

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 287**

51 Int. Cl.:

A61K 31/737 (2006.01)

C08B 37/02 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2015 PCT/SE2015/051188**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16076780**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2015 E 15858497 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3217988**

54 Título: **Sulfato de dextrano nuevo**

30 Prioridad:

11.11.2014 SE 1451349

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

28.03.2019

73 Titular/es:

**TX MEDIC AB (100.0%)
Box 81
263 03 Viken , SE**

72 Inventor/es:

**BRUCE, LARS y
BRASEN, ULF**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 706 287 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

Sulfato de dextrano nuevo

5 CAMPO TÉCNICO

Las presentes realizaciones se refieren, en general, a sulfato de dextrano y, en particular, a un sulfato de dextrano nuevo que tiene un efecto biológico mejorado y baja toxicidad.

10 ANTECEDENTES

El dextrano es un glucano ramificado complejo, es decir, un polisacárido constituido por unidades de glucosa, compuesto por cadenas de diferentes longitudes, normalmente de uno o unos pocos miles de Dalton (Da) hasta varios cientos de miles Da.

15

La cadena lineal del dextrano consiste en enlaces glucosídicos α -1,6 entre las unidades de glucosa, mientras que las ramificaciones comienzan, usualmente, desde enlaces α -1,3. El dextrano se sintetiza a partir de la sacarosa por ciertas bacterias del ácido láctico, tales como *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus brevis*.

20 El sulfato de dextrano es un derivado polianiónico del dextrano, en el cual algunas de las posiciones C2-C4 y las posiciones C1 y C6 del grupo extremo están sulfatadas. El sulfato de dextrano ha sido conocido durante décadas y particularmente como un sustituto potencial de la heparina en la terapia anticoagulante.

Las moléculas de sulfato de dextrano están disponibles en diferentes pesos moleculares, diferentes niveles de ramificación y diferentes contenidos de sulfato y patrones de sulfatación. Estas diferencias físicas y químicas entre las moléculas de sulfato de dextrano provocan diferentes efectos biológicos y tóxicos.

Existe la necesidad de un sulfato de dextrano que tenga efectos biológicos mejorados y que no sea tóxico en dosificaciones farmacéuticamente relevantes.

30

RESUMEN

Un objetivo general es proporcionar un sulfato de dextrano que tenga efectos biológicos mejorados y que no sea tóxico en dosificaciones farmacéuticamente relevantes.

35

Este y otros objetivos se logran a través de las realizaciones según se describen en la presente.

Un aspecto de las realizaciones se refiere a un sulfato de dextrano, o una sal del mismo, que tiene un peso molecular promedio en número (M_n), según lo medido mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), dentro de un intervalo de entre 1850 y 3500 Da. El sulfato de dextrano, o la sal del mismo, también tiene un número de sulfato promedio por unidad de glucosa dentro de un intervalo de entre 2,5 y 3,0. Además, una sulfatación promedio de la posición C2 en las unidades de glucosa del sulfato de dextrano, o la sal del mismo, es de al menos el 90 %.

Un sulfato de dextrano de las realizaciones tiene efectos biológicos mejorados y/o toxicidad reducida en comparación con las moléculas de sulfato de dextrano similares disponibles en el mercado.

45

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las realizaciones, junto con otros objetivos y ventajas de las mismas, pueden entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos, en los cuales:

50

La figura 1 es una expansión del espectro de NMR $1D^1H$ del material de partida de dextrano enfocada en la región con las señales de dextrano.

La figura 2 es una comparación de los espectros de NMR $1D^1H$ del material de partida de dextrano y un sulfato de dextrano de las realizaciones (n.º de lote 3).

55

La figura 3 ilustra el espectro de HSQC $2D^{13}C-^1H$ de un sulfato de dextrano de las realizaciones (n.º de lote 1) a 25 °C recubierto con el espectro correspondiente del material de partida de sulfato de dextrano.

La figura 4 ilustra el espectro de NMR $1D^1H$ de un sulfato de dextrano de las realizaciones (n.º de lote 3) a 25 °C.

La figura 5 ilustra el espectro de HSQC $2D^{13}C-^1H$ de un sulfato de dextrano de las realizaciones (n.º de lote 3) a 25 °C. Cada pico corresponde a un enlace C-H con entorno químico diferente. Las áreas pico son aproximadamente

60

proporcionales a la población de cada enlace C-H.

La figura 6 ilustra una comparación de la región de sulfato de dextrano de los espectros de NMR $1D^1H$ para moléculas de sulfato de dextrano de acuerdo con las realizaciones (arriba - n.º de lote 1, medio - n.º de lote 2, abajo - n.º de lote 3).

- 5 La figura 7 ilustra el espectro de HSQC $2D^{13}C-^1H$ de un sulfato de dextrano de las realizaciones (n.º de lote 3) a 25 °C.

La figura 8 ilustra los efectos de sulfato de dextrano en glóbulos blancos en sangre periférica. Los animales se trataron con una sola inyección intravenosa de sulfato de dextrano de pesos moleculares promedio diferentes en dosis de 50 mg/kg. Se utilizó solución salina tamponada (NaCl) como control de vehículo. Algunos animales se sedaron utilizando 10 barbitol pentasódico (PNB) en lugar de isoflurano para comparar el efecto de diferentes métodos de anestesia. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM por sus siglas en inglés). Se utilizó la prueba t de Student para evaluar las diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de control (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

La figura 9 ilustra la eficacia del sulfato de dextrano para movilizar células progenitoras hematopoyéticas en sangre 15 periférica. Los animales se trataron con una sola inyección intravenosa de sulfato de dextrano de peso molecular promedio diferente o con vehículo (NaCl). Las barras de error muestran el SEM. Se utilizó la prueba t de Student para evaluar las diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de control (* $p < 0,05$).

La figura 10 ilustra la eficacia del sulfato de dextrano para aumentar los niveles de HGF en sangre periférica. Los 20 animales se trataron con una sola inyección intravenosa de sulfato de dextrano de peso molecular promedio diferente o con vehículo (NaCl). Las barras de error muestran el SEM. Se utilizó la prueba t de Student para evaluar las diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de control (*** $p < 0,001$).

La figura 11 ilustra los efectos de sulfato de dextrano administrado 5 HS (30,0 mg/kg) y un sulfato de dextrano de las realizaciones (n.º de lote 3, 30 mg/kg) y vehículo en el índice acumulativo de enfermedad.

La figura 12 es un diagrama de flujo que ilustra un proceso de producción para la producción del sulfato de dextrano 25 de las realizaciones.

La figura 13 ilustra el espectro de NMR $1D^1H$ de un sulfato de dextrano de acuerdo con la técnica anterior.

La figura 14 ilustra el espectro de HSQC $2D^{13}C-^1H$ de un sulfato de dextrano de acuerdo con la técnica anterior.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

30

Las presentes realizaciones se refieren, en general, a sulfato de dextrano y, en particular, a un sulfato de dextrano nuevo que tiene un efecto biológico mejorado y baja toxicidad.

Las presentes realizaciones se basan en el descubrimiento sorprendente de que las moléculas de sulfato de dextrano 35 tienen efectos biológicos significativamente diferentes aunque las moléculas de sulfato de dextrano tengan propiedades físicas y químicas bastante similares. Por ende, se ha fabricado un sulfato de dextrano que tiene un peso molecular promedio en número y un contenido y patrón de sulfatación que producen efectos biológicos mejorados y baja toxicidad en comparación con las moléculas de sulfato de dextrano similares disponibles en el mercado.

40 Tradicionalmente, las moléculas de sulfato de dextrano se han caracterizado con respecto a los parámetros de peso molecular utilizando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC por sus siglas en inglés), tal como cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés) SEC o SE-HPLC para abreviar. En la técnica, la SEC también se conoce como cromatografía de filtración en gel, cromatografía de permeación en gel (GPC por sus siglas en inglés) o cromatografía de tamizado molecular. Otras tecnologías comunes utilizadas para medir parámetros de peso 45 molecular de sulfato de dextrano y glucanos relacionados es dispersión de luz, tal como dispersión estática de luz (SLS por sus siglas en inglés), o tecnologías basadas en viscosidad.

Sin embargo, estas tecnologías para determinar parámetros de peso molecular de sulfato de dextrano informan sobre la función de la forma y el volumen molecular en lugar de su peso molecular. Esto significa que si las moléculas de 50 sulfato de dextrano forman agregados o complejos durante las mediciones, se determina un mayor peso molecular aparente.

Además, varios factores y configuraciones utilizados en la medición afectan el peso molecular aparente de la molécula de sulfato de dextrano, tales como elección de columna de cromatografía y eluyente, ajustes de velocidad de flujo, 55 procedimiento de calibración, incluido estándar de dextrano utilizado en el procedimiento de calibración, carga de moléculas de sulfato de dextrano, etc.

Además, los procedimientos indirectos más bien informan sobre la forma y el volumen molecular, los cuales pueden 60 diferir significativamente no sólo de un lote a otro, sino también de una muestra a otra dentro del mismo lote, dependiendo, por ejemplo, de cómo se ha almacenado el material de sulfato de dextrano, de cómo se prepara antes

de la medición, etc.

Se ha utilizado una tecnología más exacta para determinar parámetros de peso molecular de sulfato de dextrano que proporciona parámetros de peso molecular verdaderos y no parámetros afectados por el tamaño. Esta tecnología se compara además con las tecnologías utilizadas tradicionalmente mencionadas anteriormente.

Para poder comparar directamente determinaciones de tamaño/peso molecular a través de diferentes procedimientos, es importante comprender las definiciones de tamaño molecular utilizadas comúnmente que se enumeran a continuación. El parámetro N_i indica el número de moléculas de sulfato de dextrano que tienen un peso molecular de M_i en una muestra o lote.

$$(M_n): \frac{\sum M_i N_i}{\sum N_i},$$

Peso molecular promedio en número normalmente derivado mediante ensayos de grupo extremo, p. ej., cromatografía o espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en inglés). Si se asume una distribución normal, se puede encontrar un mismo número de moléculas de sulfato de dextrano en cada lado de M_n , es decir, el número de moléculas de sulfato de dextrano en la muestra que tiene un peso molecular inferior a M_n es igual al número de moléculas de sulfato de dextrano en la muestra que tiene un peso molecular superior a M_n .

$$(M_w): \frac{\sum M_i^2 N_i}{\sum M_i N_i},$$

Peso molecular promedio en peso típico para procedimientos sensibles al tamaño molecular en lugar del valor numérico, p. ej., procedimientos de SEC y dispersión de luz. Si se asume una distribución normal, un mismo peso en cada lado de M_w , es decir, el peso total de las moléculas de sulfato de dextrano en la muestra que tiene un peso molecular inferior a M_w es igual al peso total de las moléculas de sulfato de dextrano en la muestra que tiene un peso total superior a M_w .

$$(M_z): \frac{\sum M_i^{n+1} N_i}{\sum M_i^n N_i},$$

Pesos moleculares promedio o promedio por tamaño típicos para procedimientos que miden el movimiento de las moléculas como técnicas de difusión o sedimentación. En general, más sensibles para polímeros de peso molecular elevado. Especialmente, $n=0$ da M_n y $n=1$ da M_w .

Índice de polidispersidad (PDI por sus siglas en inglés) (M_w/M_n), una medida común de la amplitud de la distribución del peso molecular. Un valor de 1 implica un polímero monodisperso, entre 1,02 y 1,10 son comunes para polímeros sintéticos muy controlados, entre 1,5 y 2 son comunes para productos de reacción en cadena y ~ 2 es común para productos de polimerización por etapas.

El modo de distribución del peso molecular (M_p) representa el peso molecular del pico más alto en el cromatograma de cromatografía líquida (LC por sus siglas en inglés). A menudo indicado para distribuciones estrechas de polímeros estándar y determinado mediante GPC/SEC o dispersión de luz.

Un aspecto de las realizaciones se refiere a sulfato de dextrano, o una sal del mismo, caracterizado por un peso molecular promedio en número (M_n), según lo medido mediante espectroscopía de NMR, dentro de un intervalo de entre 1850 y 3500 Da. El sulfato de dextrano, o la sal del mismo, también tiene un número de sulfato promedio por unidad de glucosa dentro de un intervalo de entre 2,5 y 3,0, y una sulfatación promedio de la posición C2 en las unidades de glucosa del sulfato de dextrano, o la sal del mismo, es de al menos el 90 %.

El sulfato de dextrano, o la sal del mismo, de las realizaciones tiene un rango muy estrecho de los valores de los parámetros de peso molecular, es decir, el peso molecular promedio en número (M_n). Este peso molecular promedio en número (M_n) se mide mediante un ensayo de grupo extremo basado en espectroscopía de NMR como se describe adicionalmente en la presente. Las mediciones de espectroscopía de NMR proporcionan resultados más consistentes con respecto a la determinación de los parámetros de peso molecular que las técnicas de GPC, SEC y dispersión de luz utilizadas tradicionalmente. Además, las mediciones de espectroscopía de NMR proporcionan el peso molecular promedio en número (M_n) verdadero o correcto de las moléculas de sulfato de dextrano que no se ve afectado por ninguna formación de complejos o agregación, lo que es un problema común en las técnicas utilizadas tradicionalmente.

En una realización particular, el sulfato de dextrano, o la sal del mismo, tiene un peso molecular promedio en número (M_n), según lo medido mediante espectroscopía de NMR, dentro de un intervalo de entre 1850 y 2500 Da, preferentemente dentro del intervalo de entre 1850 y 2300 Da. En una realización particular, el sulfato de dextrano, o

la sal del mismo (excluyendo cualquier contraión), tiene un peso molecular promedio en número (M_n), según lo medido mediante espectroscopía de NMR, dentro de un intervalo de entre 1850 y 2200 Da, preferentemente dentro de un intervalo de entre 1850 y 2100 Da, y más preferentemente dentro de un intervalo de entre 1850 y 2000 Da.

- 5 En una realización, la sal de sulfato de dextrano es una sal de sodio o una sal de potasio, preferentemente una sal de sodio. Preferentemente, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable de sulfato de dextrano.

- En una realización particular, la sal de sodio de sulfato de dextrano que incluye los contraiones Na^+ tiene un peso molecular promedio en número (M_n), según lo determinado mediante espectroscopía de NMR, dentro de un intervalo de entre 1850 y 3500 Da, preferentemente dentro de un intervalo de entre 2000 y 2500 Da, y más preferentemente dentro de un intervalo de entre 2000 y 2400 Da, tal como dentro de un intervalo de entre 2100 y 2300 Da.

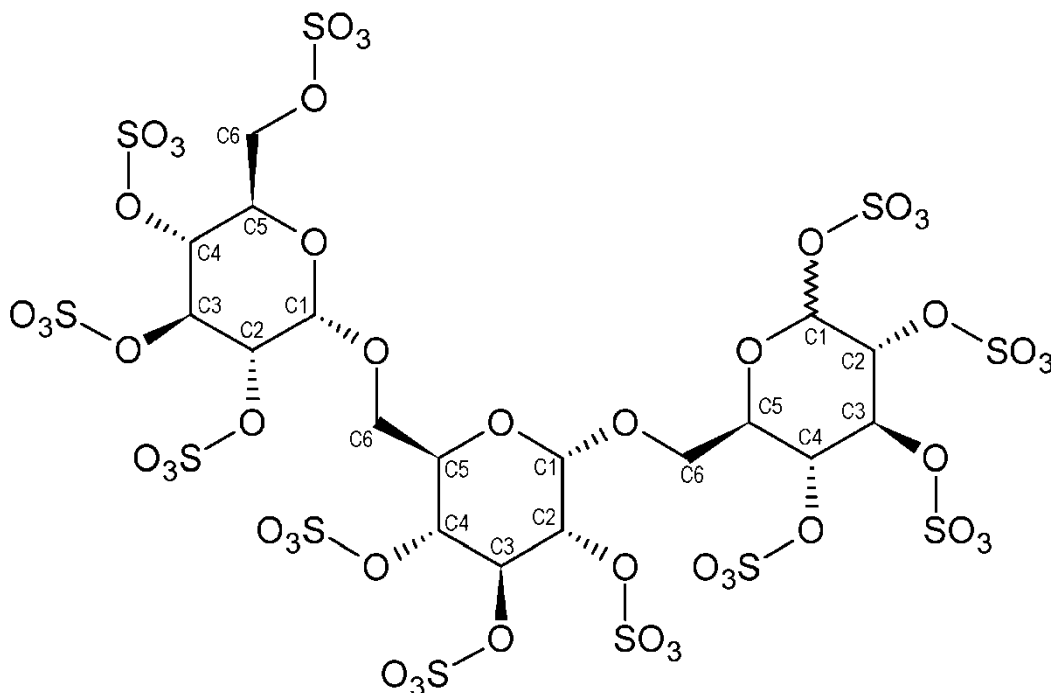
- En una realización, el sulfato de dextrano, o la sal del mismo, preferentemente tiene un número promedio de unidades de glucosa dentro de un intervalo de entre 4,0 y 6,0. En una realización preferida, el sulfato de dextrano, o la sal del mismo, tiene un número promedio de unidades de glucosa dentro de un intervalo de entre 4,5 y 5,5, más preferentemente dentro de un intervalo de entre 5,0 y 5,2, tal como aproximadamente 5,1.

- En una realización, el sulfato de dextrano, o la sal del mismo, tiene un número de sulfato promedio por glucosa dentro de un intervalo de entre 2,5 y 2,8, preferentemente dentro de un intervalo de entre 2,6 y 2,7.

- 20 Un número promedio de unidades de glucosa dentro de un intervalo de entre 4,0 y 6,0 y un número de sulfato promedio por unidad de glucosa dentro de un intervalo de entre 2,5 y 3,0 se traducen en un número total de átomos de sulfato en el sulfato de dextrano, o la sal del mismo, dentro de un intervalo de entre 10,0 y 18,0. En una realización, el sulfato de dextrano, o la sal del mismo, preferentemente tiene un número total de átomos de sulfato dentro de un intervalo de entre 11,25 y 15,4, preferentemente dentro de un intervalo de entre 13,0 y 14,0.

