano sulfatado: sulfatación a 50°C durante 48 h: el 15,1% de S**

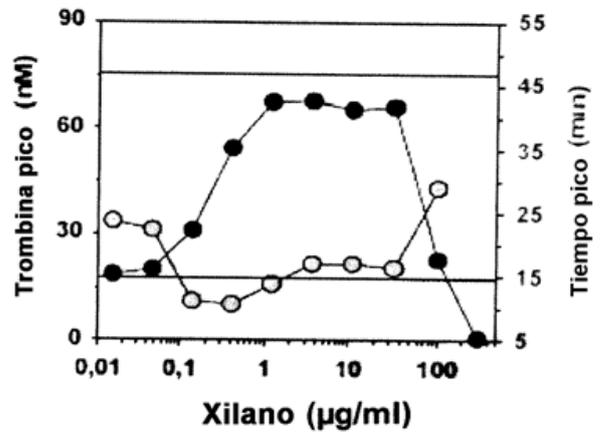


FIG. 59

**Xilanos sulfatados**

**Xilano sulfatado: sulfatación a 50°C durante 72 h: el 14,5% de S**

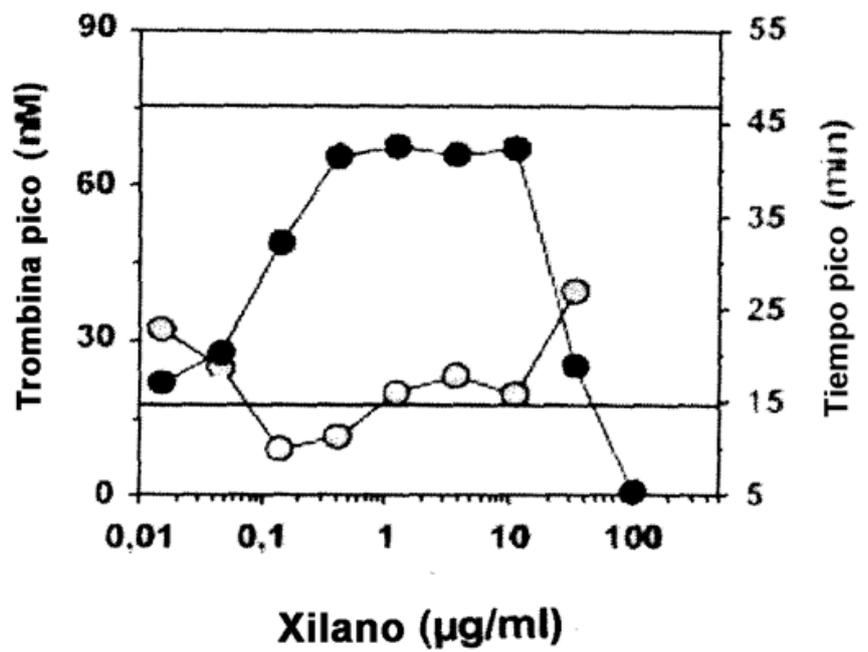


FIG. 60

