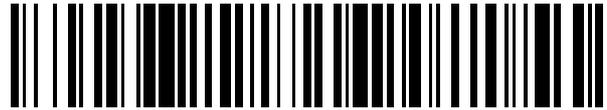


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 313**

21 Número de solicitud: 201790037

51 Int. Cl.:

A61K 31/727 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

15.04.2016

30 Prioridad:

15.04.2015 US US62/148,112

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.04.2019

71 Solicitantes:

ATTWILL MEDICAL SOLUTIONS INC. (100.0%)
379 Hess Street South
Hamilton CA

72 Inventor/es:

BERRY, Leslie Roy;
DIFIORE, Attilio y
CHAN, Anthony Kam Chuen

74 Agente/Representante:

ARPE FERNÁNDEZ, Manuel

54 Título: **COMPOSICIÓN PARA LA PREVENCIÓN DE LA TROMBOGÉNESIS Y PROCEDIMIENTO PARA FABRICACIÓN DE LA MISMA**

57 Resumen:

Se propone una composición y un procedimiento para prevención de la trombogénesis que pueden incluir antitrombina y heparina. En un ejemplo, puede estar presente un conjugado de antitrombina y heparina donde al menos un 50% en peso de la heparina se conjuga con antitrombina. Asimismo, en un ejemplo, al menos un 98% en peso de la heparina de la composición tiene un peso molecular superior a 3.000 Daltons.

ES 2 710 313 A2

DESCRIPCIÓN

Composición para la prevención de la trombogénesis y procedimiento para fabricación de la misma.

Antecedentes

La heparina es un sacárido polisulfatado que consiste en buena medida en una
5 secuencia alternante de hexácido urónico y 2-amino-2-desoxi-D-glucosa. La heparina y un
compuesto relacionado, el dermatán sulfato, tienen una gran importancia como
anticoagulantes de uso clínico, para la prevención de la trombosis y enfermedades afines.
Ambos son miembros de la familia de los glicosaminoglicanos, (GAGs), que consisten en
10 cadenas lineales de unidades repetitivas de disacáridos sulfatados que contienen una
hexosamina y un ácido urónico. La anticoagulación a través de los GAGs (como la heparina
y el dermatán sulfato) tiene lugar a través de su catálisis de inhibición de las enzimas
coagulantes (siendo la más importante la trombina) mediante inhibidores de la serina
proteasa (serpinas) como la antitrombina III (a la que en el presente documento se
15 denominará simplemente “antitrombina” o “AT”) y el cofactor II de la heparina (HCII). La
unión de las serpinas por los catalizadores es fundamental para su acción, y tiene lugar
mediante secuencias específicas a lo largo de la cadena lineal de carbohidrato del
glicosaminoglicano (GAG). La heparina actúa enlazándose a la AT a través de una
secuencia de pentasacáridos, potenciando de este modo la inhibición de diversas enzimas
coagulantes (en el caso de la trombina, la heparina también se une a la enzima). La
20 heparina también puede potenciar la inhibición de la trombina enlazándose a la serpina
HCII. El dermatán sulfato actúa uniéndose específicamente al HCII a través de una
secuencia de hexasacáridos, potenciando así tan sólo la inhibición de la trombina. Dado que
los glicosaminoglicanos (y concretamente, la heparina) pueden unirse a otras moléculas *in*
vivo o perderse de su emplazamiento de acción a causa de diversos mecanismos, resultaría
25 ventajoso mantener el GAG permanentemente asociado a la serpina mediante un enlace
covalente. De forma más detallada, sería deseable proporcionar conjugados covalentes de
la heparina u otros glicosaminoglicanos afines que mantengan una elevada actividad
biológica (por ejemplo, su actividad anticoagulante) y unas mejores propiedades
farmacocinéticas, y cuyo procedimiento de preparación resulte sencillo.

30

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico que muestra la absorción (A_{215} vs. H_2O) de cada fracción de heparina eluida a partir de una columna de cromatografía Sephadex® G-200,

La figura 2 es un gráfico que muestra la absorción de las fracciones de AT conjugada con heparina y las fracciones de AT en solitario eluidas a partir de una columna de
5 cromatografía Sephadex® G-200,

La figura 3 es un gráfico que muestra la absorción (A_{405} vs. H_2O) de mezclas de reacción de cuatro reacciones diferentes con las que se investigaba un complejo covalente antitrombina-heparina.

La figura 4 es un gráfico que muestra la absorción (A_{405} vs. H_2O) de mezclas de
10 reacción de tres reacciones diferentes con las que se investigaba un complejo covalente antitrombina-heparina que se había liofilizado a partir de una solución de elevada salinidad (concentrada).

Ha de ponerse de relieve que las figuras constituyen meros ejemplos de diversas realizaciones, y que no pretenden introducir ningún tipo de limitación al alcance de la
15 presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A continuación se hará referencia a una serie de ejemplos de realización, y se
20 utilizará un lenguaje específico para la descripción de los mismos. No obstante, ha de entenderse que ello no pretende introducir limitación alguna al ámbito de lo revelado en este documento. Las alteraciones y posteriores modificaciones de las características de la invención que se describen en este documento, así como las aplicaciones adicionales de los principios de la tecnología descrita en el mismo, que se le ocurrirían a cualquier experto en
25 la materia que estuviese en posesión de lo aquí divulgado, han de considerarse incluidas en el ámbito de lo divulgado. Asimismo, antes de divulgar y describir realizaciones específicas, ha de entenderse que lo aquí divulgado no se limita al proceso y materiales específicos que aquí se revelan, ya que pueden variar en cierta medida. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento se utiliza con el fin exclusivo de las
30 realizaciones específicas, y que no pretende ser limitativa, dado que el alcance de lo que aquí se divulga vendrá definido exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

A la hora de describir y reivindicar la presente tecnología, se utilizará la siguiente terminología.

Las formas en singular “un,” “una,” y “el” incluyen referencias al plural, a menos que
35 el contexto indique claramente otra cosa. De este modo, por ejemplo, la referencia a “un

aditivo” incluye la referencia a uno o más de dichos componentes, “una solución” incluye la referencia a uno o más de dichos materiales, y una “etapa de mezclado” se refiere a una o más de dichas etapas.

5 Tal y como se utiliza en este documento, “sustancial”, cuando se utiliza en referencia a una cantidad de un material, o a una característica específica del mismo, se refiere a una cantidad que resulte suficiente para proporcionar el efecto que dicho material o característica debería proporcionar. El grado exacto de desviación permisible puede depender en ciertos casos del contexto específico.

10 Tal y como se utiliza en el presente documento, “en torno a” se refiere a un grado de desviación basado en el error experimental típico de la propiedad específica identificada. El grado de amplitud del término “en torno a” dependerá del contexto y de la propiedad específicos, y podrá ser identificado fácilmente por cualquier experto en la materia. El término “en torno a” no pretende ampliar ni limitar el grado de equivalentes que podrían atribuirse a un valor específico. Además, y a menos que se indique otra cosa, el término “en
15 torno a” incluirá expresamente “exactamente,” en línea con las observaciones efectuadas más adelante en relación con los rangos y datos numéricos.

Las concentraciones, dimensiones, cantidades y otros datos numéricos pueden presentarse en este documento en formato de rango. Ha de entenderse que dicho formato de rango se utiliza exclusivamente por comodidad y debería interpretarse de manera
20 *flexible*, de forma que incluya no sólo los valores numéricos explícitamente indicados como límites del rango, sino todos los valores numéricos individuales o sub-rangos incluidos dentro del rango, como si se mencionase explícitamente cada uno de dichos valores numéricos y sub-rangos. Por ejemplo, un rango situado entre 1 y en torno a 200 debería interpretarse de forma que no sólo incluya los límites explícitamente indicados de 1 y 200,
25 sino que también incluya tamaños individuales como 2, 3, 4, y sub-rangos como de 10 a 50, de 20 a 100, etc.

Tal y como se utiliza en el presente documento, una pluralidad de elementos, elementos estructurales, elementos compositivos y/o materiales puede presentarse por comodidad en una lista común. No obstante, dichas listas habrán de interpretarse como si
30 cada elemento de la lista se identificase individualmente como un número independiente y singular. De este modo, no deberá interpretarse ninguno de los elementos individuales de dicha lista como un equivalente de facto a cualquier otro elemento de la misma lista, basándose exclusivamente en su presentación en un grupo común, a menos que se indique lo contrario.

35 Tal y como se utiliza en el presente documento, “hexosa” se refiere a un carbohidrato ($C_6H_{12}O_6$) que contiene seis átomos de carbono. Las hexosas pueden ser aldohexosas

como, por ejemplo, glucosa, manosa, galactosa, idosa, gulosa, talosa, alosa y altrosa, cuya forma de cadena abierta contiene un grupo aldehído. Alternativamente, las hexosas pueden ser cetosas como la fructosa, sorbosa, alulosa y tagatosa, cuya forma de cadena abierta contiene un grupo cetona.

5 Tal y como se utiliza en el presente documento, “ácido urónico” se refiere al ácido carboxílico formado por la oxidación del grupo hidroxilo primario de un carbohidrato, y normalmente toman su nombre del carbohidrato a partir del cual se obtienen. Por lo tanto, la oxidación del grupo hidroxilo C6 de la glucosa da lugar al ácido glucurónico, la oxidación del grupo hidroxilo C6 de la galactosa da lugar al ácido galacturónico y la oxidación del grupo
10 hidroxilo C6 de la idosa da lugar al ácido idurónico.

Tal y como se utiliza en este documento, “hexosamina” se refiere a un derivado de la hexosa en el que al menos un grupo hidroxilo, normalmente el grupo hidroxilo C2, ha sido sustituido por una amina. La amina puede ser opcionalmente alquilada, acilada (por ejemplo, con ácido murámico), normalmente a través de un grupo acetilo, sulfonada, (O o N-
15 sulfatada), sulfonilada, fosforilada, fosfonilada y similares. Entre los ejemplos representativos de las hexosaminas se encuentran la glucosamina, galactosamina, tagatosamina, fructosamina, sus análogos modificados y similares.

En la forma en que se utiliza en este documento, “glicosiaminoglicano” se refiere a cadenas lineales de unidades de disacáridos largamente repetitivas que contienen una
20 hexosamina y un ácido urónico. La identidad precisa de la hexosamina y del ácido urónico puede variar ampliamente, y en las anteriores definiciones se facilitan ejemplos representativos de cada uno. El disacárido puede modificarse opcionalmente mediante alquilación, acilación, sulfonación (O- o N-sulfatada), sulfonilación, fosforilación, fosfonilación y similares. El grado de dicha modificación puede variar, y puede llevarse a cabo en un
25 grupo hidroxilo o en un grupo amino. Por lo general, el grupo hidroxilo C6 y la amina C2 están sulfatados. La longitud de la cadena puede variar y el glicosiaminoglicano puede tener un peso molecular superior a 200.000 Daltons, normalmente de hasta 100.000 Daltons, y más normalmente, inferior a 50.000 Daltons. Los glicosiaminoglicanos suelen encontrarse como mucopolisacáridos. Entre sus ejemplos más representativos se encuentran la
30 heparina, el dermatán sulfato, el heparán sulfato, la condroitina-6-sulfato, condroitina-4-sulfato, el queratán sulfato, la condroitina, el ácido hialurónico, polímeros que contienen N-acetil monosacáridos (como el ácido N-acetilneuramínico, la N-acetil glucosamina, la N-acetil galactosamina, y el ácido N-acetil murámico) y similares, así como gomas, como la goma arábiga, la goma de tragacanto y similares.

35 Tal y como se utiliza en el presente documento, “proteína” incluye, entre otras, albúminas, globulinas (como las inmunoglobulinas), histonas, lectinas, protaminas,

prolaminas, glutelinas, fosfolipasas, proteínas antibióticas y escleroproteínas, así como proteínas conjugadas como fosfoproteínas, cromoproteínas, lipoproteínas, glicoproteínas y nucleoproteínas.

5 Tal y como se utiliza en el presente documento, “serpina” se refiere a un inhibidor de la serina proteasa y entre sus ejemplos se encuentran especies como la antitrombina y el cofactor II de la heparina.

Tal y como se utiliza en el presente documento, “amina” se refiere a aminas primarias, RNH_2 , aminas secundarias, $\text{RNH}(\text{R}')$, y aminas terciarias, $\text{RN}(\text{R}')(\text{R}'')$.

10 Tal y como se utiliza en el presente documento, “amino” se refiere al grupo NH o NH_2 .

Tal y como se utiliza en el presente documento, “imina” se refiere al grupo $\text{C}=\text{N}$ y las sales del mismo.

15 Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos “tratar” o “tratamiento” de una enfermedad o de una dolencia en un mamífero significa: prevenir la dolencia o enfermedad, es decir, evitar todo tipo de síntomas clínicos de la enfermedad; inhibir la dolencia o enfermedad, es decir, detener el desarrollo o avance de los síntomas clínicos; y/o aliviar la dolencia o enfermedad, es decir, provocar la regresión de los síntomas clínicos. Tratamiento también incluye la utilización de las composiciones reveladas en este documento asociada a un procedimiento médico, administrándose antes, durante o después
20 del procedimiento médico.