- En general, una molécula de sulfato de dextrano de las realizaciones que tiene en promedio 5,1 unidades de glucosa y un número de sulfato promedio por unidad de glucosa de entre 2,6 y 2,7, normalmente conlleva un peso molecular promedio en número (M_n), según lo medido mediante espectroscopía de NMR, dentro de un intervalo de entre 1850 y 2000 Da.

- La siguiente fórmula representa esquemáticamente una molécula de sulfato de dextrano con tres unidades de glucosa y un número máximo de átomos de azufre, es decir, cada sitio o posición en el núcleo del dextrano que puede ser sulfatado se ha sulfatado en la fórmula estructural. Por ende, se ilustra la unidad de glucosa no terminal sulfatada en las posiciones C2, C3 y C4; la unidad de glucosa terminal con la posición C1 libre está sulfatada en las posiciones C1, C2, C3 y C4, y la unidad de glucosa terminal con la posición C6 libre está sulfatada en las posiciones C2, C3, C4 y C6.



La sulfatación promedio de la posición C2 en las unidades de glucosa del sulfato de dextrano, o la sal del mismo, es de al menos el 90 %. En una realización, la sulfatación promedio de la posición C2 es de al menos el 95 %.

5

En una realización, el número de sulfato promedio en las posiciones C2, C3 y C4 en las unidades de glucosa del sulfato de dextrano, o la sal del mismo, se encuentra dentro de un intervalo de entre 2,0 y 2,6, preferentemente dentro de un intervalo de entre 2,2 y 2,6, tal como dentro de un intervalo de entre 2,3 y 2,5.

- 10 En una realización, la sulfatación promedio de la posición C3 en las unidades de glucosa del sulfato de dextrano, o la sal del mismo, se encuentra dentro de un intervalo de entre el 80 y el 90 %, preferentemente dentro de un intervalo de entre el 84 y el 87 %.

Por lo tanto, el sulfato de dextrano, o la sal de las realizaciones, tiene un alto grado de sulfatación en las posiciones C2, C3 y C4 en las unidades de glucosa en el núcleo del dextrano. En una realización particular, al menos el 70 % de estas posiciones están sulfatadas, y más preferentemente al menos el 75 % de estas posiciones. En una realización particular, entre el 75 y el 85 % del número total de las posiciones C2, C3 y C4 en el núcleo del dextrano están sulfatadas.

- 20 En una realización, una sulfatación promedio del grupo extremo C6 es de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %.

El grupo extremo C1 puede asumir una configuración α o una configuración β . En general, existe un equilibrio entre estas dos configuraciones de grupo extremo.

25

Al parecer, el grupo extremo C1 es sulfatado con más facilidad cuando asume la configuración β en comparación con la configuración α . Por ende, en una realización particular, la sulfatación del grupo extremo C1 es mayor cuando se encuentra en la configuración β en comparación con la configuración α . En una realización, una sulfatación promedio del grupo extremo C1 en la configuración β es de al menos el 75 %, preferentemente al menos el 80 % o al menos el 85 %. Correspondientemente, en una realización, una sulfatación promedio del grupo extremo C1 en la configuración α es preferentemente al menos el 15 %, se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de entre el 15 y el 75 %, más preferentemente dentro de un intervalo de entre el 15 y el 50 %, tal como dentro de un intervalo de entre el 15 y 45 %.

- 35 En una realización, una posición del grupo extremo C1 está sulfatada o está unida a -OH. Por ende, el sulfato de dextrano, o la sal del mismo, preferentemente carece de otra modificación del terminal extremo que no sea sulfatación

(-SO₃).

Tal como se mencionó en los antecedentes, la cadena lineal del dextrano consiste de enlaces glicosídicos α-1,6 entre las unidades de glucosa. La molécula de dextrano puede ser una cadena lineal que consista meramente de unidades de glucosa en una cadena no ramificada. Las moléculas de dextrano también pueden ser ramificadas, usualmente entre enlaces α-1,3.

En una realización, el sulfato de dextrano, o la sal del mismo, tiene una ramificación promedio de unidades de glucosa que es inferior al 5,0 %, tal como inferior al 3,0 %, preferentemente inferior al 1,5 %, tal como inferior al 1,0 %. Por ende, el sulfato de dextrano, o la sal del mismo, de las realizaciones es preferentemente una molécula altamente lineal con pocas ramificaciones, si las hubiera.

Una realización particular se refiere a una sal de sodio de sulfato de dextrano que tiene un peso molecular promedio en número (M_n), según lo medido mediante espectroscopía NMR, que incluye el contraión Na⁺, dentro de un intervalo de entre 2100 y 2300 Da. La sal de sulfato de dextrano tiene en promedio entre 5,0 y 5,2 unidades de glucosa y un número de sulfato promedio por unidad de glucosa se encuentra dentro de un intervalo de entre 2,5 y 2,8. En una realización particular, la sulfatación promedio de la posición C2 es de al menos el 95 %. Un número de sulfato promedio en las posiciones C2, C3 y C4 en las unidades de glucosa se encuentra además preferentemente dentro de un intervalo de entre 2,2 y 2,6.

El sulfato de dextrano de las realizaciones tiene efectos biológicos mejorados y/o menor toxicidad en comparación con las moléculas de sulfato de dextrano similares disponibles en el mercado, tal como se muestra en los siguientes experimentos. Estas diferencias en los efectos biológicos y la toxicidad fueron altamente sorprendentes dado que las moléculas de sulfato de dextrano tienen peso molecular y parámetros de sulfatación bastante similares. Por ende, parece haber rangos específicos de valores de parámetros moleculares y valores de parámetros de sulfatación que le proporcionan a las moléculas de sulfato de dextrano estos efectos ventajosos sobre otras moléculas de sulfato de dextrano que tienen valores de parámetros de peso molecular y/o valores de parámetros de sulfatación fuera de los rangos o intervalos específicos de las realizaciones.

El sulfato de dextrano se produce por sulfatación de un material de partida de dextrano en una reacción de esterificación. Existen diversos procesos de producción descritos en la técnica anterior para la producción de sulfato de dextrano. Algunos ejemplos de documentos que describen dichos procesos de producción incluyen Ricketts, Biochemical Journal, 51:129-133 (1952); patente sueca n.º 165 090; patentes estadounidenses n.º 2.715.091; 3.141.014; 3.498.972 y 4.855.416. Diferentes procesos de producción usan diferentes agentes sulfatantes, tales como ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄), trióxido de azufre (SO₃) o ácido clorosulfónico (ClSO₃H); diferentes disolventes, tales como piridina (C₅H₅N), formamida (NH₂COH) o acetamida (CH₃CONH₂); y diferentes parámetros de proceso. Estas diferencias pueden influir en las propiedades químicas y físicas del producto final de sulfato de dextrano.

A continuación, se describe un proceso de producción preferido en la actualidad con referencia a la figura 12. El sulfato de dextrano se produce mediante sulfatación de un material de partida de dextrano. La separación de sulfato de dextrano con peso molecular adecuado se logra mediante fraccionamiento de etanol, en el que las moléculas de mayor peso molecular se precipitan primero.

En una primera etapa, el material de partida de dextrano se agrega al disolvente formamida con agitación. El contenido del recipiente se agita y se calienta suavemente, luego se enfría a medida que la mezcla se transfiere al depurador.

En la reacción de esterificación, se agrega ácido clorosulfónico durante 5-6 horas bajo enfriamiento con salmuera. La temperatura se mantiene constante a ≤34 °C y, si es necesario, se calienta con vapor de agua a 1 atm de presión. La mezcla se transfiere a otro recipiente a través del depurador, seguido de un enjuague con agua purificada. La agitación se realiza antes de la primera precipitación de etanol.

En una realización alternativa, el ácido clorosulfónico se agrega a una parte de la formamida durante aproximadamente 3 horas bajo enfriamiento con salmuera. Luego, la mezcla de dextrano y la formamida restante se transfieren al recipiente que contiene la mezcla de ácido clorosulfónico y formamida manteniendo la temperatura a ≤34 °C.

En la etapa de precipitación, se bombea una mezcla de etanol-agua a una mezcla de sulfato de dextrano, que se agita. La mezcla se deja durante la noche bajo enfriamiento con salmuera. Al día siguiente, se elimina la fase superior, sobrenadante (fase de etanol). Se lava la fase inferior con etanol, se agita, se deja precipitar y se elimina el

sobrenadante. Este procedimiento se realiza cinco veces. El enfriamiento se logra con salmuera y se agrega hidróxido de sodio hasta que el pH sea 9,5. Después de la segunda y la cuarta etapas de precipitación, el precipitado se disuelve con agua. Después de la tercera etapa de precipitación, el precipitado se disuelve en agua y, opcionalmente, fosfato de hidrógeno disódico y fosfato de dihidrógeno sódico. La quinta etapa de precipitación se realiza con etanol absoluto.

- 5 La mezcla de sulfato de dextrano se bombea a través de un filtro a un recipiente de etanol, bajo enfriamiento con salmuera o agua de refrigeración (a aproximadamente 10 °C). La bomba se enjuaga con agua purificada, se agita y se deja para sedimentación. El sobrenadante de etanol se retira hacia un tanque y se agrega etanol absoluto al producto con agitación. La mezcla se enfría con agua de refrigeración.
- 10 El procedimiento de precipitación de la descripción anterior es un procedimiento preferido dentro de la producción de un sulfato de dextrano de acuerdo con las realizaciones. Sin embargo, son posibles variantes del procedimiento de precipitación, tal como la reducción o el aumento del número de etapas de precipitación. Aunque etanol es un alcohol preferido utilizado en el procedimiento de precipitación, se pueden utilizar otros alcoholes, tal como metanol.
- 15 En la etapa de centrifugación, la mezcla se mueve a una centrífuga. Después de la centrifugación, el centrifugado se retira. Se coloca en recipientes de plástico recubiertos con bolsas de plástico dobles. El centrifugado se disuelve en etanol. Luego, se centrifuga una vez más y el centrifugado se lava con etanol en la centrífuga.

El centrifugado se coloca en vasos de precipitado cubiertos con filtro en LAF 5 y luego los vasos de precipitado se colocan en un gabinete de secado al vacío. Después del secado, el polvo de sulfato de dextrano se pasa a través de un tamiz de 710 µm en recipientes de plástico recubiertos con bolsas de PE.

Para producir aproximadamente 10-13 kg del sulfato de dextrano de las realizaciones, normalmente se utilizan los siguientes materiales y cantidades.

25

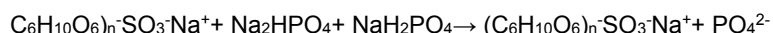
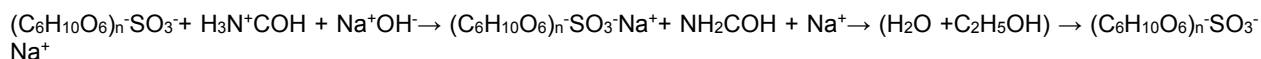
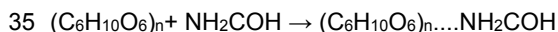
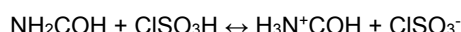
Componente	Fórmula	Cantidad (kg)
Dextrano 1 (Pharmacosomes A/S)	$(C_6H_{10}O_6)_n$	9,2
Formamida (Univar A/S)	NH_2COH	69,4
Ácido clorosulfónico (Merck-Schuchardt)	$ClSO_3H$	25,8
Hidróxido de sodio al 27,7 % (Chemark)	$NaOH$	20,7
Agua purificada	H_2O	
Etanol (Univar A/S)	C_2H_5OH	135
Dihidrato de fosfato de hidrógeno disódico (Merck)	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,2493
Dihidrato de fosfato de dihidrógeno sódico (Merck)	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,2144

Producto

Sulfato de dextrano sódico $(C_6H_{10}O_6)_n \cdot SO_3^- Na^+ Na^+$ ~10-13

30

Reacción principal durante la síntesis:



Otro aspecto de las realizaciones se refiere a un sulfato de dextrano de acuerdo con las realizaciones para su uso como un medicamento.

45

Otro aspecto de las realizaciones se refiere a un sulfato de dextrano de acuerdo con las realizaciones para su uso en diferentes aplicaciones médicas que incluyen su uso en la movilización de células progenitoras y/o madre en sangre periférica de un sujeto, incluida la movilización de células madre hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés) y/o células madre mesenquimales (MSC por sus siglas en inglés); su uso en la movilización de glóbulos blancos diana,

50

- en particular linfocitos, en el torrente sanguíneo de un sujeto; su uso en la reducción de captación pulmonar de células inyectadas de forma intravenosa en un sujeto; su uso en la inducción del factor de crecimiento hematopoyético (HGF por sus siglas en inglés) en un sujeto y su uso como un anticoagulante. El sulfato de dextrano de acuerdo con las realizaciones también es adecuado para su uso en el tratamiento, inhibición o prevención de diversas enfermedades
- 5 desmielinizantes, incluidas enfermedades desmielinizantes del SNC, tales como trastornos mielinoclásticos, p. ej., esclerosis múltiple (MS por sus siglas en inglés) y enfermedad de Devic, encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM por sus siglas en inglés), trastornos leucodistróficos, p. ej., neuropatías del SNC, mielolisis central pontina, mielopatías, leucoencefalopatías y leucodistrofias, y enfermedades desmielinizantes periféricas, tales como síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica y neuropatías periféricas.
- 10 El sulfato de dextrano de las realizaciones también puede ser útil para el tratamiento, inhibición y/o prevención de reacción inflamatoria instantánea mediada por sangre (IBMIR por sus siglas en inglés) y rechazo de injerto de órganos, tejidos y en particular implantes celulares, tales como islotes de Langerhans.
- 15 El sulfato de dextrano, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de las realizaciones se administra preferentemente por inyección al sujeto y, en particular, por inyección intravenosa (i. v.), inyección subcutánea (s. c.) o inyección intraperitoneal (i. p.), preferentemente inyección i. v. o s. c. Otras vías de administración parenteral que pueden utilizarse incluyen inyección intramuscular e intraarticular.
- 20 El sulfato de dextrano, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de las realizaciones se formula preferentemente como una solución de inyección acuosa con un disolvente o excipiente seleccionado. El disolvente es ventajosamente un disolvente acuoso y, en particular, una solución amortiguadora. Un ejemplo no taxativo de una solución amortiguadora tal es un tampón de ácido cítrico, tal como tampón de monohidrato de ácido cítrico (CAM), o un tampón de fosfato. Por ejemplo, el sulfato de dextrano de las realizaciones puede disolverse en solución salina, tal
- 25 como solución salina de NaCl al 0,9 % y luego, opcionalmente, puede tamponarse con CAM 75 mM, ajustando el pH a aproximadamente 5,9 utilizando hidróxido de sodio. También son posibles soluciones no amortiguadas, incluidas soluciones de inyección acuosas, tal como solución salina, es decir, NaCl (ac.). Además, se pueden utilizar otros sistemas amortiguadores diferentes de CAM o tampón de fosfato si se desea una solución tamponada.
- 30 Las realizaciones no se limitan a inyecciones y se pueden utilizar otras vías de administración de forma alternativa, incluidas vía oral, nasal, bucal, rectal, dérmica, traqueal, bronquial o tópica. El principio activo, sulfato de dextrano, luego se formula con un excipiente o vehículo adecuado que se selecciona en función de la vía de administración particular.
- 35 Los intervalos de dosis adecuados para el sulfato de dextrano de las realizaciones puede variar de acuerdo con el tamaño y el peso del sujeto, la afección por la cual se trata al sujeto y otras consideraciones. En particular para sujetos humanos, un intervalo de dosificación posible puede ser entre 1 µg/kg y 150 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre 10 µg/kg y 100 mg/kg de peso corporal.
- 40 En realizaciones preferidas, el sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, se formula para ser administrado en una dosificación en un intervalo entre 0,05 y 50 mg/kg de peso corporal del sujeto, preferentemente entre 0,1 y 40 mg/kg de peso corporal del sujeto, y más preferentemente entre 0,1 y 30 mg/kg o entre 0,1 y 15 mg/kg de peso corporal del sujeto.
- 45 La administración de sulfato de dextrano, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no tiene que estar necesariamente limitada al tratamiento de una afección médica presente sino que, alternativamente, o adicionalmente, puede ser utilizada para profilaxis.
- El sulfato de dextrano de las realizaciones puede administrarse en una sola ocasión de administración, tal como en
- 50 forma de una inyección de bolo única. La dosis de bolo puede inyectarse con bastante rapidez al paciente pero se infunde ventajosamente con el tiempo, de modo que la solución de sulfato de dextrano se infunde al paciente en unos pocos minutos de tiempo, tal como durante 5 a 10 minutos.
- Alternativamente, el sulfato de dextrano de la realización puede administrarse en múltiples, es decir, al menos dos,
- 55 ocasiones, durante un período de tratamiento. En general, para enfermedades agudas, la duración del período de tratamiento puede ser una sola administración, pero preferentemente es en forma de varias administraciones durante un período de tratamiento de, por ejemplo, una semana, algunas semanas o un mes. Los períodos de tratamiento más largos, de hasta tres meses o incluso un año, pueden mejorar aún más la curación y la recuperación.
- 60 El sujeto es un sujeto animal, preferentemente un sujeto mamífero y más preferentemente un sujeto humano.

EXPERIMENTOS

Caracterización de dextrano y sulfato de dextrano

5

El objetivo principal del estudio es caracterizar el nuevo sulfato de dextrano y comparar las diferencias físicas y químicas entre el sulfato de dextrano y otras moléculas de sulfato de dextrano similares.