**6-Carboxi-icodextrina sulfatada**

6-Carboxi-icodextrina sulfatada: ~ 11% de S

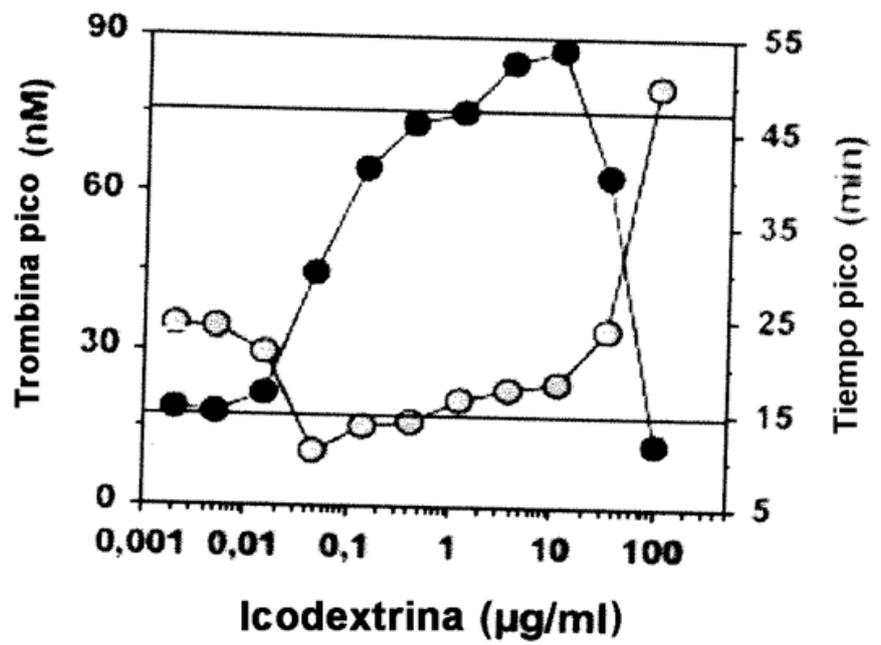


FIG. 61

**Xilanos sulfatados y 6-carboxi-icodextrina**

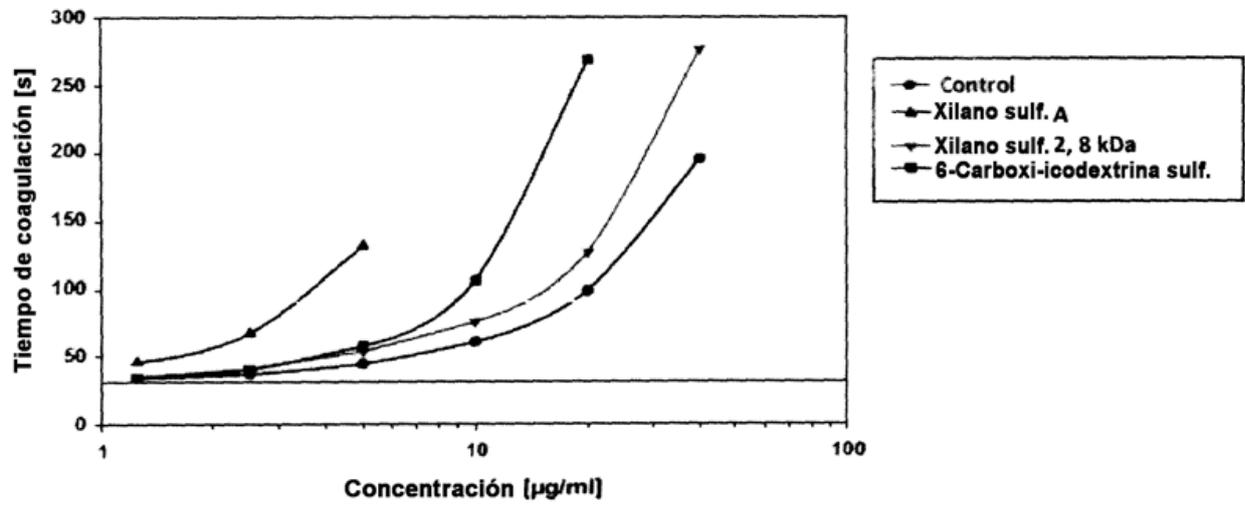
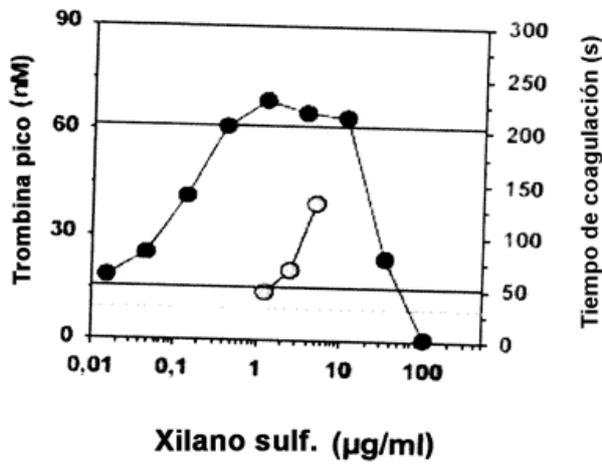