De acuerdo con todo ello, el presente documento se refiere a composiciones y procedimientos para la preparación de conjugados de heparina y antitrombina, así como al tratamiento de pacientes con las composiciones del presente documento. En un ejemplo, una composición para prevenir la trombogénesis puede comprender antitrombina y
25 heparina, donde al menos el 50% en peso de la heparina está conjugada con antitrombina, y donde al menos el 98% en peso de la heparina de la composición tiene un peso molecular superior a 3.000 Daltons.

En otro ejemplo, un procedimiento para la fabricación de una composición para prevenir la trombogénesis puede comprender las fases de conjugar antitrombina con
30 heparina fuera del cuerpo del paciente para formar un conjugado de antitrombina-heparina; la preparación del conjugado de antitrombina-heparina en una solución; y la liofilización del conjugado de antitrombina-heparina. En este ejemplo, el conjugado de antitrombina-heparina puede encontrarse en una solución formada únicamente por agua, por agua y alanina 0,01-0,09 molar, o por agua y manitol, por ejemplo.

35 En otro ejemplo, una composición para prevenir la trombogénesis puede incluir una solución acuosa de conjugado de antitrombina-heparina, en la que el conjugado de

antitrombina-heparina se encuentra presente a una concentración de 9-11 mg/mL con respecto al volumen total de la solución. El conjugado de antitrombina-heparina puede formarse conjugando la antitrombina con heparina fuera del cuerpo del paciente.

5 En un ejemplo adicional, un procedimiento para la fabricación de una composición para prevenir la trombogénesis puede incluir antitrombina con heparina fuera del cuerpo de un paciente, para formar un conjugado de antitrombina-heparina, donde el rendimiento del conjugado de antitrombina-heparina se define de tal forma que al menos se hace reaccionar un 60% en peso de la antitrombina inicial y se conjuga con heparina (es decir, se utiliza para obtener el conjugado de antitrombina-heparina).

10 En otro ejemplo adicional, una composición para prevenir la trombogénesis puede incluir antitrombina, heparina y conjugado de antitrombina-heparina, donde el conjugado de antitrombina-heparina se encuentra presente con un rendimiento de al menos un 60% en peso de la antitrombina inicial utilizada para obtener el conjugado de antitrombina-heparina.

15 En otro ejemplo, un procedimiento para el tratamiento de una dolencia o enfermedad puede incluir la administración de un conjugado de antitrombina-heparina preparado de acuerdo con los ejemplos de la tecnología de la invención a un mamífero que precise de la misma. De forma más detallada, estos tratamientos pueden llevarse a cabo administrando los conjugados de heparina y antitrombina de la presente invención a un paciente, por ejemplo, humano, que precise dicho tratamiento. Entre las dolencias y enfermedades que
20 pueden tratarse utilizando las composiciones de conjugados que se describen en el presente documento se encuentran el infarto de miocardio y una amplia variedad de estados trombóticos. Estos incluyen la formación de depósitos de fibrina asociada al síndrome de dificultad respiratoria neonatal, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, carcinoma pulmonar primario, linfoma no Hodgkin, alveolitis fibrosante y trasplantes pulmonares, por
25 mencionar tan sólo algunos. Asimismo, con las composiciones de la presente invención pueden tratarse situaciones de deficiencia adquirida de AT, como el síndrome de dificultad respiratoria neonatal, deficiencia inducida por L-asparaginasa, deficiencia inducida por bypass cardiopulmonar, sepsis o situaciones de deficiencia congénita de AT. En el caso de la deficiencia congénita de AT, pueden darse complicaciones trombóticas potencialmente
30 mortales, con niveles de AT inferiores a 0,25 unidades/ml en heterocigotos que requieran AT más heparina en hasta 1 o 2 niños cada año en los EE.UU. Las dolencias y enfermedades tratadas mediante la presente invención incluyen aquellas que se caracterizan por un exceso de generación o de actividad de la trombina. Dichas situaciones suelen producirse cuando un paciente se ha visto expuesto a un trauma, por ejemplo en el caso de los
35 pacientes quirúrgicos. El trauma provocado por las heridas o la cirugía provoca daños vasculares y la activación secundaria de la coagulación de la sangre. Estos efectos no

deseados pueden ocurrir tras una intervención de cirugía general u ortopédica, cirugía ginecológica, cirugía cardíaca o vascular, u otras intervenciones quirúrgicas. Un exceso de trombina también puede complicar la evolución de las enfermedades naturales, como la arterioesclerosis, lo que puede provocar ataques cardíacos, derrames cerebrales o gangrena de los miembros. Por lo tanto, los procedimientos y composiciones de la tecnología actual se pueden utilizar para tratar, prevenir o inhibir una serie de importantes complicaciones cardiovasculares, incluyendo angina inestable, infarto agudo de miocardio (ataque cardíaco), accidentes cerebro-vasculares (derrame cerebral), embolismo pulmonar, trombosis venosa profunda, trombosis arterial, etc. Las composiciones y procedimientos de la tecnología pueden utilizarse para reducir o prevenir la coagulación durante la diálisis y reducir o prevenir la coagulación intravascular durante una intervención quirúrgica a corazón abierto. Adicionalmente, en algunos aspectos de la invención, se facilitan procedimientos y composiciones para impedir o inhibir la generación de trombina o su actividad en pacientes con un mayor riesgo de desarrollar trombos debido a situaciones clínicas que alteran la hemostasis (por ejemplo, enfermedades arteriales coronarias, arterioesclerosis, etc.). En otro aspecto, se facilitan procedimientos y composiciones para aquellos pacientes que presentan un mayor riesgo de desarrollar un trombo con posterioridad a un tratamiento médico, como cirugía cardíaca, cirugía vascular o intervenciones coronarias percutáneas. En una realización, los procedimientos y las composiciones de la presente invención se utilizan en intervenciones de bypass cardiopulmonar. Las composiciones pueden administrarse antes, durante o después de la intervención.

Volviendo ahora a las diversas realizaciones y detalles relacionados con la presente invención, se sabe que la heparina está fácilmente disponible en una forma no fraccionada, que contiene moléculas con un amplio rango de pesos moleculares. Al eliminar la mayoría o la totalidad de de las moléculas de heparina con pesos moleculares inferiores a 3.000 Daltons con anterioridad a la conjugación de la heparina con la antitrombina, puede mejorarse la actividad del conjugado de antitrombina-heparina. En una realización adicional, las moléculas de heparina con un peso molecular inferior a 5.000 Daltons pueden eliminarse en su mayoría o en su totalidad.

Los conjugados de antitrombina-heparina formados utilizando heparina a partir de la cual se han eliminado las moléculas de heparina de bajo peso molecular son diferentes en su composición de otros conjugados de antitrombina-heparina. Las cadenas de heparina de bajo peso molecular pueden eliminarse de la heparina con anterioridad a su reacción con la AT para sintetizar el conjugado de antitrombina-heparina (ATH). Por lo tanto, la ATH queda desprovista de cadenas de heparina de bajo peso molecular conjugadas con la AT.

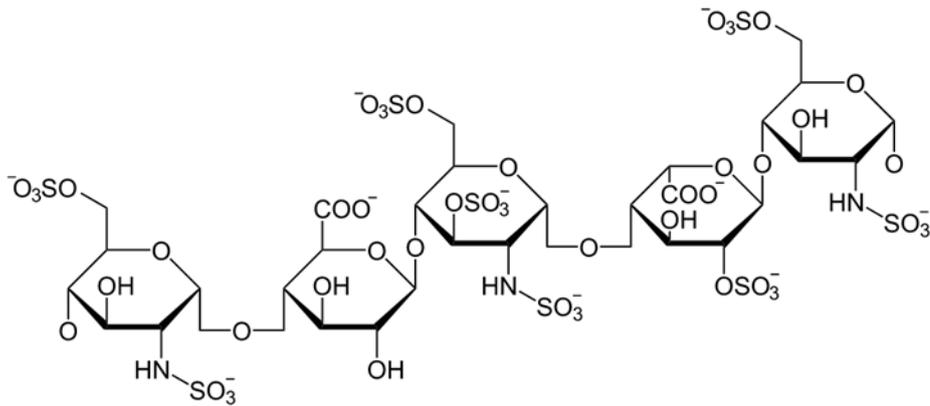
Las cadenas de heparina de bajo peso molecular pueden eliminarse de la heparina disponible a nivel comercial antes de hacer reaccionar la heparina con la AT para obtener ATH. Esto produce un ATH cuya composición difiere de la del ATH formado a partir de heparina no fraccionada sin eliminar la heparina de bajo peso molecular antes de reaccionar con la AT. Adicionalmente, la formación de ATH a partir de heparina no fraccionada y la posterior eliminación del ATH de bajo peso molecular, no produce el mismo producto que el ATH de la presente invención. Sin atenerse a ninguna teoría particular, se cree que las cadenas de heparina de bajo peso molecular (como las de menos de 3.000 Daltons o menos de 5.000 Daltons) compiten con las heparinas de cadena más larga para conjugarse con la AT. Las cadenas de heparina de muy bajo peso molecular tienen una elevada proporción de aldosa terminal que puede reaccionar con la AT. Por tanto, las cadenas de heparina de muy bajo peso molecular tienden a conjugarse con la AT con mayor rapidez, desplazando a las cadenas de heparina con un peso molecular más elevado. No obstante, una vez que las cadenas de heparina de muy bajo peso molecular se enlazan con la AT, las cadenas no contienen suficientes posiciones ni longitud para los enlaces de la trombina y del Factor Xa, una enzima que participa en la cascada de la coagulación. La actividad inhibitoria frente al factor Xa y la trombina desciende de forma dramática en el rango de las moléculas de heparina de más bajos pesos moleculares. De este modo, los ATH formados a partir de estas cadenas de heparina de muy bajo peso molecular tienen esencialmente cero actividad para prevenir la trombogénesis. Aunque la heparina comercial contiene un porcentaje relativamente pequeño de cadenas de heparina por debajo de 5.000 Daltons, estas cadenas de heparina de muy bajo peso molecular tienen una reactividad tan elevada con la AT que una importante cantidad del ATH formado contiene cadenas de heparina de muy bajo peso molecular.

Si no se elimina en primer lugar la heparina de muy bajo peso molecular con anterioridad a la conjugación, una proporción más elevada de terminales reactivos de esta población, en comparación con la de la heparina de mayor peso molecular, tenderá a desplazar a las demás moléculas de heparina en diversas medidas a lo largo de todo el espectro de pesos moleculares (dado que la proporción de terminales de aldosa varía continuamente a lo largo de todo el rango de pesos moleculares de la heparina). Esto puede tener efectos adversos sobre el ATH final. En primer lugar, el ATH contendrá una importante población de moléculas de ATH que contienen cadenas muy pequeñas de heparina sin actividad. En segundo lugar, el resto de moléculas de ATH (aparte de este rango de ATH de muy bajo peso molecular) contendrá una población de heparina con una reducida proporción de cadenas de heparina con unos rangos discretos de peso molecular con menos aldosas terminales para competir con las cadenas de heparina de bajo peso molecular inactivas.

Esta heparina baja en aldosa tiende a encontrarse en las cadenas mucho más largas, pero no está enteramente definida por una relación directa entre la longitud de la cadena de heparina y los terminales de aldosa requeridos para su enlace con la AT.

Además, la heparina con al menos 18 unidades de monosacáridos también puede resultar más eficaz a la hora de inhibir la trombina. Al menos se utilizan 18 unidades de monosacáridos para enlazar la antitrombina y la trombina. El mecanismo mediante el cual la heparina se une a la antitrombina y la trombina se denomina plantilla o mecanismo de puente. La heparina puede ejercer su efecto mediante la activación conformacional mediante el enlace con la AT y la conversión alostérica de la AT en una forma estructural que resulte mucho más reactiva a las proteasas de la coagulación. Alternativamente, la heparina puede actuar como una plantilla mediante su enlace con el inhibidor y con la enzima, localizando de este modo las moléculas para la reacción. En este mecanismo, se produce la activación de conformación de la AT mediante la heparina, pero se consigue mejorar el ritmo de la reacción mediante enlaces simultáneos de heparina a la enzima, colaborando así en la aproximación del factor de coagulación hacia el inhibidor activado. La longitud de cadena mínima concreta de 18 monosacáridos puede explicar por qué se produce una caída muy abrupta de la actividad frente a la trombina dentro de la fracción de heparina de bajo peso molecular. Partiendo de la estructura correspondiente a un ácido urónico monosulfatado-disacárido bisulfatado de glucosamina heparina, es decir, sin el sodio u otros de los iones que se encuentran en una sal, el peso molecular de una cadena de 18 sacáridos (9 disacáridos) estaría en torno a 4500 Daltons.