Espectroscopía de NMR

10

En los experimentos de NMR, se utilizó un espectrómetro Varian *Inova 500 MHz* equipado con una sonda de resonancia triple 5 mm¹H/¹³C/¹⁵N. Se registraron los siguientes tipos de espectros utilizando versiones estándar de 1D¹H, 2D¹H gradiente-COSY (espectroscopía de correlación), ¹H-¹³C HSQC (espectroscopía de coherencia cuántica simple heteronuclear), ¹H-¹³C HMBC (espectroscopía de correlación heteronuclear de enlaces múltiples) y 2D¹H-¹H

15

ROESY (espectroscopía de efecto nuclear Overhauser de marco giratorio) con rotación adiabática correspondiente a un tiempo de mezclado de 200 milisegundos. Se utilizó un espectrómetro Varian *Inova 400 MHz* equipado con una sonda de gradiente intercambiable 5 mm¹H/¹³C (¹³C bobina interna) para registrar los espectros 1D¹³C. Los espectros se registraron a temperatura ambiente (25 °C). Los espectros de NMR 1D¹H cuantitativos se adquirieron utilizando un retraso de relajación total entre los escaneos de 60 segundos con un tiempo de adquisición de 3 segundos y un ancho de espectro de 14,5 ppm. La señal HDO residual fue referenciada a 4,75 ppm en la dimensión ¹H mientras que se utilizó referenciación indirecta al desplazamiento químico en la dimensión ¹³C utilizando las relaciones giroscópicas de ¹³C y ¹H.

20

Todos los espectros de NMR se procesaron y se analizaron con MestreNova 9.0.0. El procesamiento de los espectros 1D¹H se realizó utilizando un ensanchamiento de líneas 1 Hz Lorentzian y corrección de líneas base (Whitaker automático o una función polinómica de orden 3). La integración se realizó utilizando el "modo pico" de MestreNova de espectros 1D utilizando las siguientes regiones como informantes para diversos elementos estructurales:

25

Área (intervalo en ppm)	Átomos de interés en el área (los picos pueden estar presentes o no)
6,11 .. 5,93	extremo C1 sulfatado en configuración α
5,63 .. 5,50	extremo C1 no sulfatado en configuración α al lado de C2 sulfatado
5,43 .. 5,22	no extremo C1 al lado de C2 sulfatado + extremo C1 no sulfatado en configuración α al lado de C2 no sulfatado
5,17 .. 4,87	no extremo C1 al lado de C2 no sulfatado + extremo C1 sulfatado en configuración β
4,70.. 3,54	C2-C6 (ambos sulfatados y no sulfatados)

30

Los espectros 2D HSQC se sometieron a funciones cuadradas sinusoidales puras en ambas dimensiones, y se realizó la integración de áreas espectrales rectangulares seleccionadas, véase la figura 5.

	Intervalo de desplazamiento químico de ¹ H	Intervalo de desplazamiento químico de ¹³ C
grupo H1/C1	6,30 - 4,40 ppm	105,2 - 86,2 ppm
H2/C2, H3/C3, H4/C4 sulfatados	4,84 - 3,77 ppm	85,4 - 73,0 ppm
H5/C5, H6/C6 y no sulfatado	4,56 - 3,08 ppm	72,6 - 58,3 ppm
H2/C2, H3/C3, H4/C4 (2 áreas)	3,77 - 3,08 ppm	77,8 - 72,6 ppm

Materiales y sustancias químicas de NMR

Nombre	N.º de código	Lote	Pureza D	Proveedor
D ₂ O	166301000	A0319250	99,8%	Acros Organics,CAS 7789-20-0
D ₂ O	151882-1006	STBD4348V	99,9%	Sigma Aldrich,CAS 7789-20-0

Tubos Wilmad NMR, diámetro 5 mm, Z565229-100EA, lote 3110

5

Validación del experimento

Para evaluar el rendimiento del ensayo de grupo extremo basado en NMR, se realizaron experimentos de NMR de 1D¹H en una serie de estándares de peso molecular de dextrano disponibles en el mercado utilizando un conjunto de parámetros para análisis completamente cuantitativos (retraso de reciclaje de 60 s). En particular, los estándares de dextrano se utilizan comúnmente como estándares para la determinación del tamaño molecular de sulfato de dextrano ya que no hay ningún estándar de tamaño molecular de sulfato de dextrano disponible.

Estándar de dextrano 1000 (n.º de producto 31416, Fluka, n.º de lote BCBM6794V, n.º de CAS 9004-54-0) obtenido de *Leuconostoc Mesenteroides*; estándar analítico para GPC, M_w1000 Da.

Estándar de dextrano 5000 (n.º de producto 31417, Fluka, n.º de lote BCBL9398V, n.º de CAS 9004-54-0) obtenido de *Leuconostoc Mesenteroides*; estándar analítico para GPC, M_w5000 Da.

Estándar de dextrano 12000 (n.º de producto 31418, Fluka, n.º de lote BCBN0032V, n.º de CAS 9004-54-0) obtenido de *Leuconostoc Mesenteroides*; estándar analítico para GPC, M_w12000 Da.

La tabla 1 a continuación compara los valores de M_n(en Da) obtenidos de las mediciones de espectroscopía de NMR con los valores de M_n obtenidos del proveedor. La tabla también enumera los valores de M_w y M_p (en Da) según lo obtenido del proveedor.

Tabla 1 - parámetros de peso molecular para estándares de dextrano

Estándar de dextrano	M _n (NMR)	M _n (proveedor)	M _w (proveedor)	PDI	M _p (proveedor)
1000	1055	1010	1270	1,26	1080
5000	2850	3260	5220	1,60	4440
12000	8105	8110	11600	1,43	9890

Hay una buena concordancia entre los valores de M_n según lo medido utilizando espectroscopía de NMR con los datos obtenidos del proveedor. Los valores de M_n medidos mediante espectroscopía de NMR corresponden a 6,4, 17,4 y 49,9 unidades de glucosa, respectivamente, para los tres estándares de dextrano.

Caracterización de NMR del material de partida de dextrano

35

Se realizó un estudio de espectroscopía de NMR en el material de partida de dextrano utilizado para producir sulfato de dextrano de las realizaciones. El dextrano (Pharmacosmos, dextrano 1, n.º de lote 345349) es producido por la enzima dextrano sacarosa de *Leuconostoc Mesenteroides* B512F.

Se preparó una muestra de NMR del dextrano en D₂O y se analizó detalladamente mediante espectroscopía de NMR 2D¹H/¹³C. Se obtuvo una designación de desplazamiento químico de ¹H/¹³C casi completa de un conjunto de espectros de NMR 2D adquiridos a 25 °C en D₂O, véase la tabla 2. Los resultados indican que el dextrano está esencialmente ramificado, es decir, consiste casi exclusivamente en anillos de glucosa unidos junto con enlaces α-(1→6)-glucósido. No se puede observar ninguna ramificación α-(1→3)-glucósido, lo que implica que cualquier ramificación tal es inferior al 0,5 %. Además, los datos muestran que la ramificación general es del <1 %, incluidas la ramificación α-(1→2)-, α-(1→3) y α-(1→4).

Tabla 2 - asignación de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C del dextrano 1 (25 °C, D_2O)

	Intensidad relativa		Desplazamientos químicos (ppm)					
			1	2	3	4	5	6
Unidad de glucosa media (no ramificado) $\alpha(1\rightarrow6)\times 2$	58 %	^1H	4,95	3,55	3,70	3,49	3,89	3,95, 3,74
		^{13}C	97,7	71,3	73,2	69,5	70,1	65,5
Unidad de glucosa de extremo C1 con configuración β de C1	12 %	^1H	4,65	3,23	3,46	3,62	3,50	3,94
		^{13}C	96,0	74,0	75,9	74,1	69,4	65,5
Unidad de glucosa de extremo C1 con configuración α de C1	8 %	^1H	5,21	3,51	3,68	3,49	3,99	3,99, 3,68
		^{13}C	92,1	69,9	72,9	69,5	69,9	65,7
Unidad de glucosa de extremo C6 con configuración α de C1	22 %	^1H	4,94	3,53	3,69	3,40	3,69	3,83, 3,74
		^{13}C	97,6	71,3	71,8	69,4	73,0	60,4
Sistema de rotación no identificado	<0,1 %	^1H	5,30					
		^{13}C	99,2					

Particularmente, el anillo de glucosa terminal con un carbono anomérico libre (anillo terminal C1) existe tanto en la configuración α (42 %) como en la configuración β (58 %) según los desplazamientos químicos de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ observados. Se determinó que el número promedio de unidades de glucosa en cada molécula de dextrano es de 5,1 unidades de glucosa utilizando los valores integrales de los diversos grupos H1 en el espectro $1\text{D}^1\text{H}$, y se determinó que el peso molecular promedio es de 852 Da. Se determinó que el grado de ramificación es inferior al 1 %. La figura 1 ilustra una expansión del espectro $1\text{D}^1\text{H}$ enfocada en la región con las señales de dextrano.

Caracterización de NMR de sulfato de dextrano

En el presente estudio, se compararon tres lotes (n.º de lotes 1, 2 y 3) del sulfato de dextrano de las realizaciones con tres productos de sulfato de dextrano obtenidos de TdB Consultancy: sulfato de dextrano 5 LS (n.º de producto DB005, n.º lote 20288, con sulfatación baja, peso molecular 5 kDa), sulfato de dextrano 5 HS (n.º de producto DB004, n.º de lote 20281 y 20300, con sulfatación alta, peso molecular 5 kDa) y sulfato de dextrano 3 (n.º de lote 20341, con sulfatación alta, peso molecular 3 kDa).

Muestras de NMR

PN004-83-01	La muestra de NMR se preparó mediante la disolución de 33,91 mg del lote n.º 1 de sulfato de dextrano de las realizaciones en D_2O 500 μl .
PN004-83-02	La muestra de NMR se preparó mediante la disolución de 49,80 mg del lote n.º 2 de sulfato de dextrano de las realizaciones en D_2O 500 μl .
PN004-83-03	La muestra de NMR se preparó mediante la disolución de 35,45 mg del lote n.º 3 de sulfato de dextrano de las realizaciones en D_2O 500 μl .
PN004-95-01	Las muestras de NMR se prepararon mediante a disolución de 34 mg de sulfato de dextrano 3 de TdB Consultancy AB (n.º de lote 20341) en D_2O 520 μl .
PN004-95-02	Las muestras de NMR se prepararon mediante a disolución de 54,4 mg de sulfato de dextrano 5 LS de TdB Consultancy AB (n.º de lote 20228) en D_2O 520 μl .
PN004-33-03	Las muestras de NMR se prepararon mediante a disolución de 54,4 mg de sulfato de dextrano 5 HS de TdB Consultancy AB (n.º de lote 20281) en D_2O 520 μl .
PN004-33-02	Las muestras de NMR se prepararon mediante a disolución de 54,4 mg de sulfato de dextrano 5 HS de TdB Consultancy AB (n.º de lote 20300) en D_2O 520 μl .

Comentarios generales sobre NMR

El sulfato de dextrano consiste en una distribución de moléculas similares pero no idénticas con diversos patrones de sulfato, ramificaciones y tamaños así como diferencias en la química y la configuración del grupo extremo. Esto genera análisis estructurales desafiantes. Los espectros de NMR de sulfato de dextrano son complejos; véase la figura 2 que ilustra una comparación de espectros de NMR $1\text{D}^1\text{H}$ del material de partida de dextrano y sulfato de dextrano. Por este motivo, es posible que sea necesario utilizar también datos cuantitativos de los espectros 2D aunque el

rendimiento cuantitativo de NMR 2D normalmente sea menos exacto y preciso en comparación con técnicas cuantitativas de NMR de 1D¹H.

Existen algunas publicaciones sobre NMR con respecto a esta tema (Neville y et al., J. Pharm. Sci., 80(3): 239-244 (1991) and Ludwig-Baxter et al., J. Pharm. Sci., 80(7): 655-660 (1991)). En glucosa sulfatada, los desplazamientos químicos de ¹H, en general, se desplazan hacia abajo (mayores desplazamientos químicos) cada vez más con la distancia a cada grupo de sulfato introducida. Por otra parte, los desplazamientos químicos de ¹³C se comportan de manera diferente y el efecto depende de cuántos enlaces covalentes haya entre los grupos de carbono y de sulfato. El desplazamiento químico de ¹³C de un carbono aumenta con 4-10 ppm si el sulfato se une a ese carbono, mientras que si un sulfato se une a un carbono adyacente, el efecto del desplazamiento químico es menor pero opuesto. Para los grupos de sulfato unidos a carbonos más alejados, el efecto es normalmente mínimo. Se esperan efectos similares sobre los desplazamientos químicos de ¹³C tras la ramificación. En resumen, los desplazamientos químicos de ¹³C son informantes más útiles ya que dependen principalmente de la geometría local, tal como ángulos diedros, así como los tipos de átomos unidos de forma covalente cercanos (normalmente a 2-4 enlaces de distancia).

Caracterización de grupos extremo

En comparación con el dextrano, los espectros de NMR de sulfato de dextrano son más complejos debido a la cantidad significativamente mayor de señales de NMR que se originan a partir de diversos entornos químicos para todas las combinaciones de C2, C3 y C4 sulfatados/no sulfatados así como los grupos extremo C1 y C6.

Los grupos extremo C1 (carbono anomérico libre) se pueden analizar con más facilidad que los grupos extremo C6 debido a las características espectrales, incluso si el grupo extremo C1 está complicado, por ejemplo, por la superposición entre los picos de C1 sulfatado en la configuración β y el grupo no extremo C1 sin C2 sulfatado. La señal de agua residual grande ubicada en la región C1 de los espectros 1H también complica el análisis.

La figura 3 ilustra un espectro de HSQC 2D¹³C-¹H de sulfato de dextrano del lote n.º 1 a 25 °C recubierto con el espectro correspondiente del material de partida de dextrano (dextrano 1). La figura ilustra la asignación tentativa de cada grupo H1/C1 a un estado de sulfatación específico. La figura indica picos que pertenecen a la unidad de glucosa de extremo C1 y picos que pertenecen al medio abundante y anillos de glucosa de extremo C6. Se ignoran los efectos debido a posible sulfatación de C6 en anillos de glucosa de extremo C6.

La figura 4 ilustra el espectro de NMR 1D¹H de sulfato del lote n.º 3 a 25 °C. Esta figura ilustra la asignación tentativa de cada pico H1 a un estado de sulfatación específico. La figura indica picos que pertenecen a la unidad de glucosa de extremo C1 y picos que pertenecen al medio abundante y anillos de glucosa de extremo C6. La asignación es tentativa, en particular con respecto a la sulfatación de C3 y C4, y esos efectos debido a posible sulfatación de C6 en anillos de glucosa de extremo C6 se ignoran.

La figura 6 ilustra una comparación del región de sulfato de dextrano en espectros de NMR 1D¹H de sulfato de dextrano de los lotes n.º 1-3 a 25 °C.

Todas las muestras de TdB, excepto el sulfato de dextrano con baja sulfatación, se modifican en el extremo C1. Los desplazamientos químicos de NMR de ¹³C de C1 son de alrededor de 74-80 ppm. Esto indica que la modificación debe implicar una sustitución del grupo hidroxilo y que el grupo de reemplazo no se une mediante oxígeno. Por ende, esta modificación de C1 no es un sulfato o fosfato, y tampoco puede ser un cloro considerado a partir de los desplazamientos químicos.

Tabla 3 - características del grupo extremo C1

Muestra de sulfato de dextrano	Configuración α del grupo extremo C1	Configuración β del grupo extremo C1	Grupo extremo C1 modificado
Sulfato de dextrano 3	-	-	>98 %
Sulfato de dextrano 5 LS	26 %	74 %	No observado
Lote n.º 20281 de sulfato de dextrano 5 HS	-	-	>98 %
Lote n.º 20300 de sulfato de dextrano 5 HS	-	-	>98 %

Lote n.º 1 de sulfato de dextrano	46 %	54 %	No observado
Lote n.º 2 de sulfato de dextrano	49 %	51 %	No observado
Lote n.º 3 de sulfato de dextrano	51 %	49 %	No observado

Ramificación

Los datos no excluyen que la ramificación del dextrano esté presente en las muestras de sulfato de dextrano. Sin embargo, si hay alguna ramificación tal, es a niveles muy bajos, <1-2 %.

Grado de sulfatación y otras modificaciones químicas de sulfato de dextrano

La sulfatación se ha determinado utilizando primariamente datos de HSQC de ^1H - ^{13}C 2D complementados con datos de NMR de $1\text{D}^1\text{H}$. Con respecto al grado total de sulfatación de C2, C3 y C4, se puede obtener un estimado de la integración de picos 2D en el espectro de HSQC ^1H - ^{13}C . Los estimados de los niveles de sulfato de C2 y C3 individuales promedio se estiman a partir de datos de 1D y 2D combinados utilizando picos de C1 como informantes en estos tres vecinos. La sulfatación de C4 no se puede determinar pero utilizando los datos de la sulfatación de C2-C4 general, el grado promedio de sulfatación de C4 debe ser considerablemente inferior, definitivamente el <70 %.

Tabla 4 - Grado de sulfatación de sulfato de dextrano

Muestra de sulfato de dextrano	Sulfatación de C2-C4 ^Y	Sulfatación Individual			Sulfatación del grupo extremo α -C1	Sulfatación del grupo extremo β -C1	Sulfatación del grupo extremo C6
		C2	C3	C4			
Sulfato de dextrano 3	68 % (2,0)	89 %	SD	SD	SD*	SD*	83 %
Sulfato de dextrano 5 LS	35 % (1,1)	42 %	26 %	SD	13 %	74 %	73 %
Lote n.º 20281 de sulfato de dextrano 5 HS	65 % (2,0)	93 %	~50 %	SD	SD*	SD*	82 %
Lote n.º 20300 de sulfato de dextrano 5 HS	76 % (2,3)	>95 % [†]	~50 %	SD	SD*	SD*	SD
Lote n.º 1 de sulfato de dextrano	80 % (2,4)	>95 %	~86 %	SD	41 %	>95 %	96 %
Lote n.º 2 de sulfato de dextrano	76 % (2,3)	>95 %	~85 %	SD	16 %	93 %	89 %
Lote n.º 3 de sulfato de dextrano	79 % (2,36)	>95 %	~86 %	SD	30 %	83 %	91 %
No determinado debido al extremo C1 modificado. † Sólo el valor estimado como integración exacta se evitó debido a la superposición espectral Y Dado en porcentaje y número total de							

sulfatos por unidad de C2-C4

Además de la investigación de la sulfatación de C2-C4, en la tabla 4 anterior también se describe la caracterización del grado de sulfatación de los grupos extremo. Particularmente, la sulfatación es considerablemente mayor si el grupo extremo β -C1 está presente, coherente con menos impedimento estérico con sulfato en una posición ecuatorial.