FIG. 62

**Xilanos sulfatados**

**Xilano sulfatado: 22,2 kDa; el 14,7% de S**



**Xilano sulfatado: 2,8 kDa; el 15,5% de S**

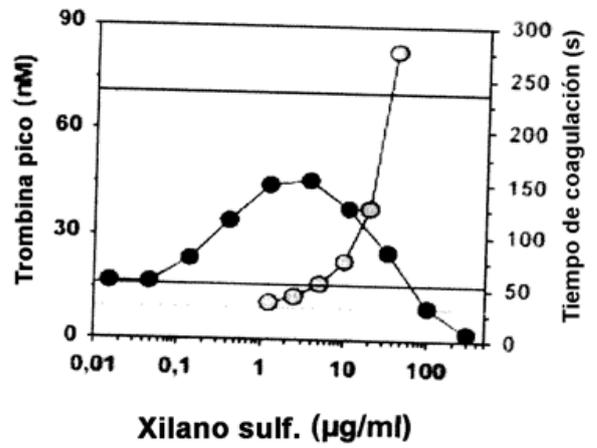


FIG. 63

**6-Carboxi-icodextrina sulfatada**

6-Carboxi-icodextrina sulfatada: el 11% de S

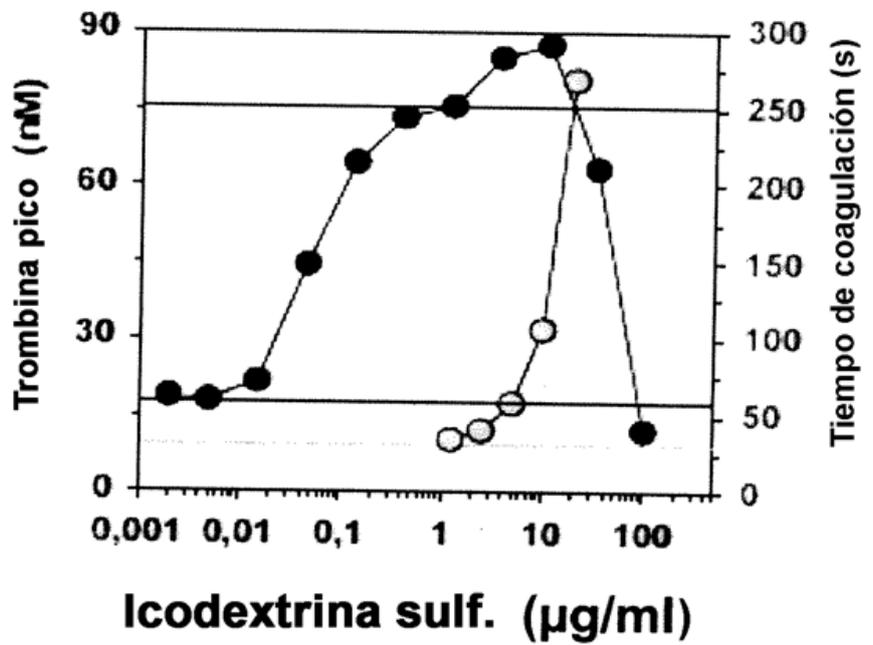
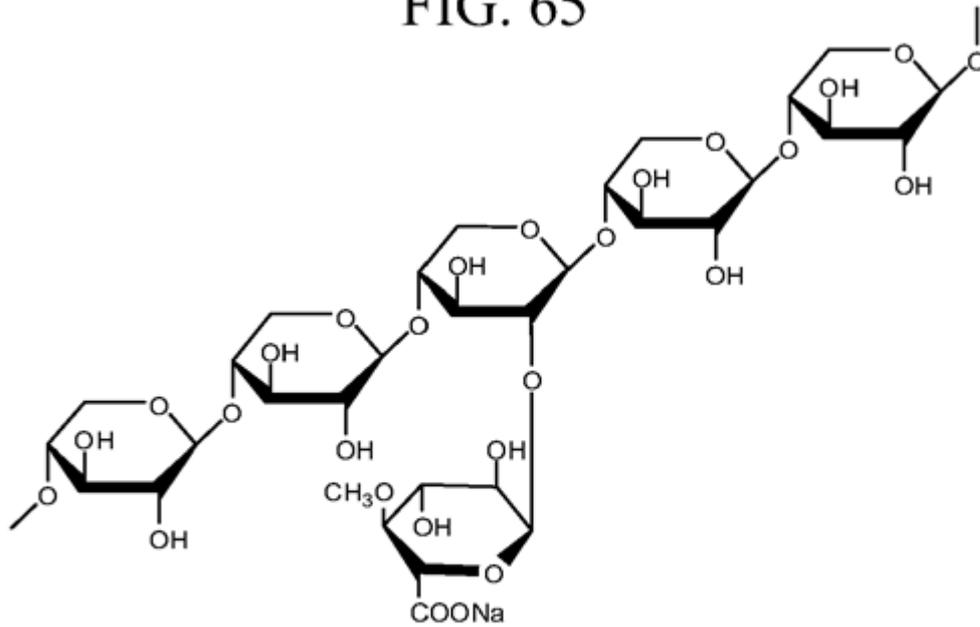


FIG. 64

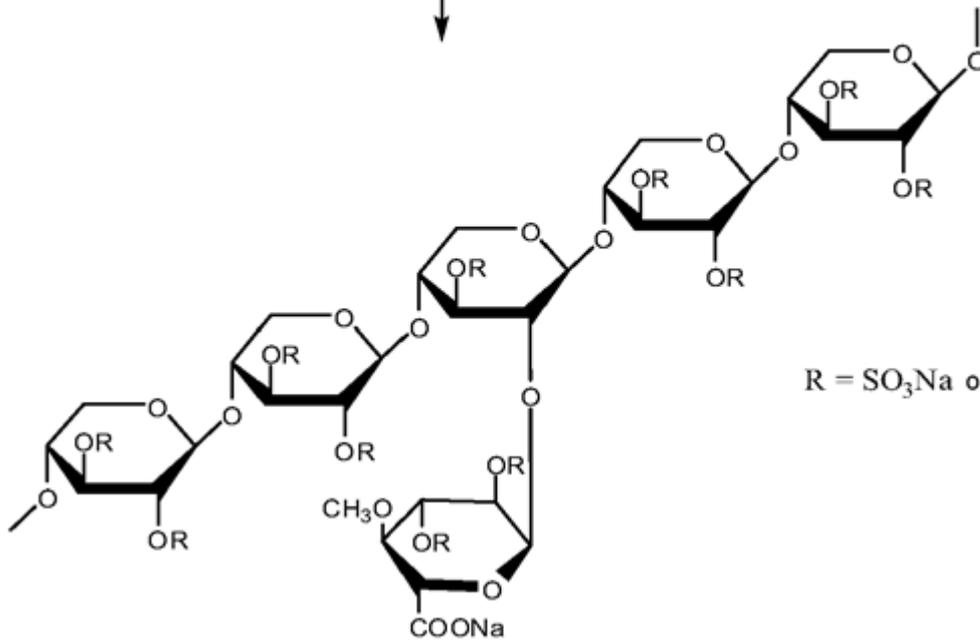
<b>NASP</b>	<b>Inicio actividad anticoagulante <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>Tiempo de coagulación máx. s. (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>Bax513</b>	<b>2.5</b>	<b>194 (40)</b>
Xilano A, 22kDa	0 – 1.25	132 (5)
Xilano 156D, 2, 8 kDa	1.25	276 (40)
6-Carboxi-icodextrina sulfatada	1.25	269 (20)