Las cadenas de heparina con un peso molecular algo más bajo pueden resultar útiles en la inhibición del factor Xa. Una secuencia concreta de pentasacárido de la heparina puede enlazar con la AT y activar la AT para la inhibición del factor Xa. Esta secuencia específica de pentasacárido se encuentra disponible por sí misma como el fármaco "Fondaparinux," pero la secuencia también puede darse en cadenas de heparina. La secuencia de los monosacáridos se muestra en la fórmula I:



(I)

De este modo, las cadenas de heparina con menos de 18 monosacáridos que contienen esta secuencia de pentasacárido pueden ser capaces de activar la AT para inhibir el factor Xa aun cuando las cadenas no sean lo suficientemente largas como para unir la AT y la trombina.

Las cadenas de heparina de mayor longitud pueden presentar en algunos casos la actividad inhibidora más elevada. No obstante, algunas cadenas de heparina de rango medio y más bajo peso molecular pueden enlazarse de forma significativamente menos indeseable a otras proteínas del plasma y plaquetas. Por lo tanto, estas cadenas de heparina de rango medio pueden ser más selectivas a la hora de inhibir la trombina y el factor Xa sin causar efectos secundarios no deseados, como la disfunción de las plaquetas que dejan de unirse a las plaquetas y se unen a otros materiales.

El aislamiento del ATH con mayor peso molecular tras la conjugación, para obtener un ATH de cadena muy larga proporciona un producto distinto y menos deseable en comparación con la tecnología de la presente invención, que separa (sustancialmente o en su totalidad) la heparina con anterioridad a la conjugación. Por ejemplo, la proporción de moléculas de elevada actividad con 2-pentasacáridos en esta subpoblación puede alterarse debido a una capacidad diferencial de estas cadenas de elevada actividad para competir por la conjugación con las heparinas de muy bajo peso molecular. Adicionalmente, el aislamiento del ATH de elevado peso molecular tras la conjugación elimina las moléculas de ATH con cadenas de heparina de rango medio y menor tamaño, que también se encuentran activas y presentan otras características deseadas, como la reducción de los enlaces no selectivos con las proteínas y plaquetas del plasma.

Alternativamente, es probable que los intentos de reacción de todas las cadenas de heparina con aldosas terminales con AT incrementando la proporción de AT frente a heparina en la mezcla de reacción no tengan éxito, debido a que muchos experimentos han

demostrado que tan sólo se obtiene un máximo de conversión de AT en ATH de hasta un 60% en peso aún cuando la aldosa contenga heparina en forma de múltiplos y a las concentraciones prácticas más elevadas. La reducción adicional de la proporción de heparina frente a AT tan sólo reducirá aún más el rendimiento del ATH sin ninguna garantía de que todas las cadenas activas más largas vayan a incorporarse al producto.

En algunas realizaciones, una composición para la prevención de la trombogénesis puede contener ATH formado a partir de heparina comercial de la que se han eliminado sustancialmente todas las cadenas de heparina con a peso molecular inferior a 3.000 Daltons (por ejemplo, al menos un 98% en peso del resto de las cadenas de heparina pueden tener un peso molecular superior a 3.000 Daltons). En otras realizaciones, las cadenas de heparina con un peso molecular inferior a 5.000 Daltons pueden eliminarse o eliminarse sustancialmente. De este modo, el producto ATH puede contener cadenas de heparina cuyo peso molecular varía desde los 3.000 Daltons (o 5.000 Daltons) hasta los pesos moleculares más elevados que contiene la heparina comercial. En algunos ejemplos, este rango de pesos moleculares puede oscilar entre 3.000 Daltons y 50.000 Daltons, o entre 5.000 Daltons y 50.000 Daltons. En ejemplos adicionales, al menos una porción de las cadenas de heparina puede estar dentro de la gama media de pesos moleculares. Por ejemplo, al menos una porción de las cadenas de heparina del ATH pueden tener un peso molecular que oscile entre 3.000 Daltons y 30.000 Daltons, entre 3.000 Daltons y 20.000 Daltons, entre 3.000 Daltons y 15.000 Daltons, entre 3.000 Daltons y 10.000 Daltons, entre 5.000 Daltons y 30.000 Daltons, entre 5.000 Daltons y 20.000 Daltons, entre 5.000 Daltons y 15.000 Daltons, o entre 5.000 Daltons y 10.000 Daltons. De este modo, el ATH puede estar desprovisto o sustancialmente desprovisto de cadenas de heparina con un peso molecular por debajo de 3.000 Daltons o de 5.000 Daltons.

La heparina comercial puede contener típicamente una gama de cadenas de heparina con pesos moleculares que oscilen entre 1.000 Daltons o menos y 50.000 Daltons o más. La fracción de peso molecular más bajo, como las cadenas cuyos pesos moleculares se encuentran por debajo de 3.000 o 5.000 Daltons, pueden eliminarse mediante cualquier procedimiento que resulte adecuado. Entre los ejemplos no limitativos de eliminación de cadenas de bajo peso molecular se encuentra la diálisis, la diafiltración, filtración mediante gel y electroforesis. La diálisis o diafiltración puede llevarse a cabo en condiciones de elevada salinidad. Por ejemplo, las condiciones de elevada salinidad para diálisis o diafiltración pueden incluir concentraciones de sal variables entre aproximadamente NaCl 1 M y aproximadamente NaCl 4 M. También pueden utilizarse otras sales distintas del NaCl. La elevada concentración de sal puede colaborar en el desplazamiento de las cadenas pequeñas a través de unas membranas con el tamaño de poro adecuado. El filtrado

mediante gel puede llevarse a cabo utilizando un medio adecuado para la separación de moléculas en función de su tamaño. En un ejemplo concreto, el filtrado mediante gel puede efectuarse en Sephadex® G-200, que es un medio de gel para la separación de moléculas con pesos moleculares variables entre 1.000 y 200.000 Daltons. La heparina comercial puede filtrarse mediante gel en una columna de gel, pudiendo eluirse una serie de fracciones con las primeras fracciones que contengan las cadenas de mayor peso molecular y con las siguientes fracciones con unos pesos moleculares progresivamente inferiores. Pueden determinarse los pesos moleculares de la heparina de cada fracción, pudiendo agruparse las fracciones que tengan los pesos moleculares deseados. Mediante este procedimiento se pueden excluir aquellas fracciones que contengan heparina con pesos moleculares situados por debajo del umbral de 3.000 o 5.000 Daltons. Si así se desea, las cadenas de heparina que se encuentren por encima de un determinado umbral también pueden excluirse. Por ejemplo, pueden excluirse, si así se desea, las fracciones que contengan heparina por encima de 50.000 Daltons, 30.000 Daltons, 20.000 Daltons, 15.000 Daltons, o 10.000 Daltons. Las fracciones agrupadas que tengan el rango deseado de pesos moleculares pueden entonces utilizarse para la síntesis del ATH.

Ha de tenerse en cuenta que los procedimientos de eliminación de las cadenas de heparina de muy bajo peso molecular descritos anteriormente son tan sólo ejemplos y no deben considerarse limitativos. En la presente invención puede utilizarse cualquier procedimiento de tratamiento de la heparina comercial para la eliminación de las cadenas de heparina situadas por debajo de un determinado umbral de peso molecular.

El ATH puede formarse mediante la conjugación de la AT con la heparina, a la que se ha desprovisto de las cadenas con muy bajo peso molecular. Los ejemplos de procedimientos de conjugación de heparina con AT se describen en la Patente de los EE.UU. Nº 7.045.585, que queda incorporada al presente documento por referencia. Estos procedimientos pueden aplicarse a la formación del ATH utilizando heparina de la que se han eliminado las cadenas con muy bajo peso molecular, como se describe en este documento. La heparina puede conjugarse con la AT mediante un sencillo proceso de una etapa, que proporciona la unión covalente de la amina de una amina que contenga fracciones (incluyendo, entre otras, aminas que contengan oligo(poli)sacáridos, aminas que contengan lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y cualquier amina que contenga xenobióticos) con un residuo de aldosa terminal de una cadena de heparina. Para la formación del ATH, la amina que contiene fracciones se encuentra presente en la AT, aunque pueden conjugarse otras proteínas utilizando los mismos procedimientos. Los medios suaves no destructivos que se facilitan en este documento permiten la máxima retención de la actividad biológica de

la proteína y permiten el enlace directo de la proteína sin necesidad de grupos separadores intermedios.

En una realización, la heparina se incuba con AT a un pH adecuado para la formación de iminas entre la amina y la aldosa terminal o el residuo de cetosa de la heparina. Por lo general existen la aldosa terminal y los residuos de cetosa como un equilibrio entre la forma semiacetal o semicetal cíclica cerrada en anillo y los correspondientes equivalentes de aldehído o cetona de anillo abierto. En general, las aminas son capaces de reaccionar con la forma en anillo abierto para obtener una imina (base de Schiff). Normalmente, las aldosas son más reactivas porque los correspondientes aldehídos de la forma abierta en anillo son más reactivos frente a las aminas. Por lo tanto, la formación del conjugado covalente entre aminas y residuos de aldosa terminal de la heparina proporciona un procedimiento para enlazar la AT que contiene una amina a la heparina.

La reacción suele llevarse a cabo a un pH de entre aprox. 4,5 a aprox. 9, y más normalmente, de entre aprox. 5 y aprox. 8, a incluso más típicamente de entre aprox. 7 y aprox. 8. La reacción suele tener lugar en medio acuoso. No obstante, los medios orgánicos, y especialmente los disolventes orgánicos polares hidrófilos, como los alcoholes, éteres y formamidas y similares pueden utilizarse en proporciones de hasta un 40% aproximadamente para aumentar la solubilidad o reactividad de los reactivos, en caso necesario. También pueden utilizarse tampones no nucleofílicos, como fosfato, acetato, bicarbonato y similares.

En ciertos casos, las iminas formadas mediante condensación de las aminas de la AT con los residuos de aldosa terminal de la heparina se reducen a las aminas correspondientes. Esta reducción puede llevarse a cabo simultáneamente con la formación de la imina o posteriormente. Puede utilizarse una gran variedad de agentes reductores, como agentes reductores de hidruros, incluyendo borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio. En un ejemplo, puede utilizarse cualquier agente reductor que no reduzca los enlaces de disulfuro.

Alternativamente, si no se desea la reducción de la imina intermedia, la imina se puede incubar durante un período de tiempo suficiente, normalmente de entre aproximadamente 1 día a 1 mes, más normalmente de entre 3 días y 2 semanas, para permitir que tenga lugar la transposición de Amadori de la imina intermedia. Los residuos de aldosa terminal de las heparinas conjugadas mediante los procedimientos facilitados en esta invención suelen poseer grupos hidroxilos C2 en el residuo de aldosa terminal, es decir, una fracción 2-hidroxi carbonil que se ha convertido en una 2-hidroximina por condensación con la amina de la AT que se conjuga con la heparina. En la transposición de Amadori, que

resulta muy frecuente en los carbohidratos, la α -hidroximina (imina en C1, hidroxilo en C2) formada por la condensación inicial puede transponerse para formar una (α -cetoamina por enolización y reprotonación (ceto en C2, amina en C1)). La α -carbonilamina resultante se ve termodinámicamente favorecida con respecto a la α -hidroximina precursora, facilitando de este modo un aducto estable, con una mínima perturbación de la cadena de heparina. De este modo, en esta realización, la tecnología facilita una cadena de heparina conjugada covalentemente en el C1 del residuo de aldosa terminal de la heparina con una amina que contiene AT mediante un enlace amina. Si se desea, el conjugado resultante puede reducirse o etiquetarse mediante reducción del grupo carbonil C2 con un reactivo etiquetador (por ejemplo, NaB^3H_4), o conjugarse con una segunda amina que contenga especies, como una etiqueta fluorescente.

Aunque la anterior descripción se centra en la heparina y la AT, pueden conjugarse diversas especies que contienen aminas con una serie de glicosaminoglicanos mediante los procedimientos que se describen en este documento. La amina primaria puede encontrarse en una molécula pequeña, como por ejemplo, un fármaco o etiqueta fluorescente o cromofórica, o una macromolécula, como por ejemplo, una proteína (anticuerpos, enzimas, receptores, factores de crecimiento y similares), un polinucleótido (ADN, ARN y mezclas de polímeros de dichos ácidos) o un polisacárido. En general, cuando las proteínas se conjugan con glicosaminoglicanos, los enlaces tendrán lugar a través de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina. Alternativamente, los enlaces también pueden llevarse a cabo mediante el grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal. Además, pueden utilizarse otros muchos procedimientos conocidos por cualquier experto en la materia para introducir la funcionalidad amina en una macromolécula.

Concretamente, la tecnología de la presente invención puede aplicarse a una diversidad de proteínas terapéuticamente útiles, cuando resulten importantes las consideraciones relativas a la vida media y a la coagulación de la sangre. Dichas proteínas incluyen las enzimas de la sangre, anticuerpos, hormonas y similares, así como los activadores plasminogénicos relacionados, como la estreptocinasa y sus derivados. Concretamente, esta tecnología facilita conjugados de heparina o dermatán sulfato con antitrombina, con el cofactor II de la heparina (HCII) o con análogos del cofactor II de la heparina.