5

Tener en cuenta que las configuraciones α y β están en equilibrio mediante el estado de aldehído abierto que, sin embargo, no se observa fácilmente sino que siempre está presente a niveles muy bajos.

Tamaño y peso molecular

10

Todos los certificados de análisis para los diversos lotes de sulfato de dextrano investigados informan M_w como la medida de tamaño molecular. Además, se han determinado datos de dispersión de luz, véase el anexo 1, en los lotes de sulfato de dextrano n.º 1-3 que informan M_w y M_n . Los datos de NMR actuales proporcionan M_n como salida en función principalmente del análisis de grupo extremo, es decir, la proporción entre las áreas de pico de los grupos

15

extremo contra las de grupos medios (áreas de pico de NMR). El número promedio de unidades de glucosa se determina en el material de partida de dextrano y se confirma que es completamente coherente con los datos de NMR en el lote de sulfato de dextrano correspondiente.

Tabla 5 - características de tamaño molecular en Da de muestras de sulfato de dextrano

20

Muestra de sulfato de dextrano	N.º promedio de unidades de glucosa	N.º de sulfato promedio por unidad de glucosa	M_n (sin Na^+)	M_n (con Na^+)
Sulfato de dextrano 3	3,5	2,3	1223	1406
Sulfato de dextrano 5 LS	5,1	1,3	1378	1531
Lote n.º 20281 de sulfato de dextrano 5 HS	5,1	2,1	1706	1954
Lote n.º 20300 de sulfato de dextrano 5 HS	5,1	2,4	1827	2109
Lote n.º 1 de sulfato de dextrano	5,1	2,7	1957	2276
Lote n.º 2 de sulfato de dextrano	5,1	2,6	1891	2192
Lote n.º 3 de sulfato de dextrano	5,1	2,7	1929	2241

Los datos de las muestras de sulfato de dextrano (excepto sulfato de dextrano 3) son completamente coherentes con un tamaño molecular promedio de ~5 unidades de glucosa por molécula de sulfato de dextrano.

25 Tabla 6 - Comparación de datos de peso molecular en Da de diferentes técnicas

Muestra de sulfato de dextrano	M_w (certificado de análisis)	M_w (dispersión de luz)	M_n (dispersión de luz)	M_n (NMR)
Sulfato de dextrano 3	3300			1406
Sulfato de dextrano 5 LS	3200			1531
Lote n.º 20281 de sulfato de dextrano 5 HS	4016			1954
Lote n.º 20300 de sulfato de dextrano 5 HS	4645			2109
Lote n.º 1 de sulfato de dextrano	5699	2757	2487	2276
Lote n.º 2 de sulfato de dextrano	5897	3999	3192	2192
Lote n.º 3 de sulfato de dextrano	7118	9713	6757	2241
M_w (certificado de análisis) se obtuvo utilizando SEC				

Esta gran discrepancia entre el parámetro de peso molecular, según lo determinado mediante NMR, y los otros parámetros de peso molecular enumerados en la tabla 6 puede explicarse por el hecho de que el peso molecular de sulfato de dextrano se determina normalmente utilizando procedimientos más indirectos como cromatografía de exclusión/penetración en gel, dispersión de luz o viscosidad. En cambio, todos estos procedimientos informan sobre el tamaño molecular. Esto significa que si las moléculas de sulfato de dextrano forman diversos agregados o complejos, se determina un mayor peso molecular aparente.

Estos procedimientos indirectos más bien informan sobre la forma y el volumen molecular, los cuales pueden diferir significativamente no sólo de un lote a otro, sino también de una muestra a otra dentro del mismo lote, dependiendo, por ejemplo, de cómo se ha almacenado el material de sulfato de dextrano, de cómo se prepara antes de la medición, etc.

Caracterización estructural exhaustiva de sulfato de dextrano

En función de un análisis detallado de una serie de datos de NMR 1D y 2D adquiridos en el lote de sulfato de dextrano n.º 3, se realizó un serio intento de entender mejor el patrón de sulfatación en una resolución atómica de esta muestra de sulfato de dextrano. Dada la gran similitud de los espectros de HSQC 1D¹H y 2D¹³C-1H con los lotes de sulfato de dextrano n.º 1 y 2, se asume que los hallazgos presentados en esta sección son válidos para lotes de sulfato de dextrano de las realizaciones en general.

Grado general de sulfatación y composición de muestra

A partir de una perspectiva general, el espectro de HSQC ¹³C-1H permite determinar un estimado relativamente preciso del grado de sulfatación, véase la figura 7. El lote de sulfato de dextrano n.º 3 tiene en promedio 2,4±0,1 grupos de sulfato por unidad de glucosa en las posiciones C2, C3 y C4. Cada pico en la figura 7 corresponde al enlace C-H con diferente entorno químico. Las áreas de pico corresponden aproximadamente a la población de cada enlace C-H. Se observan tres áreas distintas que permiten cuantificar el grado general de sulfatación de dextrano. En la parte superior, se alinea la región correspondiente del espectro 1D¹H.

Utilizando un valor promedio de 2,66 sulfatos por unidad de glucosa y 5,1 unidades de glucosa, el % de peso calculado de azufre es de aproximadamente el 19 %, asumiendo que la muestra consiste en sulfato de dextrano al 100 %.

Investigación de sulfatación en C2, C3 y C4

Debido a las regiones altamente superpuestas, los patrones de sulfatación se estudian casi exclusivamente utilizando los desplazamientos químicos de ¹H/¹³C y las áreas de pico correspondientes de los grupos H1/C1 ubicados en diferentes tipos de unidades de glucosa. En función de las asignaciones de desplazamiento químico de ¹H/¹³C de dextrano, los datos bibliográficos y, sobre todo, los datos de NMR 2D adquiridos, se asignaron tentativamente señales de H1/C1 a grupos C1 específicos con diversos entornos químicos y grados de sulfatación. Esta asignación se ilustra en las figuras 3 y 4.

En función de las asignaciones y la medición de picos de 1D¹H e integrales de pico asociados, parece que la población de la configuración del grupo C1 anomérico de la glucosa de extremo C1 ha cambiado a una proporción 0,49:0,51 más igual, para la configuración α:β, asumiendo que la longitud promedio del propio dextrano no ha cambiado tras el procedimiento de sulfatación química. El grupo α-C1 libre se sulfata al -30 %, mientras que se estima que el grado de sulfatación de β-C1 es significativamente mayor y de alrededor del 83 %.

Con respecto a la determinación del grado de sulfatación de C2, C3 y C4, el análisis es más fácil para C2, que está definitivamente muy sulfatado al >95 %, y asumiendo que la proporción se estima de forma correcta para la configuración α:β de la glucosa de extremo C1, el grado de sulfatación se calcula al -99 %. C3 se sulfata al 82 % para las unidades de glucosa C1 implicadas en enlaces glicosídicos α(1→6), es decir, anillos medios y de extremo C6, así como unidades de glucosa de extremo C1 con C1 libre. Para las unidades de glucosa de extremo C1 con C1 sulfatado, la sulfatación de C3 parece mayor, el -86 %. El cálculo de la cantidad de sulfatos por C4 es más difícil, pero utilizando la proporción general de 2,4 sulfatos por anillo de glucosa y el 99 % de sulfatación para C2, 82 % de sulfatación para C3, se estima que el grado de sulfatación es del -60 %.

Caracterización de NMR de dextrano y sulfato de dextrano de Meito

Utilizando la metodología de NMR y HSQC de 1D¹H y 2D¹³C-1H previamente establecida para la caracterización

estructural de dextrano y sulfato de dextrano, se investigaron muestras de dextrano y sulfato de dextrano obtenidos de Meito Sangyo Co., Ltd.

Muestras de NMR

5

PN004-99-04	La muestra de NMR se preparó mediante la disolución de 43,4 mg de dextrano de Meito Sangyo Co., Ltd. (n.º de lote TL-2385) en D ₂ O 520 µl.
PN004-99-05	La muestra de NMR se preparó mediante la disolución de 58,7 mg de azufre 18 de sulfato de dextrano de Meito Sangyo Co., Ltd. (n.º de lote N-3188)) en D ₂ O 520 µl.

Resultados de NMR

Se determinó que el número promedio de unidades de glucosa en el dextrano es de 11,7 con un M_n de 1920 Da. Se determinó que el M_n de azufre 18 de sulfato de dextrano se encontraba dentro de 4120 y 4200 Da excluyendo cualquier contraión de sodio y dentro de 4710 y 4790 Da con el contraión de sodio. El grado del grupo extremo C1 en la configuración α fue 59 % y se estima que el grado de ramificación es 4,8 %.

Se determinó que el grado de sulfatación de las posiciones C2-C4 es 76 % (2,29 grupos de sulfato por unidad de glucosa). Se estimó que el grado de sulfatación de la posición C2 es 93 %. El grado del grupo extremo C1 en la configuración α fue 71 % y el grado de sulfatación de los grupos extremo α-C1 fue 83 %. El grado de sulfatación del grupo extremo C1 en la configuración β fue >90 %. No se detectaron modificaciones químicas de los grupos extremo C1 además de la sulfatación.

20 Comparaciones de los efectos biológicos de diferentes moléculas de sulfato de dextrano

Los presentes estudios comparan diversos efectos biológicos de las diferentes moléculas de sulfato de dextrano, lo que demuestra que el sulfato de dextrano de las realizaciones tiene efectos biológicos superiores sin ser tóxico.

Comparación de la movilización de las células hematopoyéticas según el peso molecular del sulfato de dextrano de pesos moleculares promedio diferentes

Animales

Se mantuvieron ratones DBA/2Ola hembra (Harlan, Holanda) en el establecimiento de animales en la Universidad de Uppsala en condiciones estándar y se les proporcionó alimento y agua *adlibitum*. Se usaron los animales con un peso de 17-22 g.

Diseño experimental

Se agruparon las hembras DBA/2 en cuatro grupos: 1) vehículo (NaCl ac.) (n=8), 2) 50 mg/kg de sulfato de dextrano 3, DS3, (n=5), 3) 50 mg/kg de lote de sulfato de dextrano n.º 3 (n=5) y 4) 50 mg/kg de lote de sulfato de dextrano n.º 3, PNB, (n=5). El grupo 4) se sedó con pentobarbital sódico (PNB) en lugar de isoflurano, para evaluar si un cambio en el protocolo de anestesia afectaba la movilización.

40 Administración de la sustancia

Se disolvieron sulfato de dextrano de las realizaciones (lote n.º 3) y sulfato de dextrano 3 (TdB Consultancy, lote n.º 20341, DS3) en NaCl al 0,9 % (Fresenius Kabi) hasta 20 mg/mL y se filtraron a través de un filtro de 20 µm para obtener una solución estéril. Los animales recibieron 2,5 mL/kg (ap. 50 µL) por vía intravenosa a través de la vena de la cola.

Análisis hematológico

Los resultados se muestran en la figura 8 y la tabla 7. El sulfato de dextrano 3 no mostró ninguna alteración significativa de los WBC o los linfocitos generales, mientras que se informó una ligera disminución de los neutrófilos.

Tabla 7 - Variables hematológicas en sangre periférica después de la administración de sustancias de sulfato de dextrano

	Unidad	Vehículo	DS3	DS lote n.º 3	DS lote n.º 3
--	--------	----------	-----	---------------	---------------

					PNB
Plaquetas	10 ⁹ /L	943±40	925±30	950±31	980±11
Hemoglobina	g/L	128±2	128±4	129±3	135±2*
Eritrocitos	10 ¹² /L	10±0,1	9,6±0,2	9,7±0,2	10,1±0,2*
Hematocrito (EFV)		0,42±0,005	0,42±0,008	0,43±0,008	0,44±0,01*
MCV	fL	44±0,3	44±0	44±0,4	44±0,3
MCHC	g/L	308±1	302±6	305±1	304±4
Reticulocitos	10 ⁹ /L	3±0,4	3±0,4	4±0,6	4±0,4
Leucocitos (WBC)	10 ⁹ /L	3±0,2	3,0±0,4	10,1±1,0***	8,5±0,7***
Neutrófilos	10 ⁹ /L	1,0±0,1	0,7±0,1*	1,4±0,2*	0,8±0,2
Eosinófilos	10 ⁹ /L	0,1±0,02	0,1±0	0,1±0	0,1±0
Basófilos	10 ⁹ /L	0,1±0	0,1±0	0,1±0	0,1±0
Linfocitos	10 ⁹ /L	2±0,1	2,2±0,4	8,5±0,9***	7,4±0,7***
Monocitos	10 ⁹ /L	0,05±0,02	0,02±0,02	0,1±0	0,06±0,02
Tiempo de la muestra de sangre después de DS	min	31±0,3	32±0,4	31±0,2	33±1,4
MVC(por sus siglas en inglés)=volumen corpuscular medio; MCHC (por sus siglas en inglés)=concentración media de hemoglobina corpuscular variables hematológicas comparadas con el vehículo (NaCl): *p < 0,05, **p < 0,01. ***p < 0,001					

El sulfato de dextrano 3 no indujo un aumento significativo en la cantidad de CFC, como se muestra en la figura 9. El lote n.º 3 de sulfato de dextrano indujo un aumento significativo de HGF independientemente del uso de anestesia, mientras que la sustancia 3 de menor peso molecular no mostró un aumento significativo en HGF, véase la figura 10.

- 5 Los datos presentados aquí muestran que el sulfato de dextrano 3 es un agente de movilización deficiente en comparación con el sulfato de dextrano de las realizaciones. El sulfato de dextrano 3 no aumentó HGF en ningún grado más allá del vehículo.

10 **Comparación del tratamiento preventivo con sulfatos de dextrano de peso molecular en EAE crónica inducida por MOG₁₋₁₂₅**

El objetivo de este estudio fue comparar los efectos del tratamiento preventivo de un sulfato de dextrano de las realizaciones (lote n.º 3) con el sulfato de dextrano 5 HS (TdB Consultancy, lote n.º 20300) en encefalomiелitis autoinmunitaria experimental inducida por MOG₁₋₁₂₅ (EAE).

15 **Animales**

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del Instituto Nacional de Salud (NIH) para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, y fueron aprobados por la Junta Nacional de Experimentos con Animales de Finlandia. En total se utilizaron en los experimentos 90 ratas Dark Agouti, de 120-170 g de peso, adquiridas en Harlan Laboratories, RU. Los animales se colocaron en jaulas a temperatura estándar (22 ± 1 °C) y en un ambiente con luz controlada (luces encendidas de 7 a. m. a 8 p. m.) con acceso ad libitum a alimentos (Harlan 2016) y agua. Los animales se agruparon de la siguiente manera:

Grupo 1: 15 ratas con EAE tratadas s.c. una vez al día, tres veces por semana con vehículo (solución salina) comenzando el día 0 después de la inoculación de MOG EAE y se continuó de acuerdo con el programa de dosificación hasta el final.

Grupo 2: 15 ratas con EAE tratadas s.c. una vez al día, tres veces por semana con sulfato de dextrano 5 HS (TdB Consultancy, lote n.º 20300) (30,0 mg/kg) comenzando el día 0 después de la inoculación y se continuó de acuerdo con el programa de dosificación hasta el final.

30 Grupo 3: 15 ratas con EAE tratadas s.c. una vez al día, tres veces por semana con sulfato de dextrano de acuerdo con las realizaciones (lote n.º 3) (30,0 mg/kg) comenzando el día 0 después de la inoculación y se continuó de acuerdo con el programa de dosificación hasta el final.

35 **Inducción y puntuación clínica de EAE**

Se indujo EAE mediante la administración de 100 µL de inóculo por vía intradérmica en la base de la cola. El inóculo consistía en 20 µg de MOG₁₋₁₂₅ recombinante (NordicBioSite) en PBS (0,01 M) emulsionado con adyuvante incompleto de Freund (IFA) (Sigma F5506) (1:1) que contenía 200 µg de Mycobacterium tuberculosis inactivada por calor (cepa H 37 RA; Difco, Detroit, MI).

La puntuación clínica se realizó todos los días durante los 36 días del estudio, comenzando en el día 0 y continuando hasta el día 35 de criterio de valoración. La puntuación clínica se realizó cegada durante el transcurso del estudio y de acuerdo con los Principios de Puntuación Clínica que se enumeran a continuación.

5

Puntuación	Manifestaciones
0	Normal
0,5	Debilidad parcial de la cola
1,0	Parálisis completa de la cola (toda la cola arrastrada)
2,0	Debilidad parcial en una extremidad (por lo general, miembro posterior)
2,5	Parálisis completa en una extremidad - (no se conserva el movimiento en la extremidad afectada).
3,0	Debilidad parcial en ambos miembros posteriores
3,5	Parálisis completa en ambos miembros posteriores (sin movimiento en miembros posteriores) o debilidad parcial en las extremidades de un lado del cuerpo (hemiparesia).
4	Debilidad parcial en las cuatro extremidades o debilidad completa en un lado del cuerpo (hemiplejia).
5	Parálisis completa de las cuatro extremidades (tetraplejia), moribundo.

El índice acumulativo de enfermedad (CDI por sus siglas e inglés) se indica como carga acumulativa de enfermedad, la suma de los valores de la puntuación clínica, durante el transcurso del estudio. El inicio de la enfermedad (DO por sus siglas en inglés) indica el día del estudio cuando los síntomas visibles de EAE se observaron por primera vez

10 (valor de la puntuación clínica $\geq 0,5$).