FIG. 65



WO 2009/087581  
 Patente estadounidense 4,713,373  
 Patente estadounidense 4,699,900

1. Ácido clorosulfónico/beta-picolina
2. Agua/dióxido de cloro
3. NaOH metanólico
4. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 N/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (despolimerización)
5. Diálisis
6. Cristalizar o secar por congelación



R = SO<sub>3</sub>Na o H

FIG. 66A

	agente adicional										
	Factor XI	Factor XII	Precalicerina	Factor V	Factor VII (HMWK)	Factor VIII	Factor IX	Factor X	Factor XIII	Factor II	
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
<b>Polisacárido de base de NASP</b>											
celotriosa	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11
celotetraosa	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
celopentaosa	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11
maltotriosa	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11
maltotetraosa	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
maltopentaosa	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
xilohexaosa	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11
rafinosa	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11
melecitosa	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11
estaquirosa	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11
$\alpha$ -ciclodextrina	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11
$\beta$ -ciclodextrina	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
$\gamma$ -ciclodextrina	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11
6-carboxiicodextrina											

FIG. 66B

	agente adicional																																																																																																																																											
Polisacárido de base de NASP	Factor de von Willebrand				Factor tisular				Reactivo de APTT				Tromboplastina				Fibrina				Veneno de víbora de Russell				Partículas de sílice micronizadas				Ácido elálgico				Sulfatos				Caolín																																																																																																							
	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20	B21	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20	G21	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	I12	I13	I14	I15	I16	I17	I18	I19	I20	I21	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20	J21	K12	K13	K14	K15	K16	K17	K18	K19	K20	K21	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	N12	N13	N14	N15	N16	N17	N18	N19	N20	N21

FIG. 67A

Combinación NASP/agente adicional	Intervalo de dosificación de NASP		
	Intervalo de dosif. a (p. ej. para i.v.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. b (p. ej. para s.c.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. c (p. ej. para oral) [mg/kg]
A1	0.1-10	1-100	10-500
A2	0.1-10	1-100	10-500
A3	0.1-10	1-100	10-500
A4	0.1-10	1-100	10-500
A5	0.1-10	1-100	10-500
A6	0.1-10	1-100	10-500
A7	0.1-10	1-100	10-500
A8	0.1-10	1-100	10-500
A9	0.1-10	1-100	10-500
A10	0.1-10	1-100	10-500
A11	0.1-10	1-100	10-500
A12	0.1-10	1-100	10-500
A13	0.1-10	1-100	10-500
A14	0.1-10	1-100	10-500
A15	0.1-10	1-100	10-500
A16	0.1-10	1-100	10-500
A17	0.1-10	1-100	10-500
A18	0.1-10	1-100	10-500
A19	0.1-10	1-100	10-500
A20	0.1-10	1-100	10-500
A21	0.1-10	1-100	10-500
B1	0.01-2	0.2-20	2-200
B2	0.01-2	0.2-20	2-200
B3	0.01-2	0.2-20	2-200
B4	0.01-2	0.2-20	2-200
B5	0.01-2	0.2-20	2-200
B6	0.01-2	0.2-20	2-200
B7	0.01-2	0.2-20	2-200
B8	0.01-2	0.2-20	2-200
B9	0.01-2	0.2-20	2-200
B10	0.01-2	0.2-20	2-200
B11	0.01-2	0.2-20	2-200
B12	0.01-2	0.2-20	2-200
B13	0.01-2	0.2-20	2-200
B14	0.01-2	0.2-20	2-200
B15	0.01-2	0.2-20	2-200
B16	0.01-2	0.2-20	2-200
B17	0.01-2	0.2-20	2-200
B18	0.01-2	0.2-20	2-200
B19	0.01-2	0.2-20	2-200
B20	0.01-2	0.2-20	2-200
B21	0.01-2	0.2-20	2-200
C1	0.01-1	0.01-10	1-100
C2	0.01-1	0.01-10	1-100
C3	0.01-1	0.01-10	1-100
C4	0.01-1	0.01-10	1-100
C5	0.01-1	0.01-10	1-100