Los procedimientos descritos en la presente invención facilitan conjugados de glicosaminoglicano con una retención máxima de la actividad biológica. Concretamente, se facilitan conjugados de heparina o dermatán sulfato con AT o con HCII, que poseen > 60 % en peso, normalmente > 90% en peso, más frecuentemente > 95% en peso, y más típicamente > 98% en peso de actividad intacta de heparina y antitrombina no conjugadas.

Los procedimientos de la presente tecnología facilitan moléculas intactas de heparina conjugadas con antitrombina o con el cofactor II de la heparina. De este modo, se evita la pérdida de actividad biológica asociada a la fragmentación u otro tipo de modificación de la heparina con anterioridad a la conjugación. Los conjugados de heparina según esta tecnología mantienen su actividad anticoagulante debido a que se han preparado a partir de heparina intacta. Por lo tanto, los procedimientos descritos en este documento se pueden utilizar para preparar conjugados activos de heparina uniendo en primer lugar grupos de enlace y separadores a las especies que se desea conjugar con la heparina (o el glicosaminoglicano en cuestión que se utilice) uniéndolo posteriormente a la heparina. En el *Inmunotechnology Catalog and Handbook*, de Pierce Chemical Company (1990), que queda incorporado a este documento por referencia, se describen numerosos procedimientos de incorporación de grupos amino reactivos a otras moléculas y soportes sólidos. Por lo tanto, cualquier especie que posea grupos amino reactivos o que sea capaz de ser modificada para contener dichos grupos amino mediante cualquier procedimiento conocido en la actualidad o que pueda conocerse en el futuro puede conjugarse covalentemente a glicosaminoglicanos como la heparina, mediante los procedimientos descritos en este documento, y la totalidad de dichos conjugados queda contemplada en la presente invención.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la tecnología de la presente invención se aprovecha de la circunstancia de que la heparina nativa (aislada de la mucosa intestinal), así como el dermatán sulfato, ya contiene moléculas con aldosas terminales que existirían en equilibrio entre el hemiacetal y las formas de aldehído. De este modo, la heparina o el dermatán sulfato pueden conjugarse con serpinas antitrombinas mediante la reducción de la base de Schiff única formada espontáneamente entre el aldehído de la aldosa terminal de la heparina o dermatán sulfato y un amino de la serpina. La heparina o dermatán sulfato permanece inalterada (sin reducción de la actividad) con anterioridad a la conjugación, y se une en un emplazamiento específico en un extremo de la molécula, sin que se den grupos de activación no bloqueados o reticulación de la serpina.

En otro aspecto de la presente invención, pueden producirse complejos covalentes mezclando simplemente heparina y AT en una solución tampón y dejando que se forme espontáneamente una cetamina mediante una transposición de Amadori entre la aldosa terminal de la heparina y un grupo amino de la AT. De este modo, esta tecnología facilita procedimientos de utilización de la transposición de Amadori para elaborar conjugados de glicosaminoglicanos con especies que contienen amina, especialmente las proteínas. Este procedimiento de conjugación resulta especialmente simple y sencillo, y minimiza la

modificación del glicosaminoglicano, elevando de este modo al máximo la conservación de su actividad biológica.

Otro aspecto de la presente tecnología facilita conjugados covalentes de glicosaminoglicanos, y concretamente, de heparina, etiquetados en su extremo con una amina que contiene especies en el residuo de aldosa terminal del glicosaminoglicano. Por ejemplo, la heparina y la AT pueden unirse entre sí directamente, de forma que la secuencia activa de pentasacárido correspondiente a la AT de la heparina se encuentra muy cercana para su enlace. Este es uno de los motivos fundamentales para la realización de un complejo covalente heparina-AT, ya que la heparina acelera la inhibición a través de la AT únicamente si la AT puede enlazar la secuencia activa. Es notable que el ATH tenga la propiedad exclusiva de que la H (heparina) del conjugado activa estequiométricamente la AT endógena, al tiempo que activa por catálisis la AT exógena. Normalmente, una amina que contenga especies se unirá a cada glicosaminoglicano. Sin embargo, será evidente que la proporción de amina que contiene especies frente al glicosaminoglicano puede reducirse por debajo de uno, ajustando las proporciones molares de los reactivos o el tiempo de reacción.

Los glicosaminoglicanos están disponibles en diversas formas y pesos moleculares. Por ejemplo, la heparina es un mucopolisacárido, aislado a partir de intestinos de cerdo o de pulmón de res, y es heterogénea en relación con su tamaño molecular y estructura química. Consiste básicamente en residuos de (1-4) 2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosil, y α -L-ácido idopiranosilurónico enlazado con una cantidad relativamente pequeña de residuos de β -D-ácido glucopiranosilurónico. Los grupos hidroxilo y amino se derivan en diversos grados mediante sulfatación y acetilación.

Las moléculas de heparina también se pueden clasificar en base a su contenido de pentasacárido. Alrededor de una tercera parte de la heparina contiene cadenas con una única copia del único pentasacárido con una elevada afinidad por la AT, mientras que una proporción mucho más pequeña (calculada en aproximadamente el 1% del total de heparina) consiste en cadenas que contienen más de una copia del pentasacárido con elevada afinidad. El resto (aproximadamente el 66%) de la heparina no contiene el pentasacárido. De este modo, la denominada "heparina estándar" constituye una mezcla de las tres especies, la heparina de "baja afinidad", que carece de una copia del pentasacárido, la heparina de "alta afinidad" que está enriquecida para las especies que contienen al menos una copia del pentasacárido, y la heparina de "muy alta afinidad" que se refiere al aproximadamente 1% de moléculas que contienen más de una copia del pentasacárido. Estas tres especies pueden separarse entre sí utilizando procedimientos rutinarios de cromatografía, como la cromatografía sobre una columna de afinidad de antitrombina.

Una ventaja de la formación de un conjugado entre la heparina y una especie que contenga al menos un grupo amino primario (por ejemplo, AT) utilizando el proceso de glicación lenta que se describe en este documento, es la selección aparente de cadenas de heparina que contengan dos pentasacáridos. De este modo, por ejemplo, el ATH preparado mediante el procedimiento de la presente invención parece enriquecido para la especie de heparina que contiene dos pentasacáridos. Cuando se utiliza heparina estándar (que contiene aproximadamente un 1% de heparina con dos pentasacáridos) como matral de partida, generalmente más del 10% del ATH resultante comprende heparina de dos pentasacáridos, más frecuentemente más de un 20%, frecuentemente más de un 35%, y con mayor frecuencia más de un 50% del ATH, aproximadamente, comprende heparina con dos pentasacáridos.

Este enriquecimiento puede ser el responsable de una serie de propiedades útiles del ATH. El ATH de la presente tecnología activa estequiométricamente la AT con la que se ha conjugado, pero activa por catálisis la AT exógena. De este modo, la heparina situada en el interior del complejo ATH actúa catalíticamente cuando el ATH se administra como anticoagulante sistémico y cuando el ATH se utiliza para el revestimiento de superficies para convertirlas en no trombogénicas. El procedimiento de la tecnología produce un complejo ATH con una muy elevada actividad específica anti-factor IIa. Además, la segunda cadena de pentasacáridos del complejo ATH puede interactuar con las moléculas exógenas de AT permitiendo de este modo que la heparina conjugada muestre actividad catalítica. Además, la heparina del complejo ATH puede orientarse de tal forma que el pentasacárido esté disponible para enlazar y activar la circulación de las moléculas de AT cuando el complejo ATH se une a la superficie protésica.

Se observará que un conjugado de heparina de interés (por ejemplo, ATH) también puede obtenerse incubando una especie que contenga al menos un grupo amino primario (por ejemplo, AT) con heparina purificada de muy elevada actividad (es decir, que contenga dos grupos pentasacáridos) o una fracción enriquecida para una heparina de muy alta afinidad.

Aunque esta tecnología se ha ejemplificado básicamente en relación con la heparina, es evidente que todos los glicosaminoglicanos, independientemente de su peso molecular y de su derivatización, pueden conjugarse mediante los procedimientos que aquí se describen, siempre que posean un residuo de aldosa terminal. Los conjugados de todos estos glicosaminoglicanos y su preparación mediante los procedimientos que aquí se describen se encuentran dentro del ámbito de lo revelado por esta invención. Por ejemplo, los conjugados de heparina derivados con fosfatos, sulfonatos y similares, así como los

glicosaminoglicanos con pesos moleculares inferiores o superiores a los pesos moleculares de la heparina se encuentran dentro del ámbito de la presente invención.

En un aspecto adicional de la presente invención, un procedimiento de fabricación de una composición para prevenir la trombogénesis puede incluir el conjugar la AT con heparina fuera del cuerpo de un paciente para obtener un conjugado de antitrombina-heparina, donde la cantidad de antitrombina obtenida en el conjugado de antitrombina-heparina es superior a un 60% en peso, superior a un 65% en peso, superior a un 75% en peso, superior a un 85% en peso, superior a un 90% en peso, superior a un 95% en peso, o superior a un 99% en peso en función de la antitrombina utilizada inicialmente en la síntesis. El rendimiento se puede incrementar a través de diversos procedimientos. En un ejemplo, la AT puede conjugarse con heparina mediante los procedimientos anteriormente descritos. Tras la conjugación, cualquier AT no enlazada puede reciclarse y utilizarse en otra reacción de conjugación con heparina. Tras cada etapa de incubación de AT con heparina, la AT no enlazada puede reciclarse y utilizarse para obtener ATH adicional.

En otro ejemplo, el rendimiento del ATH puede aumentarse utilizando un catalizador en la transposición de Amadori. Entre algunos de los ejemplos de catalizadores que pueden aumentar el ritmo de la transposición de Amadori se encuentran la 2-hidroxipiridina, sales de amina terciarias, malonato de etilo, fenilacetona y ácido acético, así como otros ácidos. En un ejemplo concreto, la AT y la heparina pueden reaccionar entre sí en presencia de 2-hidroxipiridina mientras se calientan en agua o en disolventes muy anfífilos, como la formamida. En otros ejemplos, la AT y la heparina pueden reaccionar entre sí en presencia de trimetilamina o de sales de trimetilamina.

La velocidad de la transposición de Amadori también puede aumentarse mediante sistemas de disolventes que aceleran la transposición de Amadori. Entre algunos de los ejemplos de estos disolventes se incluyen las mezclas de agua con formamida, dimetilformamida, dioxano, etanol, dimetilsulfóxido, piridina, ácido acético, trimetilamina, trietilamina, y sus combinaciones. La heparina y la AT pueden hacerse reaccionar en estos sistemas disolventes para acelerar la transposición de Amadori para formar ATH.

Un procedimiento adicional para aumentar la velocidad de conjugación de la aldosa heparina con una molécula que contenga aminas implica la utilización de un agente de enlace. El agente de enlace puede ser un agente heterobifuncional, con un grupo que reacciona frente a la aldosa de la heparina en un extremo y frente a un grupo diferente en el otro extremo, que puede utilizarse para enlazarse a una AT o a un agente de enlace secundario que puede unirse entonces a una AT. En un ejemplo concreto, el agente de enlace puede contener hidracina en un extremo y un grupo amino en el otro, como 2-aminoetilhidracina. Este agente de enlace puede reaccionar con la heparina para formar

hidracina con el aldehído aldosa de la heparina. El producto puede dializarse o diafiltrarse mediante membranas que permitan eliminar las cadenas de heparina con menos de 3.000 o 5.000 Daltons de peso molecular, junto con cualquier agente de enlace que no haya reaccionado. A continuación, el producto heparina-hidrazona puede hacerse reaccionar con una gran cantidad del exceso de agente de enlace secundario. El agente de enlace secundario puede ser un reactivo homobifuncional que posea grupos carboxilos activados en cada extremo, como ácido succínico di(N-hidroxisuccinimida) un éster (obtenido mediante esterificación del ácido succínico con N-hidroxisuccinimida utilizando agentes de condensación como carbonildiimidazol o una carbodiimida) de forma que el grupo amino del agente de enlace de la hidracina reacciona precisamente con uno de los carboxilos activados en el agente de enlace secundario. La mezcla de la reacción puede dializarse o diafiltrarse para eliminar el agente de enlace secundario sin reaccionar. En este punto, el producto será heparina modificada por el agente de enlace amino-hidracina así como el agente de enlace secundario. Este producto puede incubarse con AT en una solución tampón de H₂O de forma que el grupo amino de la AT reaccione con el segundo grupo carboxilo activado en el agente de enlace secundario para formar un conjugado AT-Heparina, donde la AT y la heparina están enlazadas mediante el agente de enlace y el agente de enlace secundario.