Todas las ratas del estudio recibieron los sulfatos de dextrano o el vehículo correspondiente entre los días 0 y 34 de acuerdo con el siguiente programa de dosificación:

El grupo 1 recibió el vehículo (solución salina, 9 mg/ml, Baxter) administrado por vía subcutánea (s.c.) tres veces por semana (lun-mié-vie) entre 7-11 a. m. El volumen de dosificación para el vehículo fue 5,0 ml/kg. La administración del

vehículo se inició el día 0 después de la inducción de MOG EAE y continuó hasta el día del estudio 32 o el día del estudio 33 dependiendo del día de la semana de la inducción y el programa de dosificación.

El grupo 2 recibió sulfato de dextrano 5 HS (TdB Consultancy, lote n.º 20300) con la dosis de 30,0 mg/kg administrada por vía subcutánea (s.c.) tres veces por semana (lun-mié-vie) entre 7-11 a.m. El volumen de dosificación fue 5,0 ml/kg. La administración se inició el día 0 después de la inducción de MOG EAE y continuó hasta el día del estudio 32 o el día del estudio 33 dependiendo del día de la semana de la inducción y el programa de dosificación.

Recolección de tejido y plasma de criterio de valoración

En el criterio de valoración, en el día 35, todas las ratas se anestesiaron profundamente con pentobarbital (Mebunat®, 60 mg/ml, Orion Pharma). Después de esto, se recolectaron muestras de sangre mediante punción cardíaca. Se recolectó un total de 800-1000 µl de sangre en microtubos de Li-heparina y se centrifugaron con 2000 x G durante 10 minutos a +4 °C. Se recolectaron dos alícuotas de 200 µl de plasma en dos tubos de polipropileno de matriz de recolección de plasma separada, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta su uso para análisis

posteriores.

Para las muestras histológicas, se perfundieron las ratas de forma transcardiaca durante 10 min con solución salina heparinizada fría (2,5 IU/ml) seguida de perfusión de al menos 10 min con paraformaldehído al 4 % frío en amortiguador de fosfato 0,1 M. El cerebelo y el resto del cerebro y los segmentos C y T de la médula espinal (1 cm cada uno) fueron extirpados y fijados posteriormente por inmersión en paraformaldehído al 4 % en amortiguador de fosfato 0,1 M a +4 °C durante al menos 24 h. Después, se cambiaron las muestras a PBS 0,01 M que contenía azida de sodio al 0,001 % (Sigma) como conservantes, se almacenaron a +4 °C hasta su uso para posibles análisis histológicos.

Estado general de salud y criterios de valoración humanos

45

Se monitorizaron los animales dos veces al día por el personal del laboratorio (8 a. m. y 4 p. m.). En el caso de que el estado de salud general del animal empeorara significativamente, la rata se sacrificaba mediante sobredosis de CO₂ y dislocación de cuello. Las ratas sacrificadas o encontradas muertas se sometían a un examen macroscópico lo antes posible después de la muerte. Cuando la necropsia no era inmediata, los cadáveres se refrigeraban a ~4 °C hasta la realización de la necropsia en Charles River DRS, Finlandia. Las definiciones de criterios de valoración aceptables incluyeron: sin movimientos espontáneos e incapacidad de beber o comer en un período de observación de 24 horas, hemorragia masiva, inflamación espontánea, falta de anatomía, hinchazón o tumores.

Los criterios de valoración específicos del modelo (EAE) que justificaban la eutanasia de la rata incluían: puntuación clínica que alcanza un nivel 4 (debilidad parcial en todas las extremidades o hemiplejía), reflejo de enderezamiento >30 segundos y la caída del peso corporal durante más del 25 % desde la referencia.

Análisis estadístico

Todos los valores se presentan como media $\pm$ desviación estándar (SD) o error estándar de la media (SEM) y las diferencias se consideran estadísticamente significativas con un nivel de $P < 0,05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico StatsDirect. Se analizaron las diferencias entre los medios utilizando ANOVA de 1 vía seguido por prueba de Dunnett (comparación con el grupo tratado con vehículo). Los datos no paramétricos se analizaron con ANOVA de Kruskal-Wallis (entre grupos).

Peso corporal

El peso corporal de las ratas se monitorizó diariamente comenzando el día 0 y se continuó hasta el día 35 de criterio de valoración. Todas las ratas de los grupos 2 y 3 aumentaron de peso de forma similar al grupo de vehículo 1 durante el transcurso del estudio ($p > 0,05$).

Incidencia de la enfermedad y supervivencia

Para todas las ratas en el estudio, la mortalidad por grupos fue la siguiente:

Grupo 1: 40 % (6/15);
Grupo 2: 20 % (4/15); y
Grupo 3: 7 % (1/15).

Índice acumulativo de enfermedad

El índice acumulativo de enfermedad (CDI) indica la suma de los valores de puntuación clínica durante los 36 días; desde el día 0 de la inoculación hasta el día 35 de criterio de valoración. El valor alto del índice representa una enfermedad avanzada y el valor bajo del índice indica síntomas leves.

Los efectos de los compuestos de sulfato de dextrano administrados por vía subcutánea y del vehículo sobre el índice acumulativo de enfermedad se presentan en la figura 11. No hubo diferencias significativas en el índice acumulativo de enfermedad entre los animales del grupo de vehículo (grupo 1) y el grupo 2. Sin embargo, el tratamiento con sulfato de dextrano en el grupo 3 redujo el CDI medio en un 31 % en comparación con el vehículo.

Por lo tanto, el sulfato de dextrano de acuerdo con las realizaciones (lote n.º 3) presentó efectos biológicos mejorados según lo evaluado por el CDI en comparación con el sulfato de dextrano 5 HS para los sujetos con EAE.

EAE es un modelo animal de enfermedades desmielinizantes inflamatorias del sistema nervioso central (SNC). Se ha estudiado ampliamente como un modelo animal de las enfermedades desmielinizantes del SNC humano, incluida la esclerosis múltiple (MS) y la encefalomielitis diseminada aguda (ADEM). Por lo tanto, el sulfato de dextrano de las realizaciones parece tener efectos beneficiosos en términos de tratar o al menos reducir los síntomas de la MS y la ADEM.

Comparación de la toxicidad entre las moléculas de sulfato de dextrano

Se evaluó la toxicidad en ratas Sprague-Dawley por dosis única de sulfato de dextrano administrado por inyección i.v. durante un período de observación de 2 semanas. El vehículo utilizado en estos experimentos fue CAM 75 mM en NaCl al 0,9 %.

En este estudio, un sulfato de dextrano de las realizaciones (lote n.º 3) y sulfato de dextrano (DS-18) producidos por

Meito Sangyo Co., Ltd. (lote n.º N-3188 y N-3190) se administraron a ratas Sprague Dawley macho mediante inyección de bolo único en niveles de dosis de 70 y 140 mg/kg con un período de observación de 14 días. El estudio comprendía en total 7 grupos del siguiente modo; un control; DS-S18, lote n.º N-3188; DS-S18 lote n.º N-3190; y sulfato de dextrano lote n.º 3, véase la tabla 8. Se incluyeron cinco animales en cada grupo de dosis, excepto por el lote n.º 3 de sulfato de dextrano, 70 mg/kg en el cual se incluyeron 10 animales. Se realizó patología en los pulmones de todos los animales del estudio y en órganos seleccionados de los grupos tratados con el lote n.º 3 de sulfato de dextrano (glándulas suprarrenales, fémur con médula ósea, corazón, riñones, hígado, ganglios linfáticos mesentéricos, bazo, timo y sitio de inyección).

10 Tabla 8 - diseño experimental

Grupo	1	2	3	4	5	6	7
Dosis (mg/kg)	0	70	140	70	140	70	140
Compuesto (lote n.º)	vehículo	DS-S18 (N-3188)	DS-S18 (N-3190)	DS-S18 (N-3190)	DS-S18 (N-3190)	DS lote n.º 3	DS lote n.º 3
N.º de animales	5	5	5	5	5	10	5

No hubo muertes en el estudio. El día de la dosificación (día 1) los animales que recibieron sulfato de dextrano presentaron disnea, aproximadamente 10 minutos después de la dosificación en todos los grupos con algún grado de relación con la dosis. La mayor incidencia se observó en los animales que recibieron 140 mg/kg. La gravedad observada en la mayoría de los animales fue leve, excepto en los que recibieron 140 mg/kg de DS-S18, lote N-3188 que mostró disnea moderada en cuatro de cada cinco animales. Durante el resto del período de observación (días 2-15), la mayoría de los animales que recibieron 140 mg/kg de DS-S18, ambos lotes, presentaron disnea. Un animal que recibió el lote n.º 3 de sulfato de dextrano presentó disnea en los días 6-15.

En el examen histológico se observaron cambios relacionados con el tratamiento en los animales dosificados con los compuestos de prueba en los pulmones y consistían en histiocitosis alveolar y engrosamiento de los septos alveolares/aumento de la celularidad. Se observó una mayor incidencia y gravedad de estos cambios en la mayoría de los animales que recibieron 140 mg/kg de ambos lotes del compuesto de prueba DS-S18. Solo uno de cada diez animales que recibieron 70 mg/kg del lote n.º 3 de sulfato de dextrano mostró cambios mínimos, y tres de cada cinco que recibieron 140 mg/kg mostraron resultados de mínimos a moderados. Además de los hallazgos pulmonares, se observó un grado ligeramente mayor de hematopoyesis extramedular en el bazo en todos los grupos de dosis, sin embargo, se consideró que su importancia toxicológica era cuestionable.

30 Tabla 9 - Incidencia y gravedad de los cambios microscópicos en los pulmones de los animales tratados

Grupo	1	2	3	4	5	6	7
Dosis (mg/kg)	0	70	140	70	140	70	140
Compuesto (lote n.º)	vehículo	DS-S18 (N-3188)	DS-S18 (N-3190)	DS-S18 (N-3190)	DS-S18 (N-3190)	DS lote n.º 3	DS lote n.º 3
N.º de animales	5	5	5	5	5	10	5
Histiocitosis alveolar pulmonar							
-mínimo focal		0	0	1	2	0	1
-mínimo multifocal		0	0	0	1	0	0
-leve		0	0	3	0	3	0
Incidencia total		0	0	4	3	3	1
Engrosamiento de los septos alveolares/aumento de la celularidad							
-mínimo focal		0	0	0	1	0	1
-mínimo multifocal		0	0	0	0	0	0
-leve		0	0	0	0	0	0
-moderado		0	0	3	0	3	0
Incidencia total		0	0	3	1	3	1
Hemorragias alveolares							
-mínimo focal		0	0	0	1	0	2
-mínimo multifocal		0	0	0	0	1	0
-leve		0	0	1	0	0	0
Incidencia total		0	0	1	1	1	2

De los compuestos evaluados en el presente estudio, el lote n.º 3 de sulfato de dextrano mostró una toxicidad pulmonar menos pronunciada que DS-18.

Análisis NMR de sulfato de dextrano de Sigma-Aldrich

Las características estructurales de una sal de sodio de sulfato de dextrano (DSS) de Sigma-Aldrich (producto n.º 31404) se han determinado utilizando espectroscopia HSQC NMR de $1D\ ^1H$ y $2D^{13}C-^1H$. El certificado de análisis de Sigma-Aldrich con respecto al sulfato de dextrano (producto n.º 31404) indica un peso molecular (M_r) de 5000 Da y un contenido de azufre promedio de 17 %, que es equivalente a aproximadamente 2,3 grupos de sulfato por residuo de glucosilo.

La muestra de NMR se preparó mediante a disolución de 35,9 mg de sulfato de dextrano de Sigma-Aldrich (producto n.º 31404) en 510 μl de D_2O .

Resultados

Cantidad de unidades de glucosa: 26-50

15 M_n : 8600-16900 Da

Grado de C1 en la configuración α : no determinado, pero >50 % (configuración $\alpha \gg$ configuración β)

Grado de sulfatación de C2-C4: 74 %

Grado de grupo extremo α -C1 sulfatado: 49 %

Grado de grupo extremo β -C1 sulfatado: no determinado

20

El método más preciso para determinar la cantidad de unidades de glucosa en las moléculas de sulfato de dextrano es realizar un análisis simultáneo del dextrano correspondiente utilizado como material de partida para la producción de sulfato de dextrano. Sin los datos de NMR sobre el dextrano correspondiente, la superposición de los espectros en la región de 4,8-5,2 ppm en el espectro HSQC de $2D^{13}C-^1H$, véase la figura 14, impide la cuantificación del extremo de la fracción C1 en la configuración del anómero de β , así como el grado de grupos extremo β -C1 sulfatados. La figura 13 ilustra el espectro de NMR $1D^1H$ para el sulfato de dextrano de Sigma Aldrich (producto n.º 31404).

Por lo tanto, la cantidad calculada de unidades de glucosa en el sulfato de dextrano de muestra (producto n.º 31404) se informa como un intervalo, con el grado de C1 terminal en la configuración α que oscila entre el 50 % y el 100 %. Los datos del espectro de HSQC $2D^{13}C-^1H$ no muestran señales en la región esperada del grupo extremo β -C1, lo que sugiere que la cantidad de unidades de glucosa se encuentra en la parte superior del intervalo informado.

30

Discusión

35 Los resultados de NMR indican que el peso molecular del sulfato de dextrano con un peso molecular de M_r 5000 Da de Sigma-Aldrich (producto n.º 31404) en realidad tiene un peso molecular promedio en número M_n según lo medido por espectroscopia de NMR dentro de un intervalo de 8600 Da y 16900 Da.

Prueba funcional de sulfato de dextrano de diferentes fabricantes

40

El objetivo de este estudio fue investigar y comparar el efecto funcional del sulfato de dextrano de diferentes fabricantes sobre el tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT) en un ensayo en seres humanos *ex vivo*.

APTT es una prueba médica que caracteriza la coagulación sanguínea. Además de detectar anomalías en la coagulación de la sangre, también es un indicador de la eficacia tanto de la vía de activación de contacto como de las vías de coagulación comunes.

45

Método y equipos

50 APTT se midió en plasma humano utilizando el Start® 4 de Diagnostica Stago de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se disolvió sulfato de dextrano hasta 1 mg/ml en amortiguador de citrato 75 mM con un pH inicial de 5,9 y después se agregó al plasma humano hasta una concentración de sulfato de dextrano final de 10 $\mu g/ml$.

Se analizaron cuatro lotes diferentes de sulfato de dextrano de Meito Sangyo Co., Ltd., Japón (N-3178, N-3179, N-3180, N-3181), un lote de sulfato de dextrano de Sigma-Aldrich, EUA (peso molecular promedio 5000 Da, producto n.º 31404) y dos lotes de sulfato de dextrano (lote n.º 1 y lote n.º 2) de acuerdo con las realizaciones. De cada lote se procesaron cuatro muestras ponderadas por separado y en cada una de estas muestras se midió el APTT en duplicados. Toda la manipulación de la muestra se realizó en paralelo y el mismo día. Al día siguiente se realizaron todas las mediciones de APTT en todas las muestras para obtener resultados similares.

60

El uso de plasma en lugar de sangre completa en el análisis APTT hace que el análisis sea más fiable y los resultados varíen menos.

Resultados

5

Los resultados del análisis de APTT se presentan en la tabla 10 abajo. La referencia para el APTT fue el plasma medido como un control negativo.

Tabla 10 - APTT en plasma después del tratamiento con sulfato de dextrano

10

Sulfato de dextrano	APTT (s)	Media	SEM
Control negativo	27,5		
Meito N-3178	56,3	59,5	1,1
Meito N-3179	60,2		
Meito N-3180	62,2		
Meito N-3181	59,1		
Sigma Aldrich 31404	78,6		
Lote n.º 1	49,1	51,8	2,7
Lote n.º 2	54,5		

Hubo una diferencia significativa en el APTT medido para el sulfato de dextrano de acuerdo con las realizaciones y el sulfato de dextrano de otros fabricantes. En particular, el sulfato de dextrano (5000 Da, producto n.º 31404) de Sigma-Aldrich produjo un APTT significativamente mayor en comparación con el sulfato de dextrano de acuerdo con las realizaciones.

15

Las realizaciones descritas anteriormente han de entenderse como unos pocos ejemplos ilustrativos de la presente invención. Se entenderá por los especialistas en la materia que pueden hacerse diversas modificaciones, combinaciones y cambios en las realizaciones sin apartarse del alcance de la presente invención. En particular, pueden combinarse diferentes soluciones parciales en las diferentes realizaciones en otras configuraciones, cuando sea técnicamente posible. El alcance de la presente invención se define, sin embargo, por las reivindicaciones adjuntas.

20

ANEXO 1

25

Los experimentos de dispersión de luz se llevaron a cabo con un sistema de cromatografía de exclusión de tamaño de dispersión de luz láser multiángulo (SEC-MALLS) que consistía en un sistema de cromatografía de HPLC de la serie Agilent 1260 Infinity y un detector de dispersión de luz MiniDAWN TREOS conectado (Wyatt Technologies). Los siguientes parámetros de análisis se utilizaron en los experimentos de dispersión de la luz:

30

- Flujo = 1,00 mL/min.
- Temperatura de columna/detector de dRI = 40 °C
- Intervalo de recolección = 0,5 s.
- Volumen de inyección = 10 µL
- Dn/dc = 0,1470 mL/g
- Longitud de onda de MALLS = 656 nm
- Constante de calibración (MALLS) = $4.7303 \times 10^{-51} / (V \text{ cm})$

35

La muestra de sulfato de dextrano se disolvió en 2 mL de nitrato de sodio 0,1 M (NaNO₃) con 400 ppm de azida de sodio (NaN₃) como fase móvil (eluyente).