FIG. 67B

Combinación NASP/agente adicional	Intervalo de dosificación de NASP		
	Intervalo de dosif. a (p. ej. para i.v.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. b (p. ej. para s.c.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. c (p. ej. para oral) [mg/kg]
C6	0.01-1	0.01-10	1-100
C7	0.01-1	0.01-10	1-100
C8	0.01-1	0.01-10	1-100
C9	0.01-1	0.01-10	1-100
C10	0.01-1	0.01-10	1-100
C11	0.01-1	0.01-10	1-100
C12	0.01-1	0.01-10	1-100
C13	0.01-1	0.01-10	1-100
C14	0.01-1	0.01-10	1-100
C15	0.01-1	0.01-10	1-100
C16	0.01-1	0.01-10	1-100
C17	0.01-1	0.01-10	1-100
C18	0.01-1	0.01-10	1-100
C19	0.01-1	0.01-10	1-100
C20	0.01-1	0.01-10	1-100
C21	0.01-1	0.01-10	1-100
D1	0.1-10	1-100	10-500
D2	0.1-10	1-100	10-500
D3	0.1-10	1-100	10-500
D4	0.1-10	1-100	10-500
D5	0.1-10	1-100	10-500
D6	0.1-10	1-100	10-500
D7	0.1-10	1-100	10-500
D8	0.1-10	1-100	10-500
D9	0.1-10	1-100	10-500
D10	0.1-10	1-100	10-500
D11	0.1-10	1-100	10-500
D12	0.1-10	1-100	10-500
D13	0.1-10	1-100	10-500
D14	0.1-10	1-100	10-500
D15	0.1-10	1-100	10-500
D16	0.1-10	1-100	10-500
D17	0.1-10	1-100	10-500
D18	0.1-10	1-100	10-500
D19	0.1-10	1-100	10-500
D20	0.1-10	1-100	10-500
D21	0.1-10	1-100	10-500
E1	0.02-2	0.02-20	2-200
E2	0.02-2	0.02-20	2-200
E3	0.02-2	0.02-20	2-200
E4	0.02-2	0.02-20	2-200
E5	0.02-2	0.02-20	2-200
E6	0.02-2	0.02-20	2-200
E7	0.02-2	0.02-20	2-200
E8	0.02-2	0.02-20	2-200
E9	0.02-2	0.02-20	2-200
E10	0.02-2	0.02-20	2-200

FIG. 67C

Combinación NASP/agente adicional	Intervalo de dosificación de NASP		
	Intervalo de dosif. a (p. ej. para i.v.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. b (p. ej. para s.c.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. c (p. ej. para oral) [mg/kg]
E11	0.02-2	0.02-20	2-200
E12	0.02-2	0.02-20	2-200
E13	0.02-2	0.02-20	2-200
E14	0.02-2	0.02-20	2-200
E15	0.02-2	0.02-20	2-200
E16	0.02-2	0.02-20	2-200
E17	0.02-2	0.02-20	2-200
E18	0.02-2	0.02-20	2-200
E19	0.02-2	0.02-20	2-200
E20	0.02-2	0.02-20	2-200
E21	0.02-2	0.02-20	2-200
F1	0.01-1	0.01-10	1-100
F2	0.01-1	0.01-10	1-100
F3	0.01-1	0.01-10	1-100
F4	0.01-1	0.01-10	1-100
F5	0.01-1	0.01-10	1-100
F6	0.01-1	0.01-10	1-100
F7	0.01-1	0.01-10	1-100
F8	0.01-1	0.01-10	1-100
F9	0.01-1	0.01-10	1-100
F10	0.01-1	0.01-10	1-100
F11	0.01-1	0.01-10	1-100
F12	0.01-1	0.01-10	1-100
F13	0.01-1	0.01-10	1-100
F14	0.01-1	0.01-10	1-100
F15	0.01-1	0.01-10	1-100
F16	0.01-1	0.01-10	1-100
F17	0.01-1	0.01-10	1-100
F18	0.01-1	0.01-10	1-100
F19	0.01-1	0.01-10	1-100
F20	0.01-1	0.01-10	1-100
F21	0.01-1	0.01-10	1-100
G1	0.02-2	0.2-20	2-200
G2	0.02-2	0.2-20	2-200
G3	0.02-2	0.2-20	2-200
G4	0.02-2	0.2-20	2-200
G5	0.02-2	0.2-20	2-200
G6	0.02-2	0.2-20	2-200
G7	0.02-2	0.2-20	2-200
G8	0.02-2	0.2-20	2-200
G9	0.02-2	0.2-20	2-200
G10	0.02-2	0.2-20	2-200
G11	0.02-2	0.2-20	2-200
G12	0.02-2	0.2-20	2-200
G13	0.02-2	0.2-20	2-200
G14	0.02-2	0.2-20	2-200
G15	0.02-2	0.2-20	2-200