Una vez formado el ATH, el ATH puede liofilizarse (deseccación por congelación) para su almacenamiento. En una realización, el ATH puede prepararse en una solución que contenga tan sólo agua, liofilizándose a continuación. En otra realización, el ATH puede prepararse en una solución con agua y alanina a una concentración variable entre 0,01-0,09 molar, y liofilizarse a continuación. En otra realización adicional, el ATH puede prepararse en una solución que contenga agua y manitol, liofilizándose a continuación. Cada uno de estos procedimientos puede utilizarse independientemente, y cada uno de los procedimientos presenta sus propias ventajas. Tras la liofilización mediante cualquiera de estos procedimientos, el ATH puede reconstituirse y mantener una importante cantidad de su actividad de inhibición de la trombina, en comparación con su actividad anterior a la liofilización. En algunos casos, el ATH puede retener al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 98% de su actividad de inhibición de la trombina. Se ha demostrado que la utilización de otros procedimientos de liofilización del ATH, como la preparación del ATH en una solución que contenga una sal más de 1 molar con anterioridad a la liofilización puede destruir la actividad del ATH.

Tanto si el ATH se ha liofilizado o no, el ATH puede prepararse en una solución acuosa que contenga entre 9 y 11 mg/ml de ATH con respecto a la totalidad del volumen de

la solución. Se ha demostrado que la fabricación de soluciones con una concentración de ATH superior a 11 mg/ml puede provocar una agregación del ATH que resulta difícil o imposible de revertir. No obstante, pueden elaborarse soluciones acuosas estables con concentraciones de ATH de entre 9 y 11 mg/ml. Esta solución puede formularse para su administración a un paciente para el tratamiento de cualquiera de las dolencias descritas en este documento. La solución también puede incluir diversos aditivos, siempre que sean adecuados para su administración a un paciente.

En la práctica clínica, los conjugados de heparina de la presente invención pueden utilizarse en general de la misma forma y bajo la misma modalidad de preparación farmacéutica que la heparina disponible en el comercio para su uso clínico. De este modo, los conjugados de heparina de la presente invención pueden incorporarse a soluciones acuosas para su inyección (intravenosa, subcutánea o similar) o infusión intravenosa, o en preparaciones de bálsamos para su administración a través de la piel y de las membranas mucosas. Puede practicarse cualquier tipo de terapia, tanto profiláctica como curativa, conocida en la actualidad o disponible en el futuro, para la cual se encuentre indicada la terapia con heparina, con los conjugados de heparina indicados en la presente invención.

Las conjugados de heparina según la presente invención resultan especialmente útiles para el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (RDS), neonatal y en adultos. Al contrario que el uso de complejos no covalentes heparina-AT, la utilización de conjugados covalentes de heparina de la presente invención impide la pérdida de heparina en el espacio pulmonar al disociarse la AT. En este caso, una solución de complejo covalente en una solución tampón fisiológica puede facilitarse como una pulverización atomizada en las vías respiratorias, mediante un catéter o inhalador. Debido a su gran tamaño, el ATH permanecerá en los alvéolos durante un período más prolongado. El ATH también es útil para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática.

El uso a largo plazo en la circulación puede llevarse a cabo mediante inyección intravenosa o subcutánea del complejo en una solución tampón fisiológica. Los conjugados covalentes de esta tecnología también pueden utilizarse para el tratamiento de estados de deficiencia de AT adquirida caracterizados por complicaciones trombóticas como un bypass cardiopulmonar, oxigenación molecular extracorpórea, etc. Ya que la más larga vida media del complejo covalente permite realizar menos tratamientos con una menor monitorización. Adicionalmente, la presente invención permite el tratamiento profiláctico de pacientes adultos en situación de riesgo por trombosis venosa.

El conjugado de ATH según esta tecnología presenta numerosas ventajas frente a la AT y la heparina estándar que no han formado complejos. Dado que la AT se une mediante enlace covalente a la heparina, el enlace no específico del ATH a las proteínas del plasma

se producirá con menor frecuencia que en el caso de la heparina estándar, lo que tiene como resultado menos variaciones inter-individuales en la respuesta a la dosis con ATH que con la heparina estándar. La más prolongada vida media del ATH tras su inyección intravenosa en seres humanos significa que puede obtenerse un efecto anticoagulante sostenido administrando ATH con una frecuencia menor que la requerida en el caso de la AT y la heparina estándar sin formar complejos. El ATH es un desactivador de la trombina y del factor Xa mucho más eficaz que el AT, y puede ser efectivo cuando se utiliza a unas concentraciones mucho más bajas que las de AT en pacientes con deficiencia de AT. Asimismo, el ATH puede acceder a la trombina ligada a la fibrina e inhibirla. Por último, al unirse (por ejemplo, mediante un enlace covalente) a superficies protésicas (por ejemplo, injertos endovasculares), el ATH ha demostrado poseer una actividad antitrombótica in vivo mucho mayor que la de la AT, unida a la heparina mediante enlace covalente, o la hirudina unida mediante enlace covalente.

Los neonatos prematuros presentan una elevada incidencia del síndrome de dificultad respiratoria (RDS), una grave enfermedad pulmonar que requiere tratamiento con ventilación asistida. La ventilación asistida a largo plazo lleva a la aparición de displasia broncopulmonar (BPD) como resultado de la lesión pulmonar, lo que permite que las proteínas de coagulación del plasma se desplacen hacia los espacios alveolares del pulmón. Esto da como resultado la aparición de trombina, y posteriormente, de fibrina. Se ha observado frecuentemente la presencia de fibrina en el tejido pulmonar y los espacios aéreos de niños fallecidos por RDS. Este gel de fibrina en el interior del espacio aéreo dificulta el transporte del fluido al exterior de los espacios aéreos pulmonares, con el resultado de un edema pulmonar persistente. La presente tecnología permite el tratamiento de dichas enfermedades del tejido pulmonar mediadas por fibrina, impidiendo la formación de fibrina intra-alveolar, manteniendo un “entorno anti-trombótico” y/o mejorando la fibrinólisis en el interior del tejido pulmonar, reduciendo así la carga de fibrina en los espacios aéreos del pulmón.

Los conjugados de heparina pueden administrarse directamente en los espacios aéreos del pulmón a través de las vías respiratorias profilácticamente (antes de que el bebé respire por primera vez). Esto garantiza que el agente antitrombótico esté directamente disponible en el emplazamiento de los posibles depósitos de fibrina y que se evite el riesgo de sangrado asociado a las terapias antitrombóticas. Asimismo, el agente antitrombótico ya se encontrará presente en el pulmón con anterioridad al inicio del soporte respiratorio asociado a la lesión inicial, es decir, a diferencia de la administración sistémica de la antitrombina cuando el cruce del fármaco administrado hacia el espacio aéreo pulmonar no se produzca hasta después de la lesión pulmonar. Como la heparina está unida a la AT

mediante enlace covalente, permanecerá en los espacios aéreos pulmonares. También puede ser una terapia coadyuvante de los tensioactivos actualmente administrados para impedir el RDS y la BPD. “agente tensioactivo pulmonar” significa la sustancia jabonosa que se encuentra normalmente presente en los espacios aéreos pulmonares, cuya función principal consiste en impedir el colapso del espacio aéreo, así como colaborar en la transferencia de gas. Los conjugados también pueden administrarse repetidamente a través de un tubo endotraqueal o como un aerosol inhalado. También puede practicarse como terapia coadyuvante con medicaciones para el asma mediante inhalador (por ejemplo, esteroides antiinflamatorios, como el dipropionato de beclometasona), otros antiasmáticos como el cromolino sódico (sal bisódica de 1,3-bis(2-carboxichromo-5-iloxi)-2-hidroxiopropano, (“INTAL”) y broncodilatadores como el sulfato de albuterol.

Pueden tratarse otras muchas enfermedades asociadas a una elevada actividad de la trombina y/o a la formación de depósitos de fibrina mediante la administración de los conjugados de esta invención. Los procesos inflamatorios vinculados al síndrome de dificultad respiratoria del adulto son básicamente similares a los presenciados con la RDS neonatal y pueden tratarse mediante la terapia antitrombótica descrita. También se ha observado que la fibrosis pulmonar espontánea activa las cascadas de coagulación/fibrinolíticas en los espacios aéreos pulmonares. La enfermedad fibrótica del pulmón suele ser un efecto secundario asociado a la quimioterapia anticancerígena, y la administración antitrombótica de los conjugados de heparina covalentes según esta tecnología puede realizarse profilácticamente con anterioridad a la quimioterapia contra el cáncer para impedir la fibrosis pulmonar. La administración se repite tras la quimioterapia a fin de asegurarse de que no se forma fibrina. También está bien documentado un descenso de la actividad de la antitrombina y un aumento en la actividad de la trombina en la sepsis. La sepsis es el factor de riesgo más común del desarrollo del RDS en adultos. De este modo, los conjugados de heparina según la presente invención pueden utilizarse para reducir la mortalidad asociada al choque séptico.

Los conjugados según la presente invención pueden administrarse a una dosis terapéuticamente efectiva, es decir, en una cantidad que, al administrarse a un mamífero que la precise, sea suficiente para efectuar el tratamiento, como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, reducir o tratar en otra forma la trombosis en mamíferos, o desactivar la trombina de los coágulos, o inhibir la acumulación de trombos). La administración de los compuestos activos y sales descritos en el presente documento puede llevarse a cabo a través de cualquiera de los modos aceptados de administración para agentes que sirvan para propósitos similares.

En general, una dosis diaria aceptable se encuentra en torno a entre 0,001 y 50 mg por kilogramo de peso corporal del receptor y por día, en torno a entre 0,05 y 25 mg por kilogramo de peso corporal del receptor y por día, o en torno a entre 0,01 y 10 mg por kilogramo de peso corporal y por día. De este modo, para su administración a una persona de 70 kg, el rango de dosis puede oscilar entre unos 0,07 mg y 3,5 g por día, entre unos 3,5 mg y 1.75 g por día, o entre unos 0,7 mg y 0,7 g por día, dependiendo del individuo y del estadio de la enfermedad que se esté tratando. En el caso del ATH, la prolongada vida media permite que el compuesto se administre con menor frecuencia que la heparina estándar (por ejemplo, una o dos veces por semana).

La administración puede llevarse a cabo mediante cualquier vía sistémica o local aceptada, por ejemplo, la vía parenteral, intravenosa, nasal, inhalación bronquial (es decir, formulación en aerosol), vías transdérmica o tópica, en forma de dosis sólidas, semisólidas o líquidas, como por ejemplo, tabletas, supositorios, píldoras, cápsulas, polvo, soluciones, suspensiones, aerosoles, emulsiones o similares, como formatos monodosis adecuados para la administración sencilla de dosis precisas. Por lo general, pueden utilizarse formulaciones acuosas. El conjugado puede formularse en un medio excipiente no tóxico, inerte, farmacéuticamente aceptable, con un pH de alrededor de 3–8 o con un pH de alrededor de 6–8. Por lo general, la formulación acuosa puede ser compatible con el cultivo o medio de perfusión. Las composiciones incluirán un excipiente farmacéutico convencional o excipiente, y un conjugado del glicosaminoglicano, y además, puede incluir otros agentes terapéuticos, agentes farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, etc. Los vehículos pueden seleccionarse entre los diferentes aceites, incluyendo los derivados del petróleo, o los de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de ajonjolí, y similares. Entre los ejemplos de excipientes líquidos adecuados se encuentran el agua, la solución salina, la dextrosa acuosa o el manitol, así como los glicoles, especialmente en el caso de las soluciones inyectables. Entre los vehículos farmacéuticos adecuados se encuentran el almidón, la celulosa, el talco, glucosa, lactosa, sucrosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato magnésico, estearato sódico, monoestearato de glicerol, cloruro sódico, leche desnatada evaporada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y similares. Otros vehículos farmacéuticos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin (1985).

Si así se desea, la composición farmacéutica que va a administrarse también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, como agentes humectantes o emulsificantes, agentes reguladores del pH y similares, como por ejemplo, acetato sódico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse como una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéutico en combinación con un conjugado del glicosaminoglicano. El nivel del conjugado en una formulación puede variar dentro del amplio rango utilizado por cualquier persona versada en la materia, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 por ciento en peso (% p/p) y aproximadamente un 99,99% p/p del fármaco, basado en la formulación total, y entre un 0,01% p/p y un 99.99% p/p de excipiente. En un ejemplo, la formulación puede estar situada en torno a entre un 3,5 y un 60% en peso del compuesto farmacéuticamente activo, siendo el resto excipientes farmacéuticos adecuados.

10

Ejemplos

Los siguientes ejemplos muestran las realizaciones de la invención que mejor se conocen en la actualidad. No obstante, ha de entenderse que cuanto sigue son tan sólo ejemplos que ilustran la aplicación de los principios de la presente invención. Las personas versadas en la materia pueden concebir numerosas modificaciones y composiciones alternativas, procedimientos y sistemas, sin alejarse del espíritu y del ámbito de la presente invención. Las reivindicaciones adjuntas tratan de cubrir dichas modificaciones y adaptaciones. De este modo, aunque la presente invención se ha descrito anteriormente de forma particular, los siguientes ejemplos facilitan detalles adicionales en relación con lo que en la actualidad se consideran realizaciones prácticas de la invención.