40

REIVINDICACIONES

1. Un sulfato de dextrano **caracterizado por:**
- 5 un peso molecular promedio en número, M_n , según lo medido mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear, NMR, dentro de un intervalo de entre 1850 y 3500 Da;
un número de sulfato promedio por unidad de glucosa dentro de un intervalo de entre 2,5 y 3,0; y
una sulfatación promedio de la posición C2 en las unidades de glucosa de dicho sulfato de dextrano, o una sal del mismo, que es de al menos el 90 %.
- 10 2. El sulfato de dextrano de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho M_n según lo medido mediante espectroscopía de NMR se encuentra dentro de un intervalo de entre 1850 y 2500 Da.
3. El sulfato de dextrano de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho M_n según lo medido mediante
15 espectroscopía de NMR se encuentra dentro de un intervalo de entre 1850 y 2300 Da.
4. El sulfato de dextrano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho número de sulfato promedio por unidad de glucosa se encuentra dentro de un intervalo de entre 2,5 y 2,8.
- 20 5. El sulfato de dextrano de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho número de sulfato promedio por unidad de glucosa se encuentra dentro de un intervalo de entre 2,6 y 2,7.
6. El sulfato de dextrano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha sulfatación promedio de dicha posición C2 es de al menos el 95 %.
- 25 7. El sulfato de dextrano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde un número de sulfato promedio en las posiciones C2, C3 y C4 en dichas unidades de glucosa se encuentra dentro de un intervalo de entre 2,2 y 2,6.
- 30 8. El sulfato de dextrano de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho número de sulfato promedio en dichas posiciones C2, C3 y C4 se encuentra dentro de un intervalo de entre 2,3 y 2,5.
9. El sulfato de dextrano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho sulfato de dextrano tiene un número promedio de unidades de glucosa dentro de un intervalo de entre 4,0 y 6,0.
- 35 10. El sulfato de dextrano de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicho número promedio de unidades de glucosa se encuentra dentro de un intervalo de entre 4,5 y 5,5.
11. El sulfato de dextrano de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicho número promedio de unidades
40 de glucosa se encuentra dentro de un intervalo de entre 5,0 y 5,2.
12. El sulfato de dextrano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicho sulfato de dextrano tiene una ramificación promedio de unidades de glucosa que es inferior al 3,0 %.
- 45 13. El sulfato de dextrano de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicha ramificación promedio es inferior al 1,5 %.
14. El sulfato de dextrano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde dicha sal de sulfato de dextrano es una sal de sodio y dicha sal de sodio de sulfato de dextrano que incluye contraiones de Na^+
50 tiene un M_n según lo medido mediante espectroscopía de NMR dentro de un intervalo de entre 2000 y 2500 Da.
15. El sulfato de dextrano de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicha sal de sodio de sulfato de dextrano que incluye dicho contraión de Na^+ tiene un M_n según lo medido mediante espectroscopía de NMR dentro de un intervalo de entre 2100 y 2300 Da.
- 55 16. El sulfato de dextrano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde una posición del grupo extremo C1 está sulfatada o está unida a -OH.
17. Un sulfato de dextrano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para uso como un
60 medicamento.

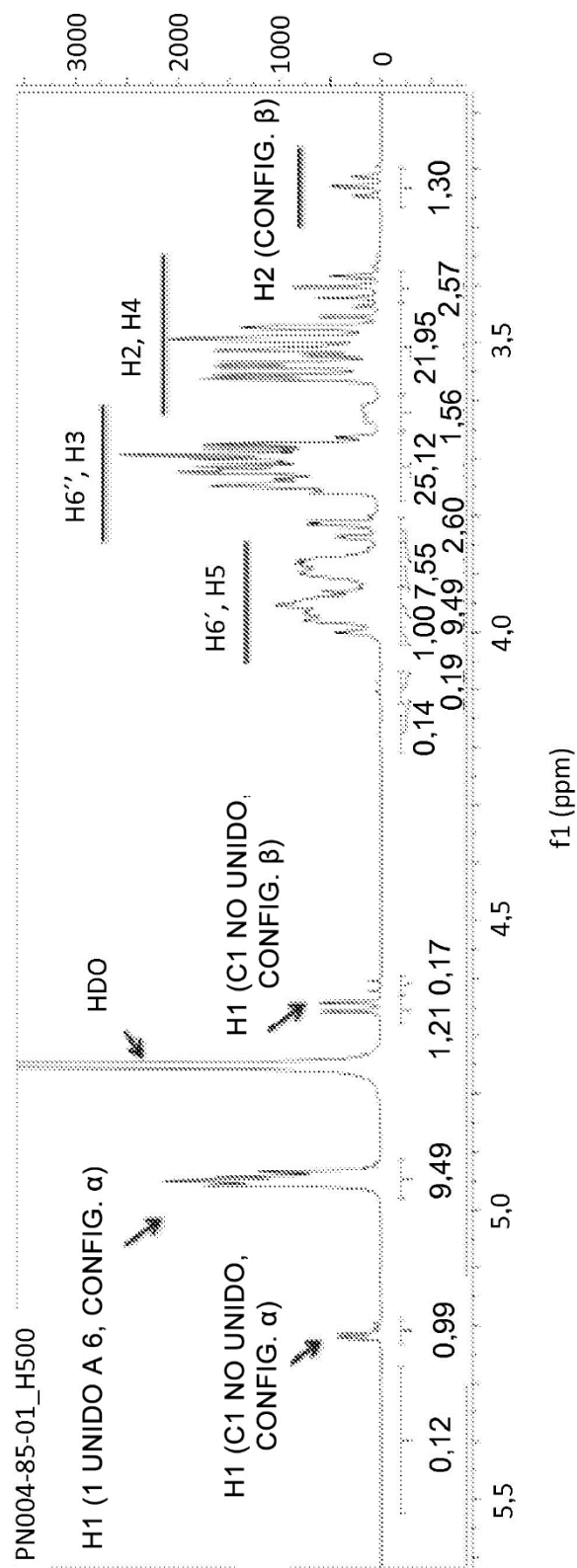


Fig. 1

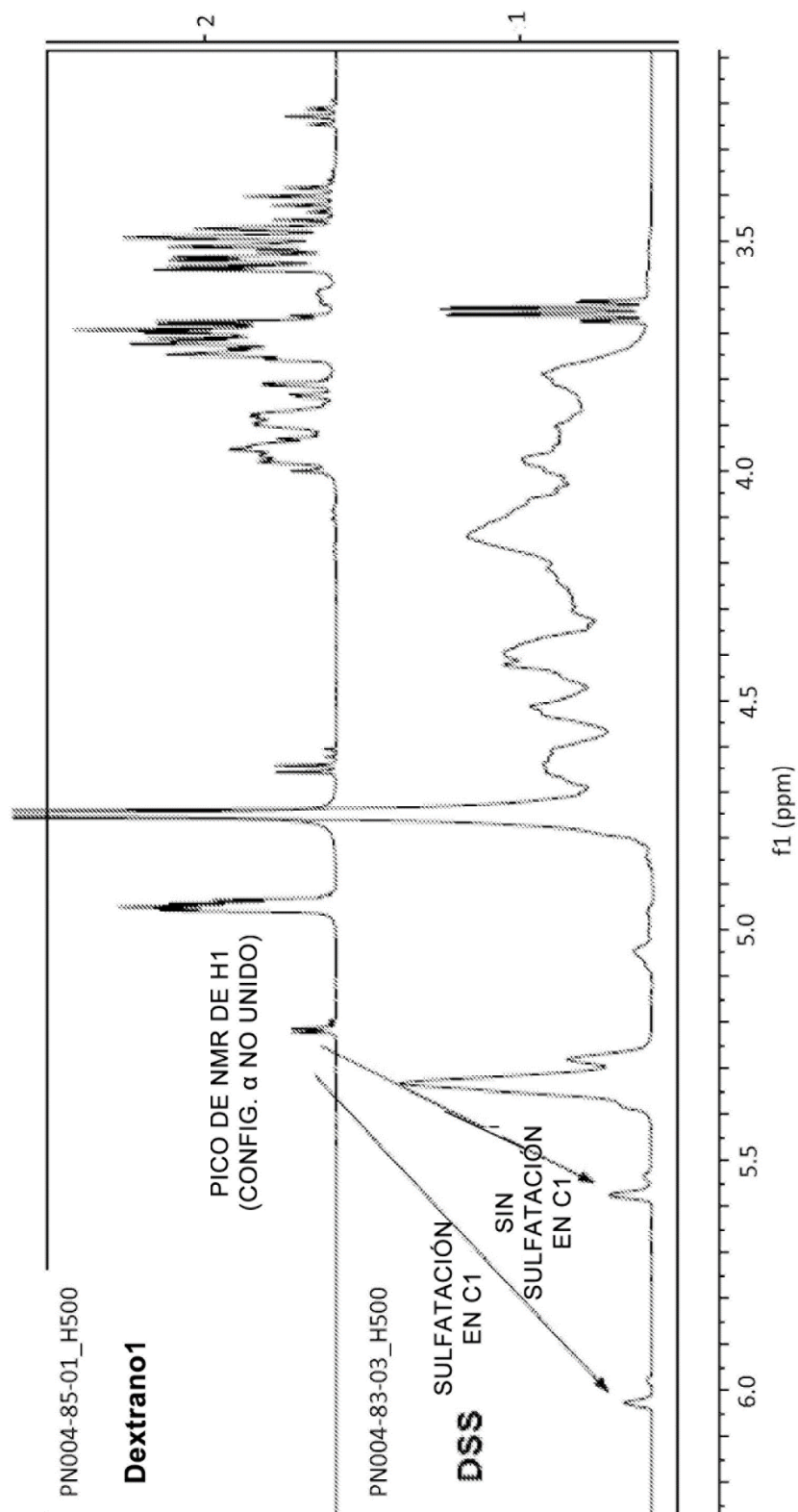
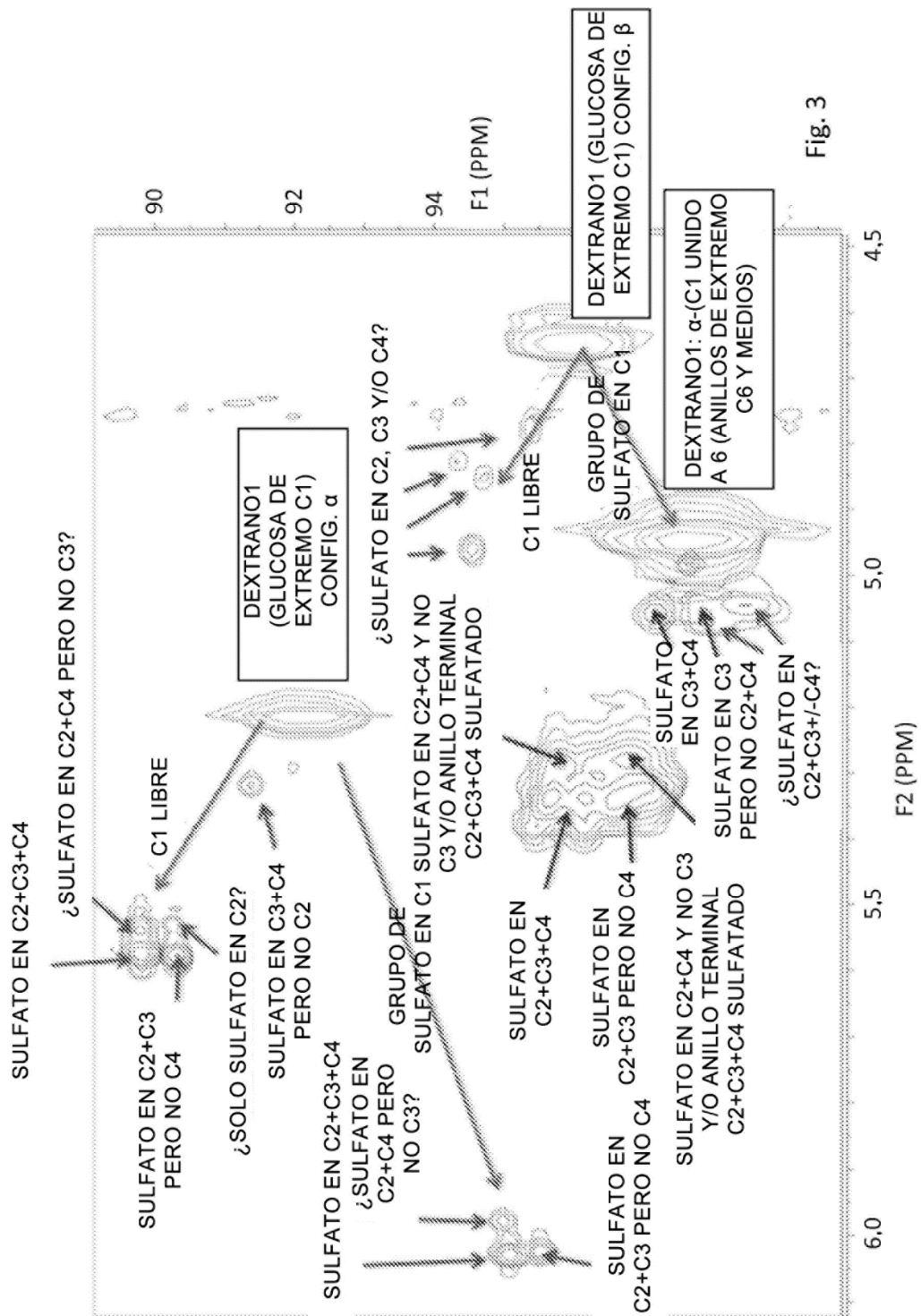