FIG. 67D

Combinación NASP/agente adicional	Intervalo de dosificación de NASP		
	Intervalo de dosif. a (p. ej. para i.v.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. b (p. ej. para s.c.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. c (p. ej. para oral) [mg/kg]
G16	0.02-2	0.2-20	2-200
G17	0.02-2	0.2-20	2-200
G18	0.02-2	0.2-20	2-200
G19	0.02-2	0.2-20	2-200
G20	0.02-2	0.2-20	2-200
G21	0.02-2	0.2-20	2-200
H1	0.03-3	0.3-30	3-300
H2	0.03-3	0.3-30	3-300
H3	0.03-3	0.3-30	3-300
H4	0.03-3	0.3-30	3-300
H5	0.03-3	0.3-30	3-300
H6	0.03-3	0.3-30	3-300
H7	0.03-3	0.3-30	3-300
H8	0.03-3	0.3-30	3-300
H9	0.03-3	0.3-30	3-300
H10	0.03-3	0.3-30	3-300
H11	0.03-3	0.3-30	3-300
H12	0.03-3	0.3-30	3-300
H13	0.03-3	0.3-30	3-300
H14	0.03-3	0.3-30	3-300
H15	0.03-3	0.3-30	3-300
H16	0.03-3	0.3-30	3-300
H17	0.03-3	0.3-30	3-300
H18	0.03-3	0.3-30	3-300
H19	0.03-3	0.3-30	3-300
H20	0.03-3	0.3-30	3-300
H21	0.03-3	0.3-30	3-300
I1	0.06-6	0.6-60	6-500
I2	0.06-6	0.6-60	6-500
I3	0.06-6	0.6-60	6-500
I4	0.06-6	0.6-60	6-500
I5	0.06-6	0.6-60	6-500
I6	0.06-6	0.6-60	6-500
I7	0.06-6	0.6-60	6-500
I8	0.06-6	0.6-60	6-500
I9	0.06-6	0.6-60	6-500
I10	0.06-6	0.6-60	6-500
I11	0.06-6	0.6-60	6-500
I12	0.06-6	0.6-60	6-500
I13	0.06-6	0.6-60	6-500
I14	0.06-6	0.6-60	6-500
I15	0.06-6	0.6-60	6-500
I16	0.06-6	0.6-60	6-500
I17	0.06-6	0.6-60	6-500
I18	0.06-6	0.6-60	6-500
I19	0.06-6	0.6-60	6-500
I20	0.06-6	0.6-60	6-500

FIG. 67E

Combinación NASP/agente adicional	Intervalo de dosificación de NASP		
	Intervalo de dosif. a (p. ej. para i.v.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. b (p. ej. para s.c.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. c (p. ej. para oral) [mg/kg]
I21	0.06-6	0.6-60	6-500
J1	0.01-1	0.01-10	1-100
J2	0.01-1	0.01-10	1-100
J3	0.01-1	0.01-10	1-100
J4	0.01-1	0.01-10	1-100
J5	0.01-1	0.01-10	1-100
J6	0.01-1	0.01-10	1-100
J7	0.01-1	0.01-10	1-100
J8	0.01-1	0.01-10	1-100
J9	0.01-1	0.01-10	1-100
J10	0.01-1	0.01-10	1-100
J11	0.01-1	0.01-10	1-100
J12	0.01-1	0.01-10	1-100
J13	0.01-1	0.01-10	1-100
J14	0.01-1	0.01-10	1-100
J15	0.01-1	0.01-10	1-100
J16	0.01-1	0.01-10	1-100
J17	0.01-1	0.01-10	1-100
J18	0.01-1	0.01-10	1-100
J19	0.01-1	0.01-10	1-100
J20	0.01-1	0.01-10	1-100
J21	0.01-1	0.01-10	1-100
K1	0.03-3	0.3-30	3-300
K2	0.03-3	0.3-30	3-300
K3	0.03-3	0.3-30	3-300
K4	0.03-3	0.3-30	3-300
K5	0.03-3	0.3-30	3-300
K6	0.03-3	0.3-30	3-300
K7	0.03-3	0.3-30	3-300
K8	0.03-3	0.3-30	3-300
K9	0.03-3	0.3-30	3-300
K10	0.03-3	0.3-30	3-300
K11	0.03-3	0.3-30	3-300
K12	0.03-3	0.3-30	3-300
K13	0.03-3	0.3-30	3-300
K14	0.03-3	0.3-30	3-300
K15	0.03-3	0.3-30	3-300
K16	0.03-3	0.3-30	3-300
K17	0.03-3	0.3-30	3-300
K18	0.03-3	0.3-30	3-300
K19	0.03-3	0.3-30	3-300
K20	0.03-3	0.3-30	3-300
K21	0.03-3	0.3-30	3-300
L1	0.01-1	0.01-10	1-100
L2	0.01-1	0.01-10	1-100
L3	0.01-1	0.01-10	1-100
L4	0.01-1	0.01-10	1-100

FIG. 67F

Combinación NASP/agente adicional	Intervalo de dosificación de NASP		
	Intervalo de dosif. a (p. ej. para i.v.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. b (p. ej. para s.c.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. c (p. ej. para oral) [mg/kg]
L5	0.01-1	0.01-10	1-100
L6	0.01-1	0.01-10	1-100
L7	0.01-1	0.01-10	1-100
L8	0.01-1	0.01-10	1-100
L9	0.01-1	0.01-10	1-100
L10	0.01-1	0.01-10	1-100
L11	0.01-1	0.01-10	1-100
L12	0.01-1	0.01-10	1-100
L13	0.01-1	0.01-10	1-100
L14	0.01-1	0.01-10	1-100
L15	0.01-1	0.01-10	1-100
L16	0.01-1	0.01-10	1-100
L17	0.01-1	0.01-10	1-100
L18	0.01-1	0.01-10	1-100
L19	0.01-1	0.01-10	1-100
L20	0.01-1	0.01-10	1-100
L21	0.01-1	0.01-10	1-100
M1	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M2	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M3	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M4	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M5	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M6	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M7	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M8	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M9	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M10	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M11	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M12	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M13	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M14	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M15	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M16	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M17	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M18	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M19	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M20	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
M21	0.01-0.3	0.03-3	0.3-30
N1	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N2	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N3	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N4	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N5	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N6	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N7	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N8	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N9	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4

