

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 857**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/70** (2006.01)  
**A61K 31/715** (2006.01)  
**A61K 31/737** (2006.01)  
**A61K 31/7016** (2006.01)  
**A61K 31/724** (2006.01)  
**A61P 7/00** (2006.01)  
**A61K 31/702** (2006.01)  
**A61K 31/727** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2011 PCT/AU2011/001550**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12071611**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2011 E 11845528 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2646037**

54 Título: **Uso de polianiones para inhibir la actividad citotóxica de las histonas en el tratamiento de la sepsis**

30 Prioridad:

**01.12.2010 US 418826 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.04.2019**

73 Titular/es:

**THE AUSTRALIAN NATIONAL UNIVERSITY  
(100.0%)  
X-005 Childers St. Lv6  
Acton, ACT 2601, AU**

72 Inventor/es:

**STEPHENS, ROSS, WENTWORTH;  
PARISH, CHRISTOPHER, RICHARD;  
FREEMAN, CRAIG, GEOFFREY y  
SENDEN, TIMOTHY, JOHN**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 710 857 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de polianiones para inhibir la actividad citotóxica de las histonas en el tratamiento de la sepsis

### 5 Campo técnico

La invención se refiere a un polianión para su uso en un método para tratar la sepsis mediante la inhibición de la actividad citotóxica de las histonas extracelulares.

### 10 Antecedentes

La sepsis es una respuesta inflamatoria sistémica a una infección o traumatismo asociada con y mediada por la activación de varios mecanismos de defensa del huésped, incluida la red de citocinas, los leucocitos y los sistemas de complemento y coagulación/fibrinólisis. La sepsis puede ser causada por infecciones bacterianas, fúngicas, 15 virales y otras, así como por estímulos no infecciosos, tales como traumatismos múltiples, quemaduras graves y trasplante de órganos. En cuestión de horas o días, la sepsis puede progresar a coagulación espontánea en los vasos sanguíneos, hipotensión grave, insuficiencia orgánica múltiple y muerte.

A pesar del uso clínico de los antibióticos modernos, sigue existiendo un nivel significativo de mortalidad debido al 20 tratamiento ineficaz de los pacientes con sepsis. Los pacientes que están inmunocomprometidos debido, por ejemplo, a la profilaxis contra el rechazo del injerto también tienen un riesgo mayor. La mayoría de los pacientes con leucemia mueren por sepsis antes que por leucemia. Se estima que hay 500 000 episodios de sepsis al año en Estados Unidos, con una tasa de mortalidad bruta del 35%, y 200 000 episodios de choque séptico con una tasa de mortalidad del 40-70%. La sepsis es la principal causa de muerte en las unidades de cuidados intensivos no 25 coronarias. El 40% de las muertes hospitalarias después de una lesión se deben a un síndrome de disfunción orgánica múltiple causado por sepsis.

Se han realizado varios intentos en tiempos recientes para encontrar una nueva terapia eficaz para pacientes con sepsis. Se ha realizado un esfuerzo considerable para producir anticuerpos monoclonales contra mediadores clave 30 de la inflamación, por ejemplo, anticuerpos monoclonales del factor de necrosis antitumoral, pero estos han demostrado ser clínicamente ineficaces y también se ha encontrado que tienen efectos secundarios peligrosos en pacientes con sepsis. Otro enfoque ha sido utilizar factores de coagulación humanos purificados, tal como proteína C activada (APC) que incluye APC humana recombinante (por ejemplo, Xigris®). Sin embargo, estas terapias de sepsis basadas en APC han tenido poco impacto clínico. Hay varias razones para esto que incluyen la actividad 35 anticoagulante de la APC, que conduce a un mayor riesgo de hemorragia, por lo que el fármaco se excluye para la sepsis que se desarrolla en pacientes después de una cirugía o después de un traumatismo. Por la misma razón, la terapia para sepsis basada en APC queda excluida para los pacientes con leucemia, que tienen un alto riesgo de hemorragia. La sepsis puede avanzar rápidamente y el modo de acción relativamente lento de la terapia para la sepsis basada en APC es una desventaja en relación con la rápida progresión de la sepsis aguda. Xigris se retiró del 40 mercado el 25 de octubre de 2011.