15

20

Ejemplo 1: Eliminación de las cadenas de heparina de muy bajo peso molecular

La heparina (0,5 ml de 10.000 U.I./ml de Heparina Leo®) se filtró en una columna de cromatografía Sephadex® G-200 de 49 cm por 1 cm. La heparina se eluyó con NaCl 1 M y se recogieron fracciones de 20 gotas (1,27 g por fracción). Las absorbancias de cada fracción se indican en la tabla 1 y en la figura 1.

25

Tabla 1

Frac. N°	A ₂₁₅ (frente a H ₂ O)	Frac. N°	A ₂₁₅ (frente a H ₂ O)	Frac. N°	A ₂₁₅ (frente a H ₂ O)	Frac. N°	A ₂₁₅ (frente a H ₂ O)
1	0,370	11	0,175	21	0,800	31	0,383
2	0,210	12	0,197	22	0,922	32	0,413
3	0,185	13	0,214	23	0,948	33	0,335
4	0,207	14	0,221	24	0,844	34	0,242
5	0,171	15	0,258	25	0,713	35	0,228
6	0,193	16	0,285	26	0,567	36	0,185
7	0,181	17	0,323	27	0,445	37	0,168
8	0,173	18	0,419	28	0,352	38	0,176
9	0,192	19	0,504	29	0,341	39	0,169
10	0,169	20	0,613	30	0,331	40	0,157

Se agruparon las fracciones 24-30. Estas fracciones no incluyen las cadenas de heparina con plasminogénicos pesos moleculares muy bajos (fracciones 31-40). Las cadenas de heparina con un mayor peso molecular de las fracciones 1-23 se excluyeron en aras de la facilidad de separación del ATH de la heparina que no ha reaccionado en posteriores etapas. Las cadenas de heparina de las fracciones 24-30 tenían unos pesos moleculares tan elevados como unos 18.000 Daltons. La exclusión de las cadenas de heparina más largas garantizó que la heparina no se solapase con la AT y el ATH al purificar el producto. Sin embargo, las cadenas de heparina con más alto peso molecular pueden incluirse en el producto en otros ejemplos.

Se llevó a cabo otro filtrado con gel de la heparina (0,5 ml de 10.000 U.I./ml de Heparina Leo®) en la columna de cromatografía Sephadex® G-200 de 49 cm por 1 cm. Una vez más, la heparina se eluyó con NaCl 1 M y se recogieron fracciones de 20 gotas (1,23 g por fracción) Las absorbancias de cada fracción se muestran seguidamente en la tabla 2.

Tabla 2

Frac. N°	A ₂₁₅ (frente a H ₂ O)	Frac. N°	A ₂₁₅ (frente a H ₂ O)	Frac. N°	A ₂₁₅ (frente a H ₂ O)	Frac. N°	A ₂₁₅ (frente a H ₂ O)
1	0,155	11	0,178	21	0,691	31	0,350
2	0,157	12	0,177	22	0,792	32	0,376
3	0,160	13	0,205	23	0,834	33	0,330
4	0,157	14	0,221	24	0,803	34	0,259
5	0,155	15	0,244	25	0,711	35	0,190
6	0,169	16	0,269	26	0,592	36	0,170
7	0,160	17	0,304	27	0,476	37	0,157
8	0,159	18	0,367	28	0,386	38	0,155
9	0,158	19	0,460	29	0,333	39	0,205
10	0,160	20	0,573	30	0,321	40	0,169

Los resultados de la cromatografía mostrados en la tabla 2 eran similares en cuanto a su perfil de elución a los de la primera filtración con gel de la heparina de la tabla 1 que antecede. Las fracciones 24-30 se agruparon y se combinaron con las fracciones agrupadas procedentes de la primera cromatografía, cuyos resultados se facilitan en la tabla 1. Las fracciones combinadas agrupadas se dializaron frente a H₂O a 4° C y posteriormente se liofilizaron.

10 Ejemplo 2: Reacción de la heparina con la AT

Se dializó bajo presión AT humana hasta una concentración de 13,87 miligramos/ml y posteriormente se dializó una vez más frente a fosfato 0,02 M NaCl 0,15 M pH 7,3 a 4° C, seguido de su almacenamiento a -60° C tras la diálisis. Se disolvieron 19,12 mg de las fracciones de la heparina liofilizada del Ejemplo 1 anterior en 1 ml de fosfato bisódico 0,3 M NaCl 1 M pH 9,5 que se habían filtrado a través de un acrodisco estéril con un tamaño de poro de 0,2 micras. La solución resultante se depositó en un tubo de ensayo de plástico de 12 mm por 75 mm y se añadieron con la mezcla 72 microlitros de la AT humana. Se cerró el tubo con una tapa de plástico y se precintó el exterior de la tapa con parafilm. El tubo y sus contenidos se calentaron en un baño de agua a 37° C durante 14 días.

Tras su incubación durante 14 días, la mezcla de heparina y AT se filtró con gel en una columna de cromatografía Sephadex® G-200 de 48,5 cm por 1 cm con NaCl 1 M y se recogieron fracciones de 20 gotas. Las absorbancias de cada fracción se muestran en la

tabla 3 y en la figura 2. Con fines de comparación, en la figura 2 también se muestra una cromatografía independiente de la AT en solitario, realizada en la misma columna de cromatografía Sephadex® G-200,

Tabla 3

Frac. N°	A ₂₁₅ (frente a H ₂ O)	A ₂₈₀ (frente a H ₂ O)	Frac. N°	A ₂₁₅ (frente a H ₂ O)	A ₂₈₀ (frente a H ₂ O)	Frac. N°	A ₂₁₅ (frente a H ₂ O)	A ₂₈₀ (frente a H ₂ O)	Frac. N°	A ₂₁₅ (frente a H ₂ O)	A ₂₈₀ (frente a H ₂ O)
1	0,145	0,016	11	0,231	0,024	21	1,006	0,062	31	0,373	0,070
2	0,146	0,019	12	0,209	0,022	22	0,645	0,046	32	0,456	0,090
3	0,140	0,014	13	0,211	0,020	23	0,549	0,045	33	0,427	0,095
4	0,143	0,016	14	0,259	0,023	24	0,583	0,052	34	0,314	0,072
5	0,141	0,014	15	0,396	0,031	25	0,592	0,058	35	0,236	0,044
6	0,445	0,014	16	0,760	0,051	26	0,559	0,060	36	0,189	0,027
7	0,173	0,013	17	1,72	0,088	27	0,486	0,058	37	0,147	0,018
8	0,144	0,013	18	2,19	0,127	28	0,403	0,054	38	0,136	0,014
9	0,197	0,025	19	2,39	0,131	29	0,347	0,053	39	0,130	0,014
10	0,293	0,038	20	1,92	0,098	30	0,329	0,056	40	0,133	0,014

5

Las fracciones 14-16 que contienen el producto ATH se agruparon y dializaron bajo presión frente a NaCl 0,15 M para obtener una masa final de 0,74832 g.

Ejemplo 3: Inhibición de la actividad de la trombina por parte del ATH

10

Se realizaron experimentos para evaluar la reacción de la trombina con las fracciones dializadas bajo presión y agrupadas de ATH del ejemplo 2. En cada reacción, se mezclaron 114 microlitros del material que se estaba analizando con 5,83 microlitros de 20 U de II_a (trombina) bovina /ml de NaCl 0,15 M en un tubo plástico Eppendorf y se dejó a 23 °C durante 10 min. Tras el período de 10 minutos, se mezclaron 100 microlitros de la solución con una solución de 875 microlitros de acetato sódico 0,036 M, barbital sódico 0,036 M, NaCl 0,145 M pH 7,4 y 25 microlitros de 3,125 mg S-2238/ml H₂O en una cubeta a 23 °C al ponerse en marcha el cronómetro. El S-2238 es el sustrato cromogénico de la trombina. La absorbancia frente a H₂O a 405 nm de la solución resultante se midió cada 10 segundos durante 5 minutos. Se llevaron a cabo las siguientes reacciones:

20

Reacción 1 (control): se analizaron 114 microlitros de NaCl 0,15 M.

Reacción 2: se analizaron 114 microlitros de ATH.

Reacción 3: se analizaron 28,5 microlitros de ATH añadidos a 85,5 microlitros de NaCl 0,15 M.

Reacción 4: se analizaron 11,4 microlitros de ATH añadidos a 102,6 microlitros de NaCl 0,15 M.

5 Las absorbancias a 405 nm son una medida directa de un producto escindido del sustrato S-2238 por cualquier trombina que permaneciese en la cubeta. Las absorbancias registradas cada 10 segundos para cada reacción se muestran en la Tabla 4 y en la figura 3.

Tabla 4

Tiempo (segundos)	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4
10	0,0520	0,0290	0,0220	0,0380
20	0,0810	0,0310	0,0220	0,0540
30	0,1080	0,0320	0,0240	0,0720
40	0,0340	0,0330	0,0240	0,0890
50	0,1610	0,0340	0,0250	0,1060
60	0,1860	0,0350	0,0270	0,1230
70	0,2130	0,0370	0,0280	0,1420
80	0,2400	0,0370	0,0280	0,1600
90	0,2680	0,0400	0,0300	0,1770
100	0,2920	0,0400	0,0310	0,1950
110	0,3190	0,0400	0,0320	0,2130
120	0,3470	0,0420	0,0330	0,2300
130	0,3720	0,0430	0,0350	0,2480
140	0,4010	0,0430	0,0350	0,2670
150	0,4280	0,0440	0,0370	0,2840
160	0,4560	0,0450	0,0370	0,2990
170	0,4800	0,0460	0,0380	0,3150
180	0,5070	0,0470	0,0390	0,3320
190	0,5310	0,0480	0,0410	0,3490
200	0,5570	0,0490	0,0420	0,3660
210	0,5830	0,0500	0,0420	0,3830
220	0,6060	0,0510	0,0440	0,4020
230	0,6320	0,0520	0,0440	0,4180
240	0,6550	0,0530	0,0450	0,4360
250	0,6800	0,0530	0,0460	0,4550
260	0,7020	0,0550	0,0480	0,4710
270	0,7250	0,0560	0,0500	0,4880
280	0,7480	0,0560	0,0500	0,5040
290	0,7700	0,0570	0,0510	0,5220
300	0,7920	0,0580	0,0530	0,5380

Los datos obtenidos de estas cuatro reacciones muestran que incluso pequeños volúmenes del concentrado de ATH son capaces de neutralizar la actividad de la trombina en comparación con la reacción de control (Reacción 1) con tan sólo NaCl 0,15 M.

5 Ejemplo 4: Tiempo de coagulación con ATH

Se mezclaron 10 microlitros de II_a bovina 20 U (trombina)/ml NaCl 0,15 M con: 90 microlitros de NaCl 0,15 M, 85 microlitros de NaCl 0,15 M más 5 microlitros del concentrado de ATH del Ejemplo 2 anterior, o con 80 microlitros de NaCl 0,15 M más 10 microlitros de concentrado de ATH. Las mezclas se calentaron a 37° C durante 1 minuto en un tubo plástico. A continuación se mezclaron 100 microlitros de 0,2 g de fibrinógeno humano /100 ml de NaCl 0,15 M cuando se puso en marcha el cronómetro. Se registró el momento de la primera aparición de un coágulo en el extremo de una anilla de alambre utilizada como agitador. En los sucesivos ensayos, los 90 microlitros de NaCl 0,15 M puro arrojaron unos tiempos de coagulación de 26,2 segundos, 25,2 segundos, y 26,0 segundos. Los 85 microlitros de NaCl 0,15 M más los 5 microlitros de concentrado de ATH arrojaron unos tiempos de coagulación de 34,0 y 33,8 segundos. Los 80 microlitros de NaCl 0,15 M más los 10 microlitros de concentrado de ATH arrojaron unos tiempos de coagulación de 39,2 y 39,6 segundos. Los tiempos de coagulación más largos indican una reducción en la actividad de la trombina en las reacciones con el concentrado de ATH.

Ejemplo 5: Tiempo de coagulación con ATH

Se mezclaron 100 microlitros de 0,2 g de fibrinógeno humano /100 ml NaCl 0,15 M con: 90 microlitros de NaCl 0,15 M, 85 microlitros de NaCl 0,15 M más 5 microlitros del concentrado de ATH del Ejemplo 2 anterior, o con 80 microlitros de NaCl 0,15 M más 10 microlitros de concentrado de ATH. Las mezclas se calentaron a 37° C durante 1 minuto en un tubo plástico. A continuación se mezclaron 10 microlitros de 20 U de II_a bovina (trombina)/ml NaCl 0,15 M al ponerse en marcha el cronómetro. Se registró el momento de la primera aparición de un coágulo en el extremo de una anilla de alambre utilizada como agitador. En los sucesivos ensayos, los 90 microlitros de NaCl 0,15 M puro arrojaron unos tiempos de coagulación de 25,8 y 26,0 segundos. Los 85 microlitros de NaCl 0,15 M más los 5 microlitros de concentrado de ATH arrojaron unos tiempos de coagulación de 30,6 y 31,2 segundos. Los 80 microlitros de NaCl 0,15 M más los 10 microlitros de concentrado de ATH arrojaron unos tiempos de coagulación de 37,2 y 35,2 segundos. Los tiempos de

coagulación más largos indican una reducción en la actividad de la trombina en las reacciones con el concentrado de ATH.