## FIG. 67G

Combinación NASP/agente adicional	Intervalo de dosificación de NASP		
	Intervalo de dosif. a (p. ej. para i.v.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. b (p. ej. para s.c.) [mg/kg]	Intervalo de dosif. c (p. ej. para oral) [mg/kg]
N10	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N11	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N12	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N13	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N14	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N15	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N16	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N17	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N18	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N19	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N20	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4
N21	0.01-0.1	0.01-0.1	0.04-4

## FIG. 68

<b>agente adicional</b>	<b>Inter. de dosif.</b>
Factor XI	5-90 U/kg
Factor XII	5-90 U/kg
Precalicroína	5-90 U/kg
Cininógeno de alto peso molecular (HMWK)	5-90 U/kg
Factor V	5-90 U/kg
Factor VII	5-90 U/kg
Factor VIII	5-90 U/kg
Factor IX	5-90 U/kg
Factor X	5-90 U/kg
Factor XIII	5-90 U/kg
Factor II	5-90 U/kg
Factor de von Willebrand	5-90 U/kg
Factor tisular	5-90 U/kg
Factor VIIa	10-100 µg/kg
Factor Va	5-90 U/kg
Factor Xa	5-90 U/kg
Factor IXa	5-90 U/kg
Factor XIa	5-90 U/kg
Factor XIIa	5-90 U/kg
Factor VIIIa	5-90 U/kg
Reactivo de APTT	0.01-10 mg/kg
Tromboplastina	5-90 U/kg
Fibrina	5-90 U/kg
TFPI	5-90 U/kg
Veneno de víbora de Russell	0.01-10 µg/kg
Partículas de sílice micronizadas	0.01-10 mg/kg
Ácido elágico	0.01-10 mg/kg
Sulfátidos	0.01-10 mg/kg
Caolín	0.01-10 mg/kg