Las histonas son pequeñas proteínas básicas que funcionan en el núcleo celular para regular la expresión génica y forman complejo con el ADN para formar nucleosomas que se ensamblan en la estructura de la cromatina. Xu et al, 45 (Nat Med. 2009. 15:1318-21) han notificado una actividad citotóxica para las histonas liberadas en respuesta a procesos inflamatorios con las histonas extracelulares que actúan como mediadores de la disfunción de las células endoteliales, la insuficiencia orgánica y la muerte en la sepsis.

Wall et al., Thrombosis Research, 2001, vol. 301, páginas 325-335 describen el estudio de 17 oligosacáridos sulfatados para la actividad anticoagulante utilizando la prueba de tiempo de tromboplastina parcial activada. 50

El documento de patente WO2009/061918 describe histonas extracelulares como biomarcadores para el pronóstico y dianas moleculares para la terapia.

El documento de patente WO2006/015171 describe el uso de glucosaminoglucanos tales como heparina de bajo 55 peso molecular, en la prevención y el tratamiento de la sepsis.

El documento de patente WO2007/013123 describe el uso de ciclodextrinas para la preparación de un medicamento para la prevención del síndrome séptico y un método para eliminar endotoxinas bacterianas (lipopolisacáridos) de la sangre.

El documento de patente US2005/0282775 describe un método y un medicamento para tratar la inflamación en un paciente con un polisacárido sulfatado sin inducir la activación de plaquetas o trombosis en presencia de anticuerpos contra el complejo del factor 4 de heparina y plaquetas.

5

El documento de patente WO03/106503 describe polisacáridos bacterianos O-sulfatados y su uso como agentes antiinflamatorios en inflamaciones crónicas y agudas. La presente invención se basa en el descubrimiento de que los polianiones pueden formar complejos con histonas extracelulares en la circulación de un animal vivo e inhibir su actividad citotóxica. Además, los polianiones pueden formar complejos con histonas extracelulares y prevenir la acumulación de histonas en los órganos. Además, estos polianiones tienen propiedades anticoagulantes insignificantes.

10

### Resumen

15 La invención se define en las reivindicaciones y se basa en el hecho de que los presentes inventores han identificado que la actividad citotóxica de las histonas extracelulares y la acumulación de histonas extracelulares en un órgano puede inhibirse mediante la administración de un polianión de oligosacárido. La administración de un polianión de oligosacárido ofrece un medio para mejorar al menos algunas de las deficiencias de los tratamientos para la sepsis, actualmente disponibles. Además, como se describe en el presente documento únicamente a modo de ejemplo, el uso de una histona marcada con nanopartículas proporciona un medio para cribar compuestos capaces de inhibir la acumulación de histonas en los órganos.

20

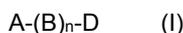
Por lo tanto, en un primer aspecto se proporciona un polianión para su uso en un método para tratar la sepsis mediante la inhibición de la actividad citotóxica de las histonas extracelulares en un sujeto,

25

en el que el polianión no tiene una actividad anticoagulante sustancial, de modo que el polianión aumenta el tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial (PTT), el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), el tiempo de coagulación de la trombina (TCT), o el tiempo de coagulación activada (ACT) en un 0% a un 10% del intervalo normal; y

en el que el polianión es un oligosacárido polianiónico que tiene la estructura general (I):

30



en la que A y B son cada uno independientemente un monosacárido cíclico o un monosacárido desoxi cíclico;

35

D es un monosacárido cíclico, un monosacárido desoxi cíclico, un monosacárido de anillo abierto, o un alcohol de azúcar;

n es un número entero seleccionado de 0, 1 y 2; y

en la que cada uno del monosacárido cíclico, el monosacárido desoxi cíclico, el monosacárido de anillo abierto, o el alcohol de azúcar está independientemente sustituido opcionalmente con  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $OPO_3^-$ , un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, o un aralquilo opcionalmente sustituido; y

40

en la que el oligosacárido polianiónico incluye al menos dos sustituyentes aniónicos seleccionados del grupo que consiste en  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$  y  $OPO_3^-$ .