Ejemplo 6: Liofilización en una solución con alto contenido en sal

5

Se preparó el ATH como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2 anteriores. Las fracciones 13 – 16 (20 gotas por fracción, con un peso individual en torno a 1,2 g a 1,3 g) que contenían el ATH eluido a partir de la columna Sephadex® G-200 con NaCl 1 M se agruparon y liofilizaron. El material liofilizado se volvió entonces a suspender en 0,5 ml de agua y se dializó en una solución de NaCl 0,15 M. Después se comprobó la inhibición de la actividad de la trombina en el ATH resuspendido. Se llevaron a cabo 3 reacciones, utilizando: una solución tampón (acetato sódico 0,036 M, barbital sódico 0,036 M NaCl 0,145 M pH 7.4), el ATH resuspendido, una solución de AT a 13,87 micrograms/ml de NaCl 0,15 M, una solución de heparina (similar a la utilizada para producir el ATH) a 10 micrograms/ml de NaCl 0,15 M, una solución de S-2238 a 3,125 mg/ml H₂O, y una solución de II_a bovina (trombina) a 10 U II_a/ml NaCl 0,15 M.

Reacción 1: 114 microlitros de solución tampón, 5.83 microlitros de II_a.

Reacción 2: 104.5 microlitros de solución tampón, 9.6 microlitros de ATH resuspendido, 5.83 microlitros de II_a.

Reacción 3: 55,0 microlitros de solución tampón, 32.9 microlitros de solución de AT, 26,3 microlitros de solución de heparina, 5.83 microlitros de II_a.

Se añadieron los ingredientes en el orden mostrado para cada una de las reacciones anteriores en un tubo plástico, mezclando después de cada adición. Tras 10 minutos de incubación a 23° C, se tomó una fracción alícuota de 100 microlitros de la reacción y se mezcló en una solución que contenía 25 microlitros de S-2238 más 875 microlitros de solución tampón en una cubeta cuando se puso en marcha el cronómetro. Se tomaron lecturas de absorbancia frente a H₂O a 405 nm cada 10 segundos. Los resultados de las reacciones se muestran en la figura 4. Los resultados demuestran que, al contrario que en el caso de mezcla de AT más heparina, el ATH resuspendido no fue capaz de inhibir la trombina. No se produjo una reducción significativa en la actividad de la trombina cuando el ATH resuspendido se mezcló con la trombina, en comparación con la trombina por sí sola (mostrado como cuadrados abiertos en la figura 4).

El mismo ATH resuspendido también se sometió a prueba combinando el ATH resuspendido con trombina y plasma humano. Un volumen de solución reguladora, ATH y/o una muestra de la fracción de heparina (similar a la utilizada para producir el ATH), y un volumen de II_a bovino (trombina) se mezclaron en un tubo vidrio de borosilicato de 6 mm por

50 mm a 37° C. Al cabo de 1 minuto, se añadió un volumen de plasma humano (calentado a 23° C inmediatamente antes de su utilización) mezclándolo al ponerse en marcha el cronómetro. Se registró el momento de la primera aparición de un coágulo en el extremo del alambre utilizado como agitador. Para cada reacción, el volumen de II_a bovino fue de 10 microlitros de 15 U de II_a/ml de NaCl 0,15 M y el volumen de plasma humano fue de 100 microlitros. Los volúmenes del resto de componentes y los tiempos de coagulación se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Reacción Nº	buffer (microlitros)	ATH (microlitros)	1/10 disolución de NaCl 0,15 M de ATH (microlitros)	Fracción de heparina a 10 microgramos/ml de NaCl 0,15 M (microlitros)	Fracción de heparina a 0,1 microgramos/ml de NaCl 0,15 M (microlitros)	Tiempo de coagulación (segundos)
1	90	0	0	0	0	22,0, 21,8, 22,6
2	63,7	0	0	26,3	0	>120
3	82	8	0	0	0	>120
4	87,4	0	0	2,6	0	>120
5	63,7	0	0	0	26,3	23,0
6	89	0	0	1	0	29,2, 29,4
7	89	1	0	0	0	>120
8	86,2	0	3,8	0	0	28,8, 28,6

10

Estos datos confirman que, aunque el ATH resuspendido no mostró por sí mismo actividad de inhibición de la trombina, las cadenas de heparina del ATH resuspendido pudieron catalizar la inhibición de la trombina a través del AT exógeno encontrado en el plasma humano. Los tiempos de coagulación de las reacciones que incluían el ATH aumentaron enormemente hasta los 120 segundos. Por lo tanto, había claramente una cantidad suficiente de ATH presente para inhibir la trombina, pero el ATH no mostró ninguna actividad de inhibición de la trombina por sí misma. Esto datos sugieren que la actividad del ATH se destruyó liofilizando el ATH en una solución salina (de alta concentración).

20

Ejemplo 7: Reciclado de la AT

El ATH se sintetizó conjugando la AT y la heparina sin fraccionar. El rendimiento de esta preparación fue del 35,28%, definido como porcentaje de la AT inicial que se recuperó como ATH. Esto dejó $100 - 35,28 = 64,72\%$ de la AT original no incorporada al complejo. Tras la conjugación se separó el resto de AT no conjugada. Esa AT no conjugada se utilizó a continuación en una síntesis adicional en la cual la AT reciclada se hizo reaccionar con heparina adicional para obtener el ATH. De la AT reciclada, un 58,59% se convirtió en ATH. Por lo tanto, del 64,72% de AT que no se incorporó al complejo en la primera preparación de ATH, un 58,59% adicional se convirtió en ATH en la segunda síntesis de ATH. De este modo, se obtuvo como ATH un $64,72 \times 58,59/100 = 37,92\%$ adicional de la AT original utilizada en la primera preparación de ATH reciclando la AT no enlazada en una segunda síntesis de ATH. Por último, al combinar los resultados de las 2 preparaciones de ATH, el rendimiento total de ATH en términos de la AT original al inicio de la primera síntesis fue de $35,28 + 37,92 = 73,20\%$. Este rendimiento total del ATH es muy superior al rendimiento máximo del 60% que puede obtenerse mediante una única síntesis de ATH. Además, puede verse fácilmente que la AT no conjugada recuperada de la síntesis del ATH con la AT reciclada podría utilizarse de nuevo para una tercera síntesis de ATH para elevar aún más el rendimiento del conjugado en términos de la AT original.

Debe entenderse que las preparaciones indicadas anteriormente tratan de ilustrar la aplicación de los principios de la presente invención. De este modo, aunque la presente invención se ha descrito anteriormente en relación con los ejemplos de realización, será evidente para cualquier experto en la materia que puede introducirse numerosas modificaciones y efectuarse configuraciones alternativas sin apartarse de los principios y conceptos de la invención, tal y como se recogen en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Composición para la prevención de la trombogénesis, que comprende: antitrombina y heparina, donde al menos un 50% en peso de la heparina está conjugada con antitrombina, y donde al menos un 98% en peso de la heparina de la composición, ya como heparina o en la heparina-antitrombina conjugada tiene un peso molecular superior a 3.000 Daltons.
2. Composición de la reivindicación 1, donde el peso molecular es superior a 5.000 Daltons.
3. Composición según la reivindicación 1, donde la heparina incluye cadenas que contienen 18 monosacáridos o más.
4. Composición según la reivindicación 1, donde la heparina de la composición tiene un peso molecular inferior a 30.000 Daltons.
5. Composición según la reivindicación 1, donde la heparina de la composición tiene un peso molecular inferior a 20.000 Daltons.
6. Composición según la reivindicación 1, donde la composición incluye además un agente de enlace y la heparina está conjugada con la antitrombina mediante el agente de enlace.
7. Composición según la reivindicación 1, donde la heparina de la composición tiene un peso molecular superior a 3.000 Daltons e inferior a 30.000 Daltons.
8. Procedimiento de fabricación de una composición de acuerdo al menos una de las reivindicaciones precedentes que comprende:
la conjugación de antitrombina con heparina en una solución, donde la solución incluye:
i) agua, la antitrombina y la heparina,
ii) agua, alanina en una concentración de 0,01 a 0,09 molar, la antitrombina y la heparina, o
iii) agua, manitol, y la antitrombina y la heparina;
y donde al menos el 50% en peso del contenido de heparina es conjugada con la antitrombina y donde al menos una parte de la heparina con peso molecular menor de 3.000 Daltons es eliminada previamente a la etapa de conjugación de modo que al menos el 98% en peso de la heparina de la composición, ya sea como heparina o antitrombina-heparina conjugada, tiene un peso molecular mayor de 3.000 Daltons; y

la liofilización de la solución para obtener un conjugado de antitrombina-heparina liofilizado donde la conjugación y la liofilización suceden fuera de un cuerpo de un sujeto.

5 9. Procedimiento según la reivindicación 8, donde la porción de la heparina se elimina mediante un proceso seleccionado entre diálisis, diafiltrado, filtrado con gel, electroforesis, y combinaciones de los mismos.

10 10. Procedimiento de la reivindicación 8 que comprende además la reconstitución del conjugado antitrombina-heparina liofilizado con un disolvente para formar una solución acuosa de conjugado de antitrombina-heparina, donde el conjugado de antitrombina-heparina se encuentra presente en una concentración de 9-11 mg/ml con respecto a la totalidad del volumen de la solución acuosa.

15 11. Procedimiento de la reivindicación 8 que tiene un rendimiento de, al menos, un 60% en peso del conjugado de antitrombina-heparina, basándose en la concentración inicial de antitrombina utilizada para la preparación del conjugado de antitrombina-heparina en el que dicho rendimiento de al menos un 60%, se consigue, al menos parcialmente, mediante reciclado de la antitrombina no conjugada y haciendo reaccionar dicha antitrombina no conjugada con heparina adicional.

20

12. Procedimiento según la reivindicación 8 donde la solución es la solución i) y donde el procedimiento comprende adicionalmente la introducción de un catalizador en transposición de Amadori, en la solución i) y el calentamiento de la solución.

25 13. Procedimiento según la reivindicación 12, donde el catalizador se selecciona entre los integrantes del grupo formado por la 2-hidroxipiridina, sales de amina terciarias, malonato de etilo, fenilacetona, ácido acético, y combinaciones de dichos productos.