FIG. 69

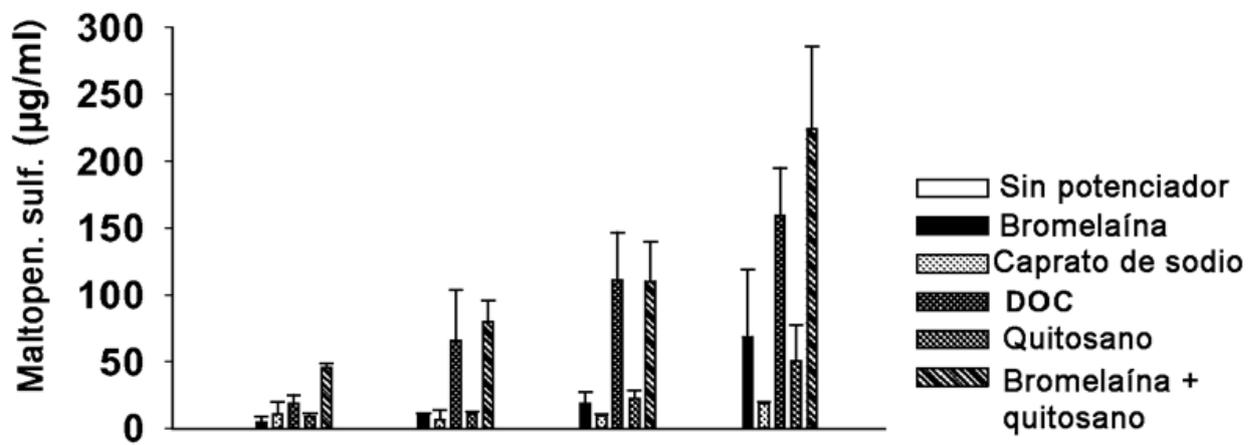


FIG. 70

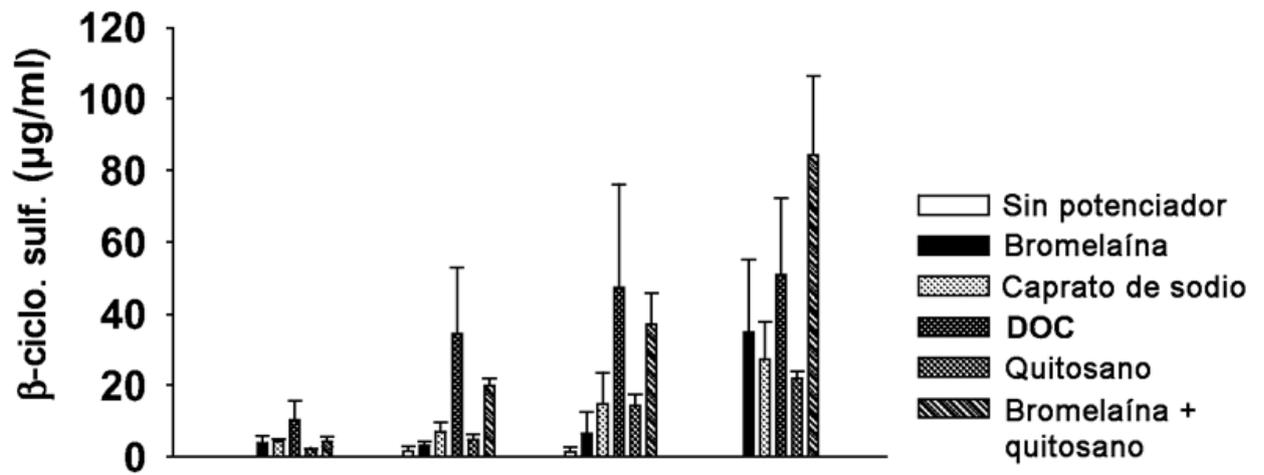


FIG. 71

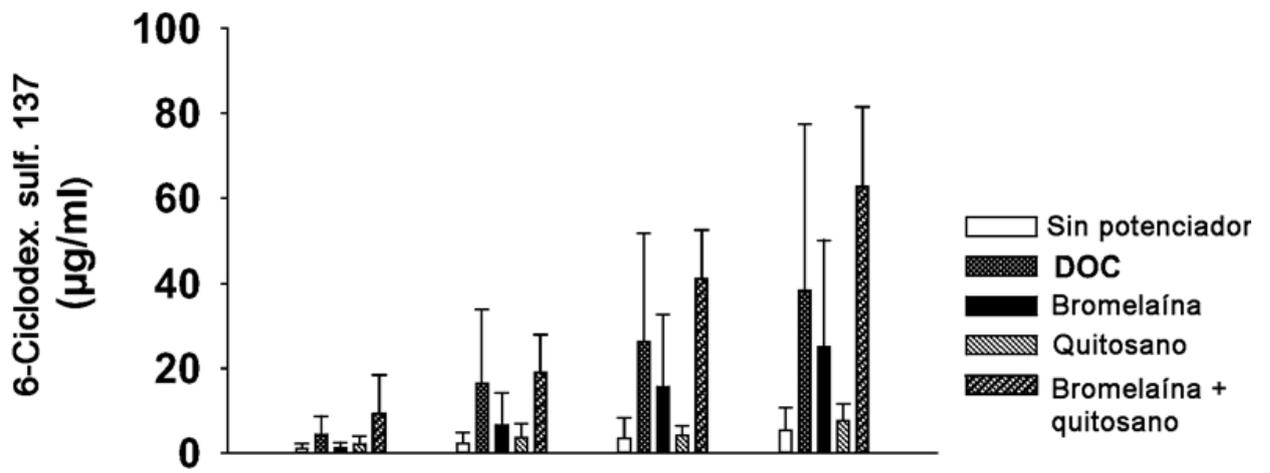


FIG. 72

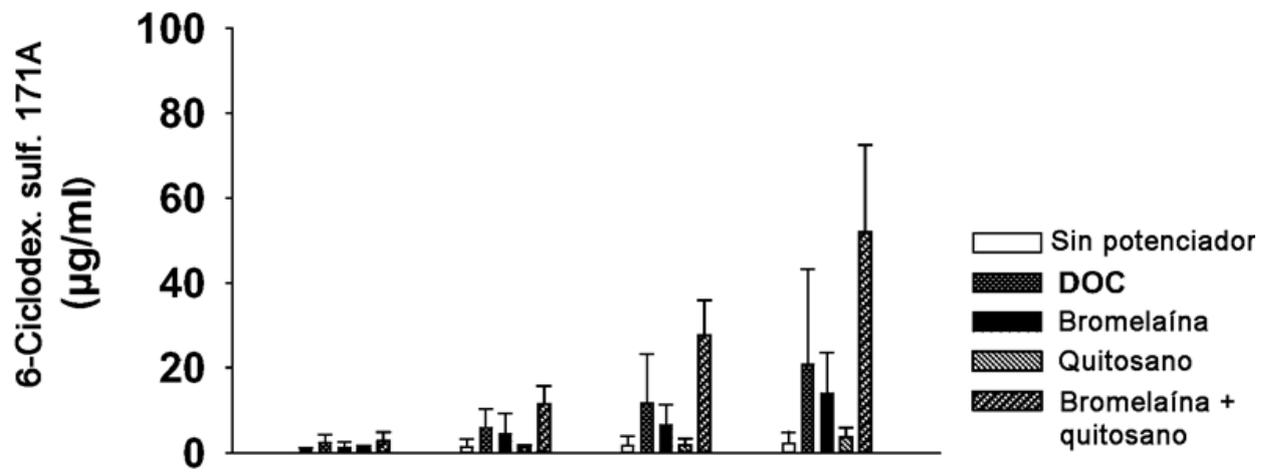


FIG. 73