Fig. 2



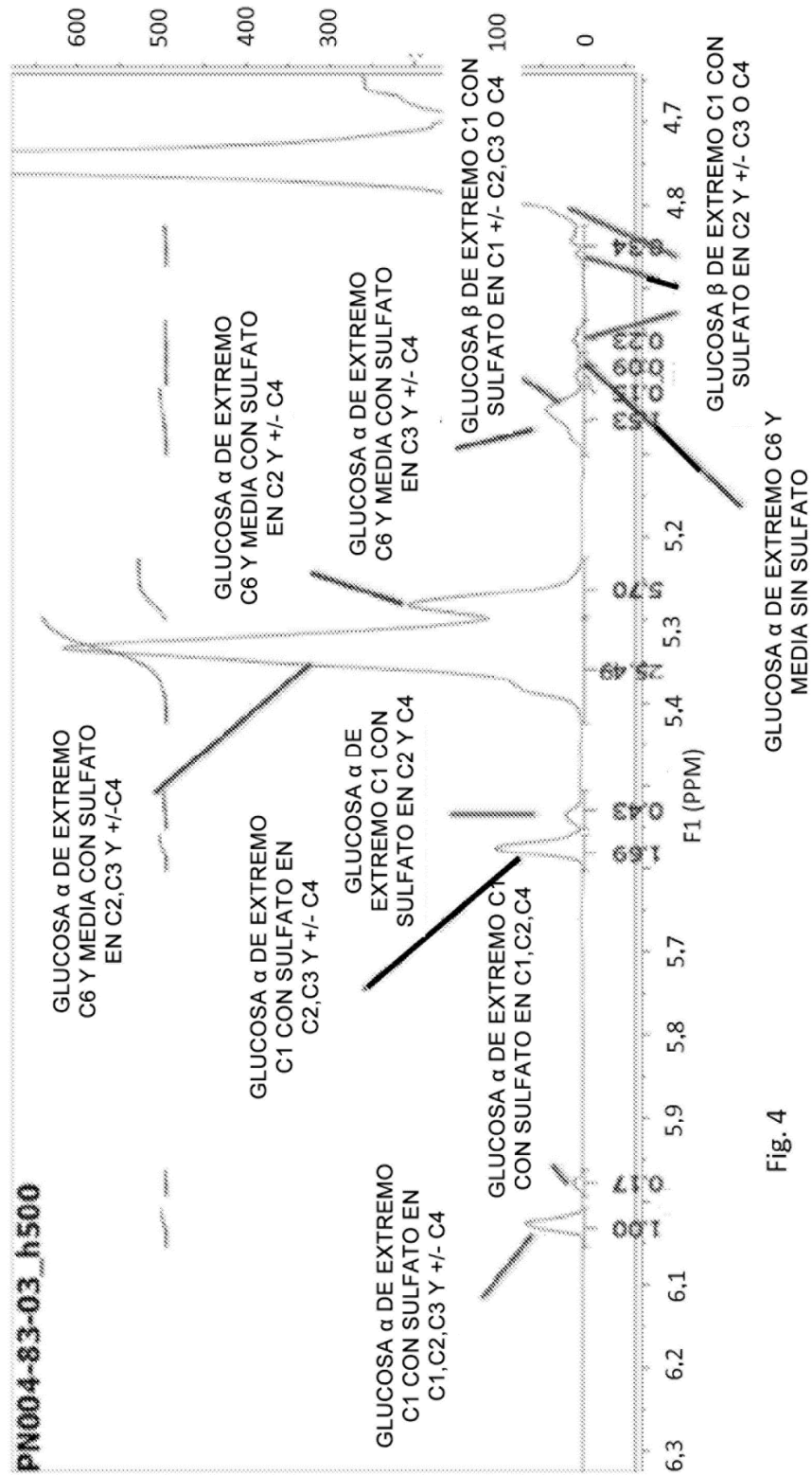


Fig. 4

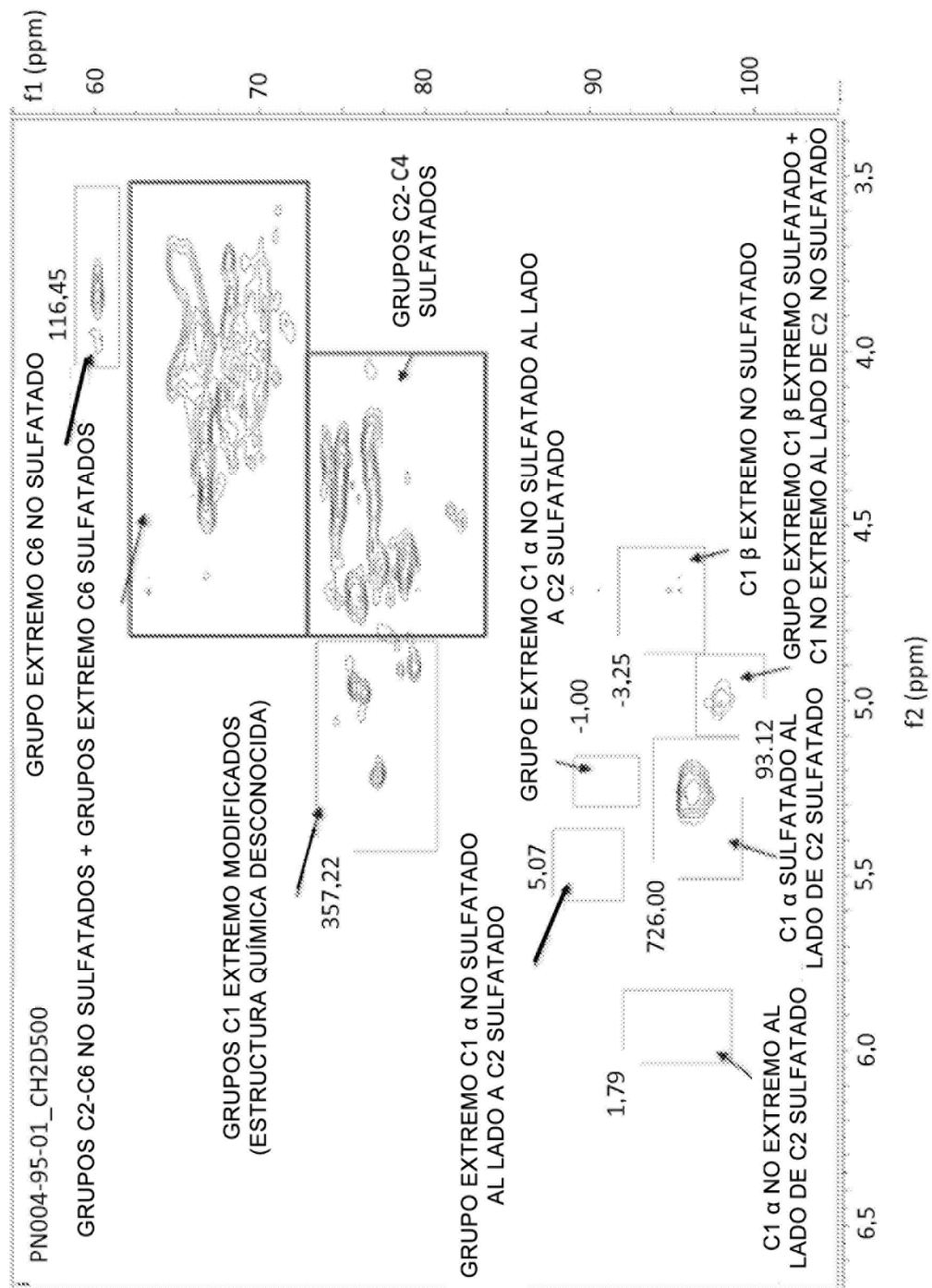


Fig. 5

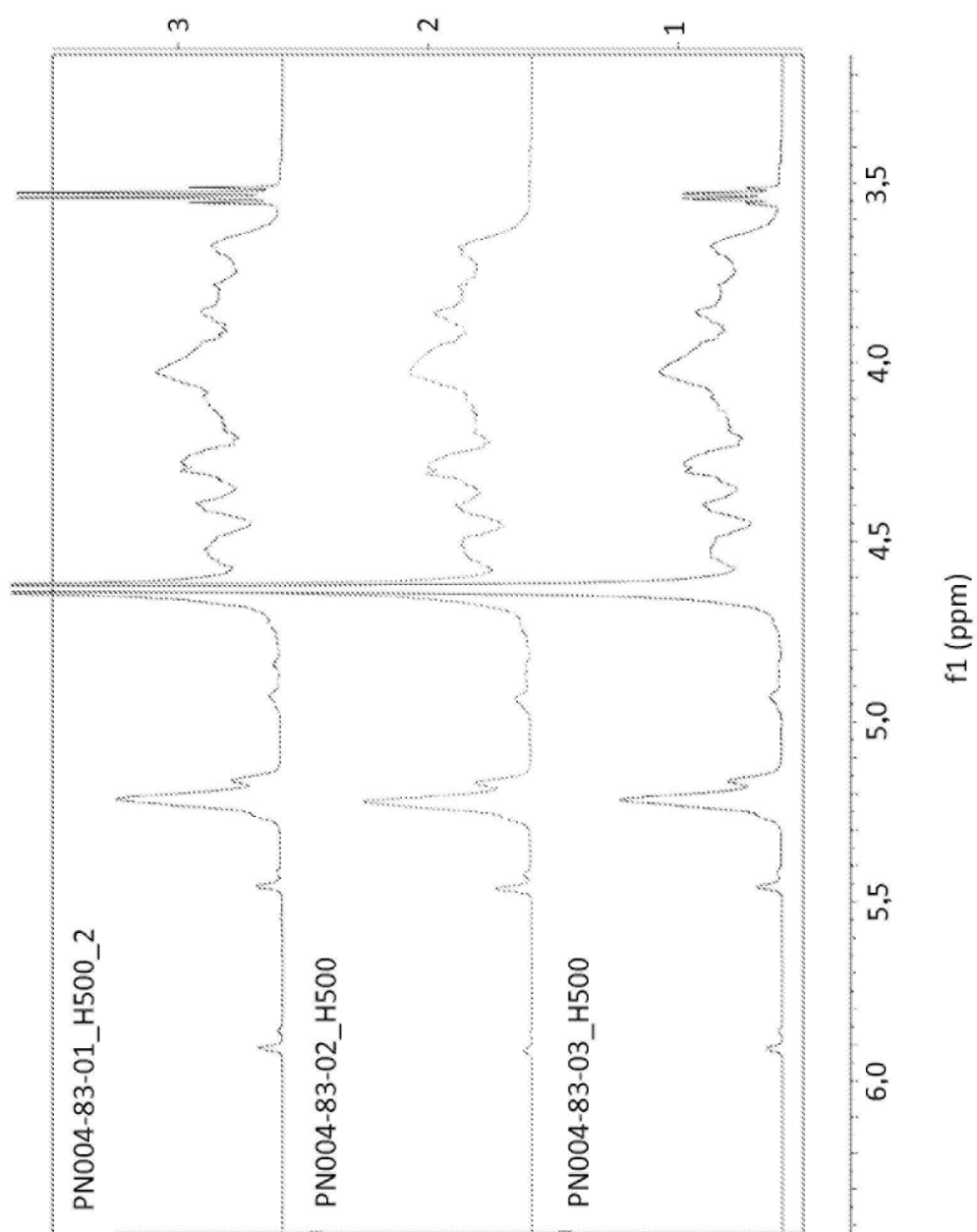


Fig. 6

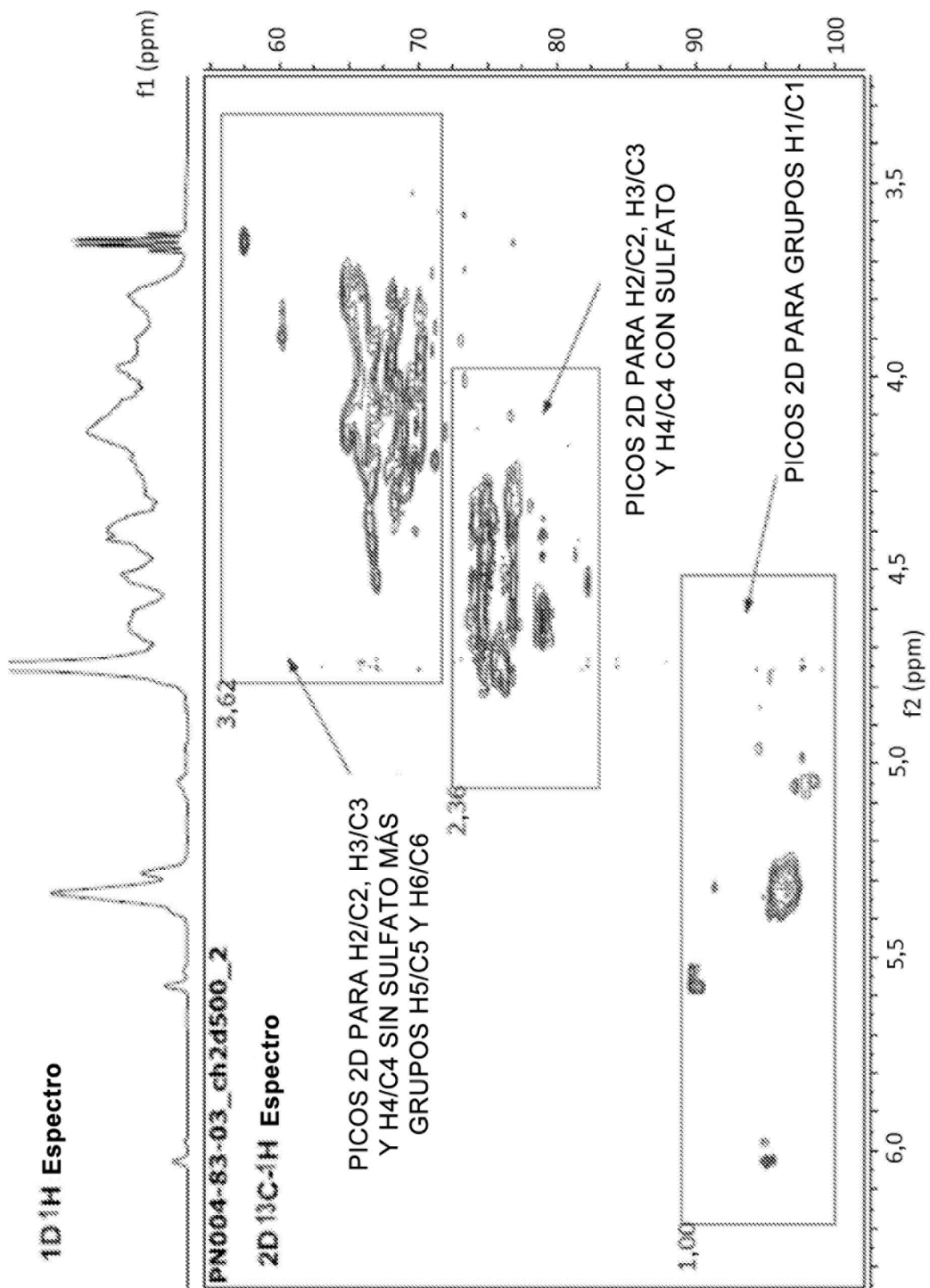
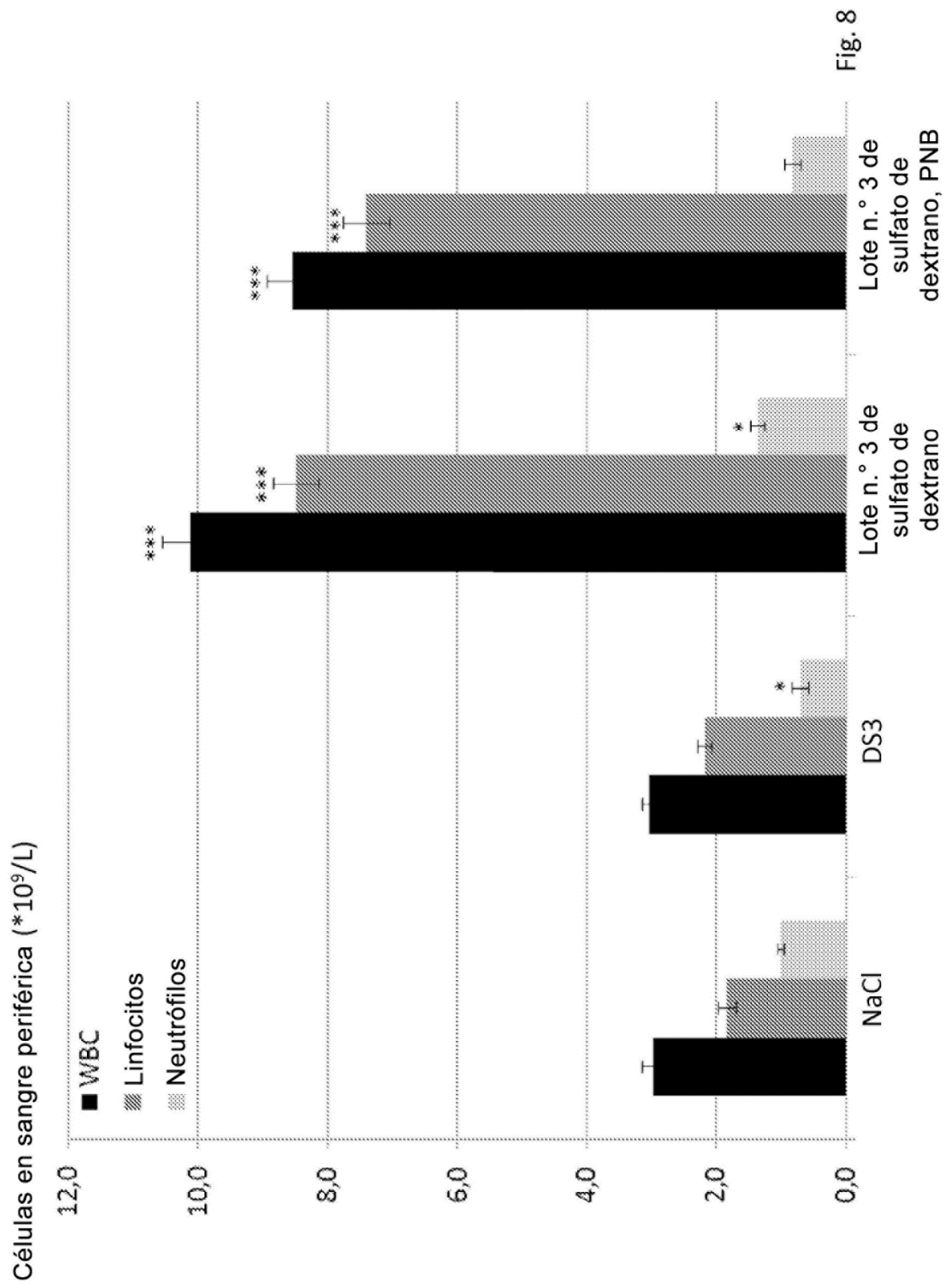