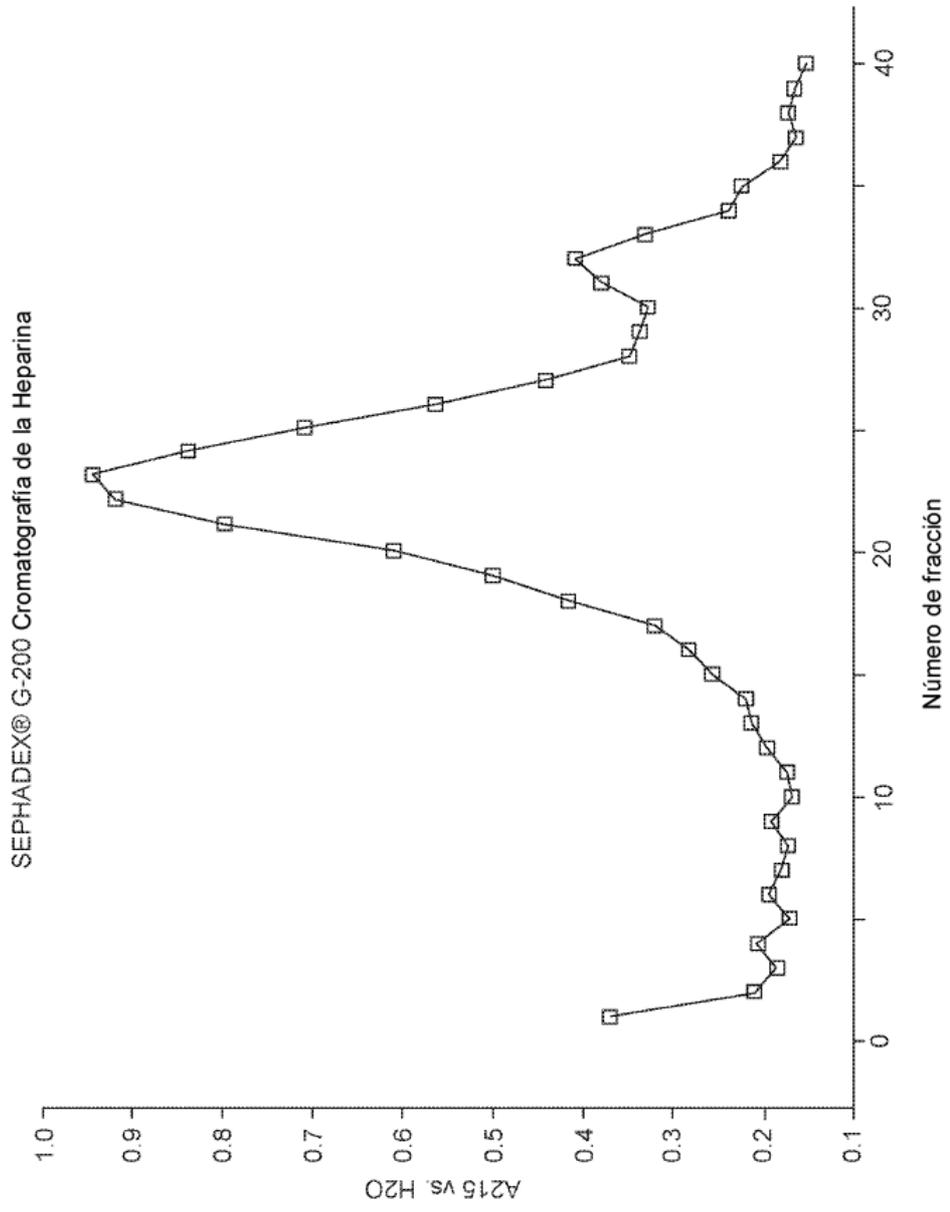


FIG. 1

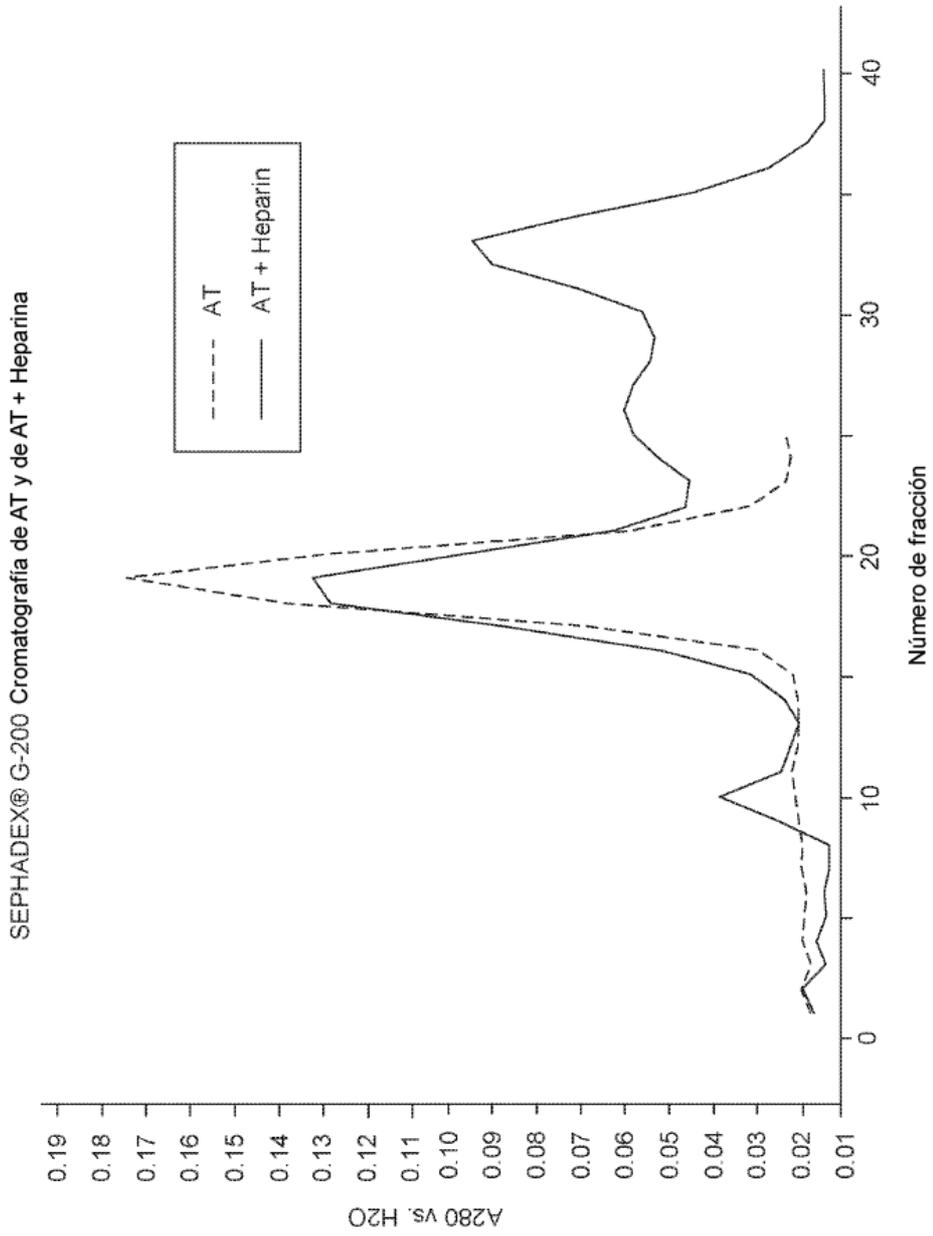


FIG. 2

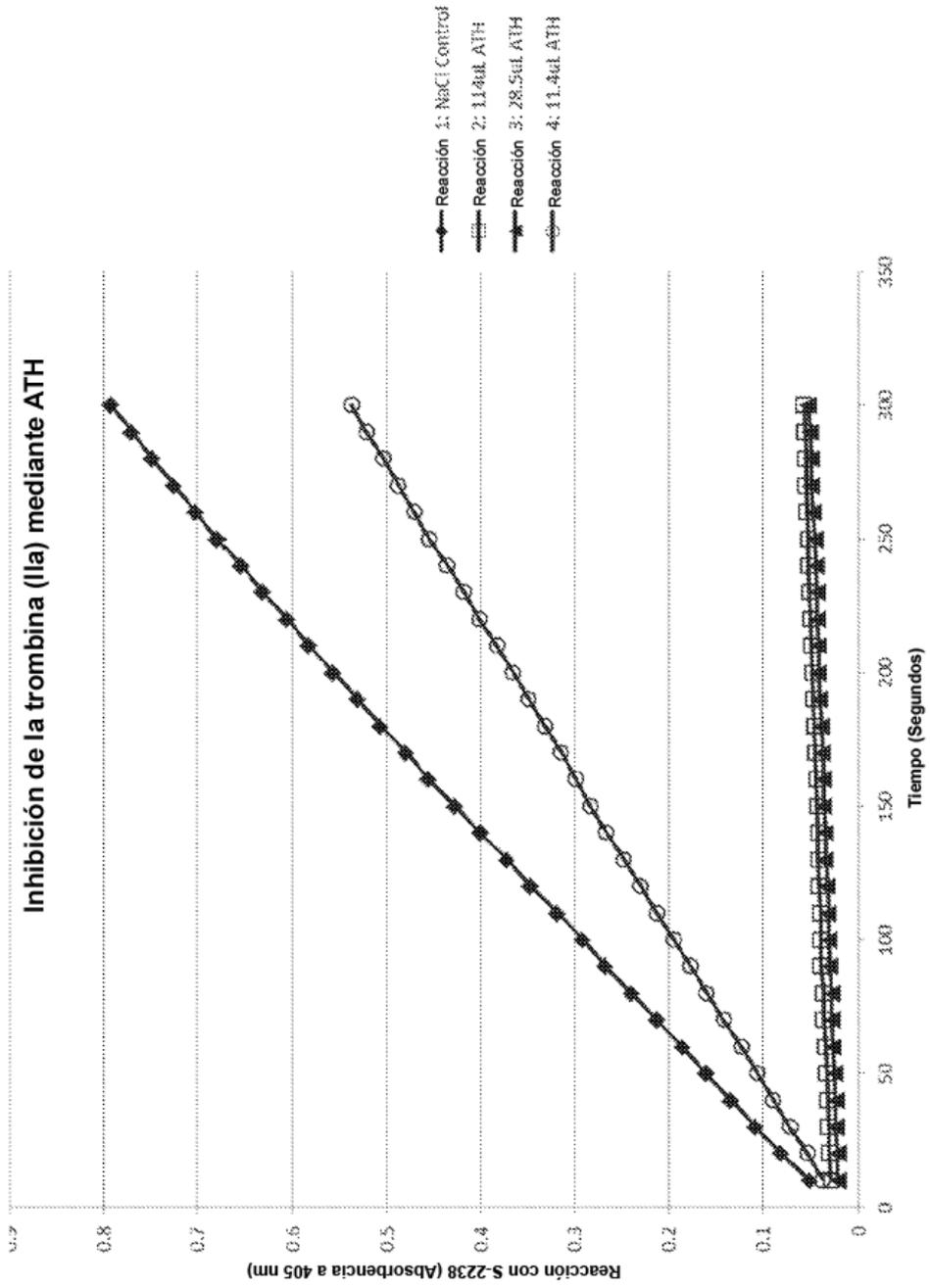


FIG. 3

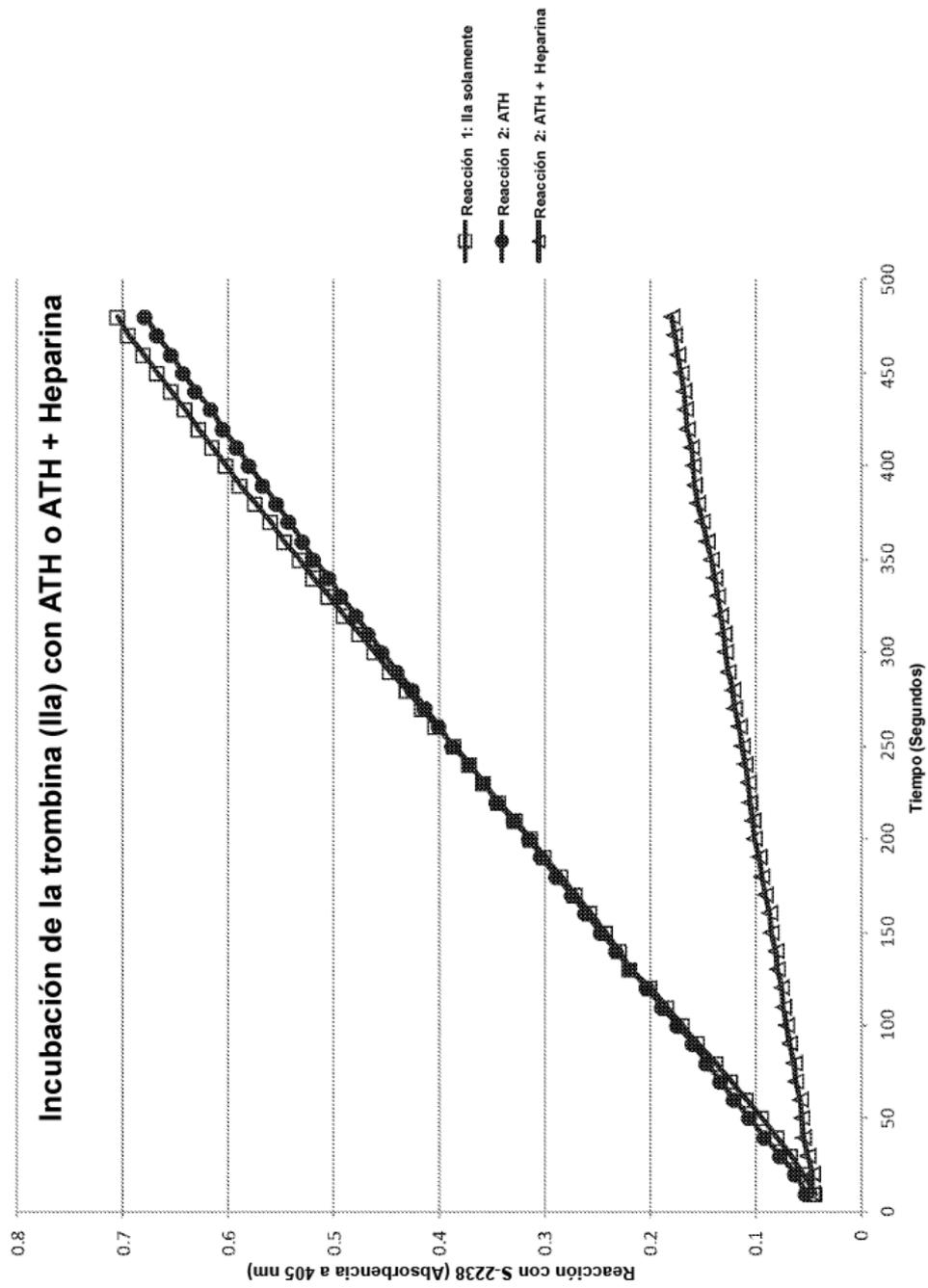


FIG. 4