Fig. 7



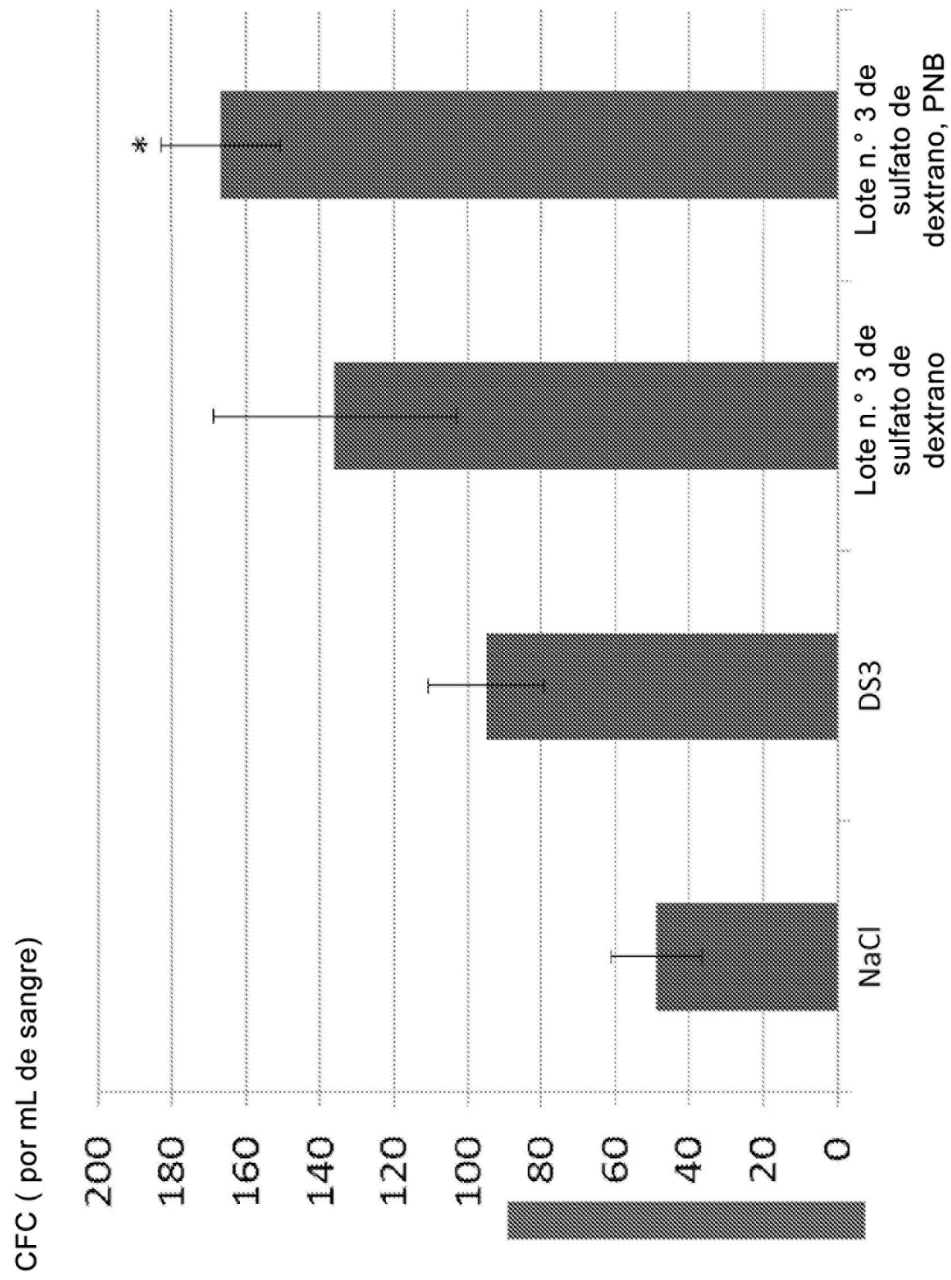


Fig. 9

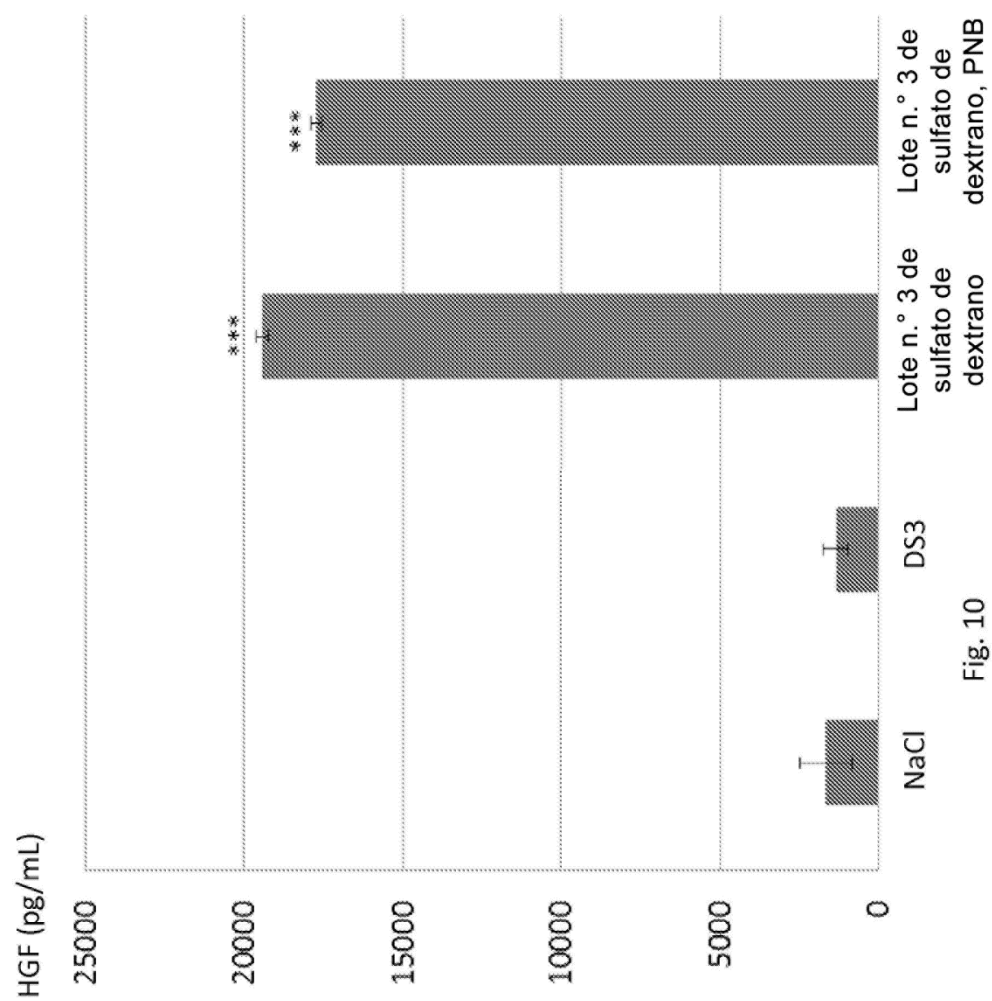


Fig. 10

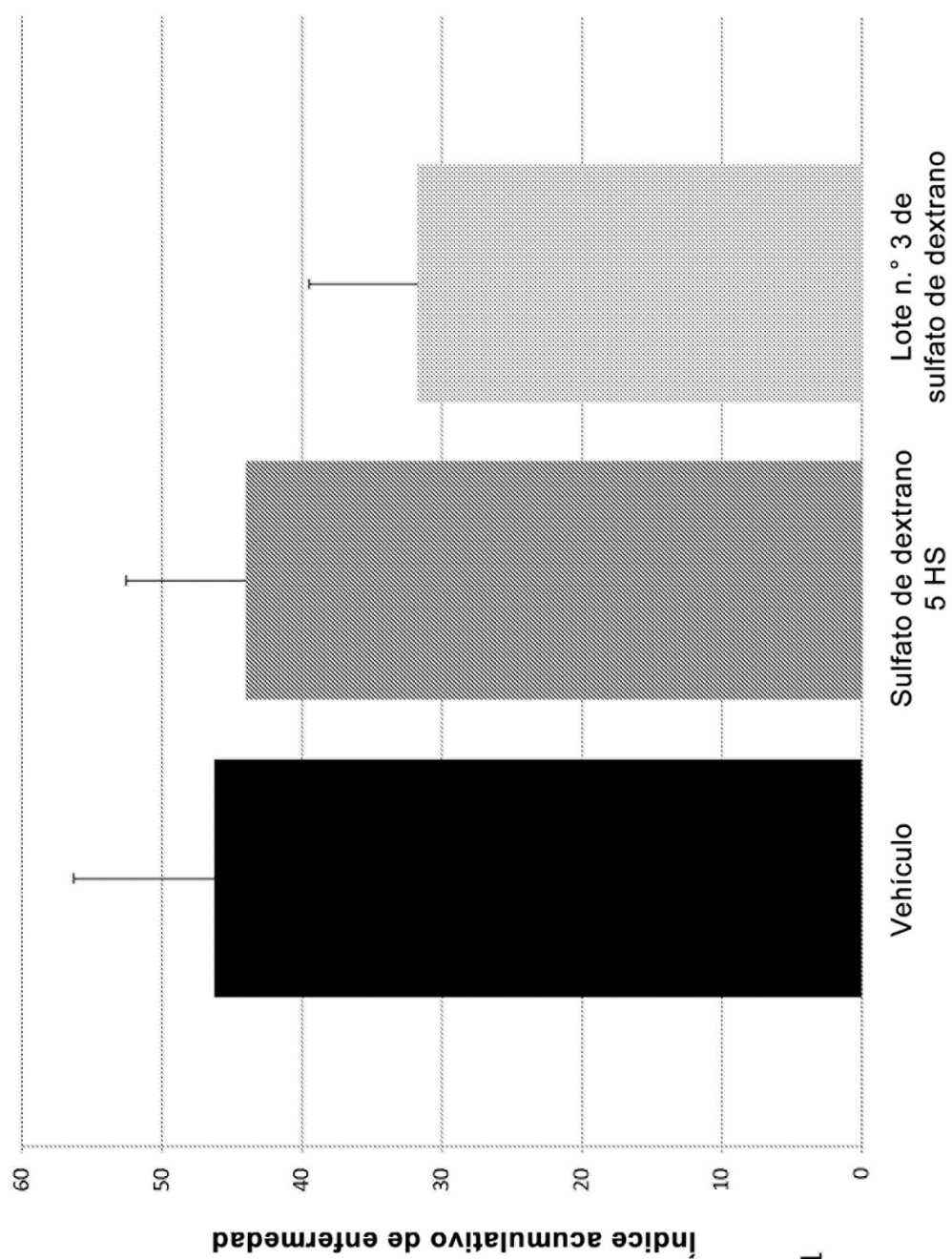


Fig. 11

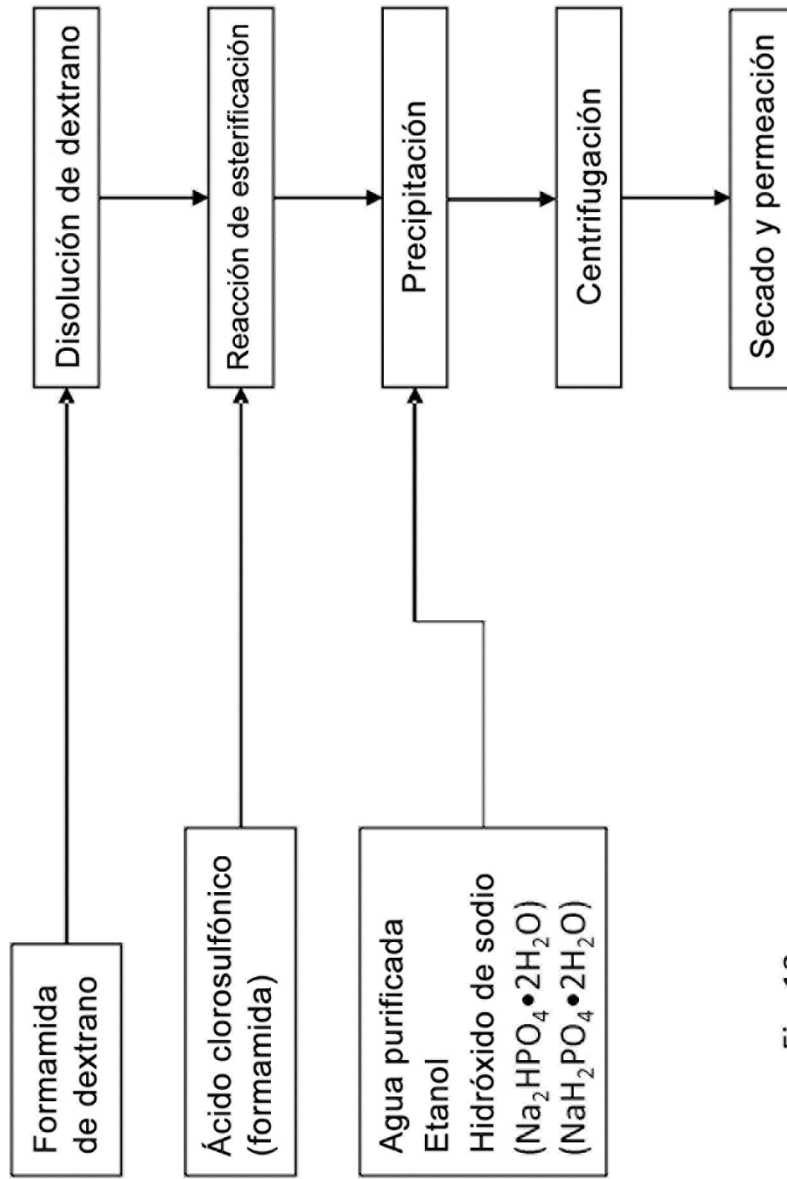


Fig. 12

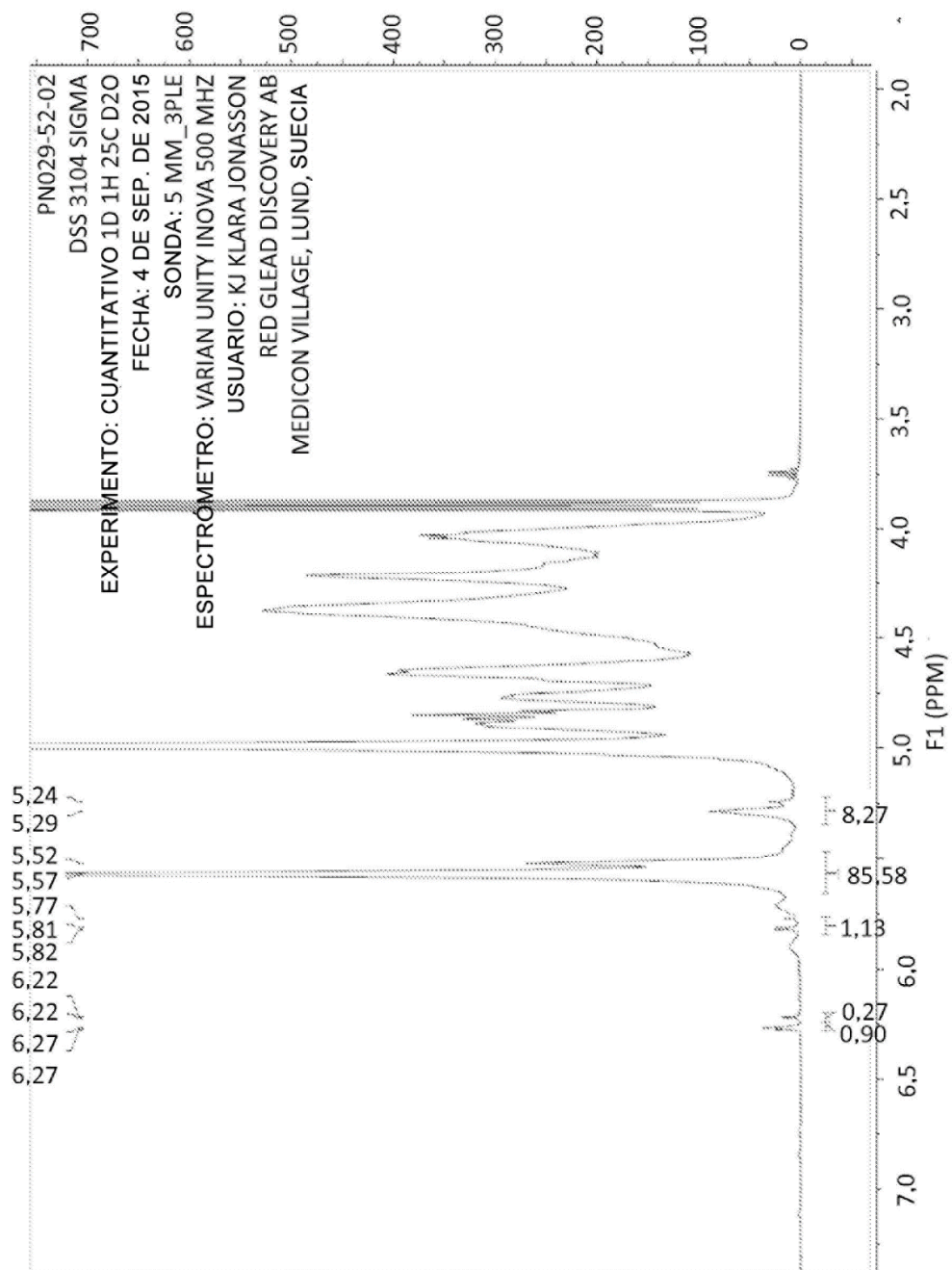


Fig. 13

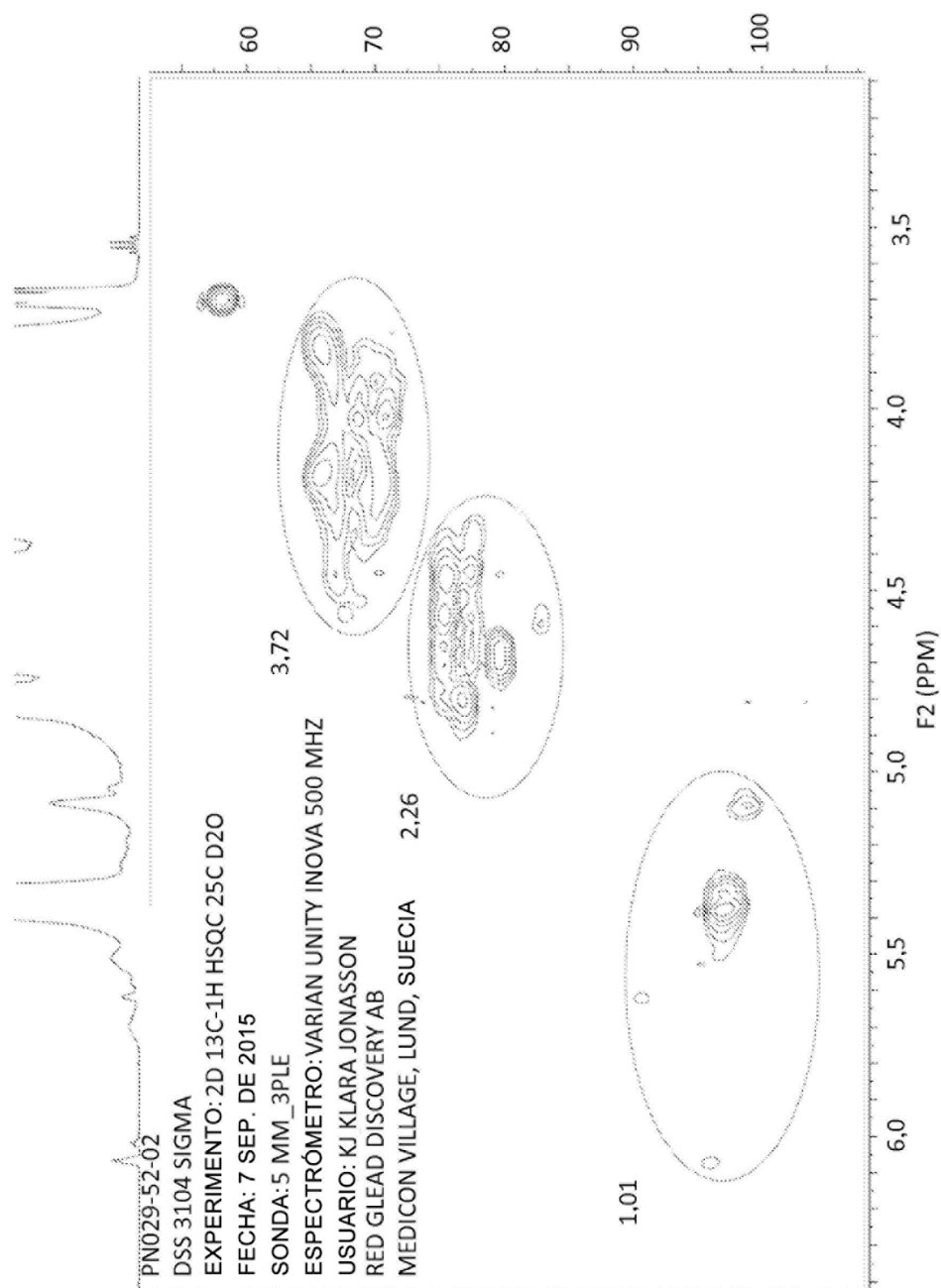


Fig. 14