45 En una forma de realización, el monosacárido cíclico se selecciona del grupo que consiste en glucosa, galactosa, fructosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, manosa, gulosa, idosa, talosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, sorbosa, tagatosa y sedoheptulosa.

En otra forma de realización, el monosacárido cíclico se selecciona del grupo que consiste en glucosa, galactosa y fructosa.

50

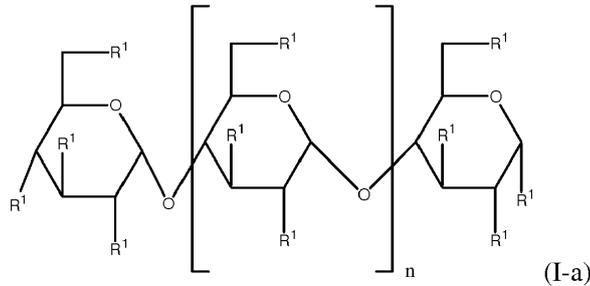
En otra forma de realización, el monosacárido desoxi cíclico se selecciona del grupo que consiste en fucosa, desoxirribosa y ramnosa.

55 En otra forma de realización, el alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en glicol, glicerol, eritritol, treitol, ribitol, arabitol, xilitol, sorbitol (glucitol), manitol, dulcitol (galactitol), iditol y fucitol.

En otra forma de realización, el monosacárido de anillo abierto se selecciona del grupo que consiste en glucosa, galactosa, fructosa, eritrosa, treosa, eritrolulosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, manosa, gulosa,

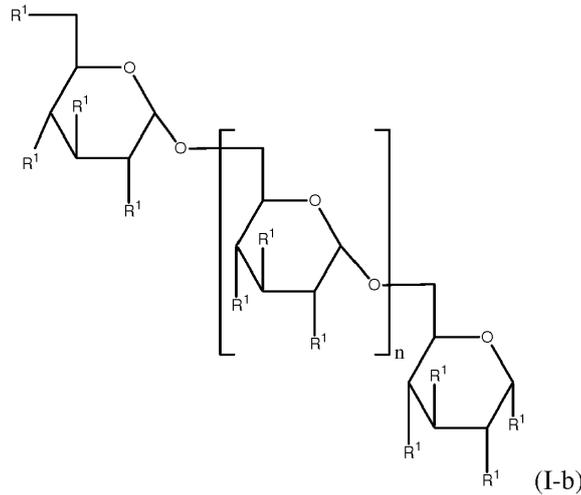
idoso, talosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, sorbosa, tagatosa y sedoheptulosa.

En otra forma de realización, el polianión puede ser un oligosacárido polianiónico que tiene la estructura general (I-a):



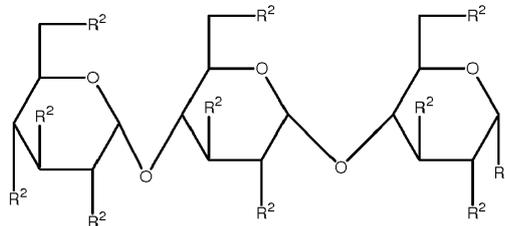
5 en la que cada R<sup>1</sup> se selecciona independientemente de OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, COO<sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OH o H; y n es un número entero entre 0, 1 y 2; y en la que al menos dos de R<sup>1</sup> se seleccionan del grupo que consiste en OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, COO<sup>-</sup>, y OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

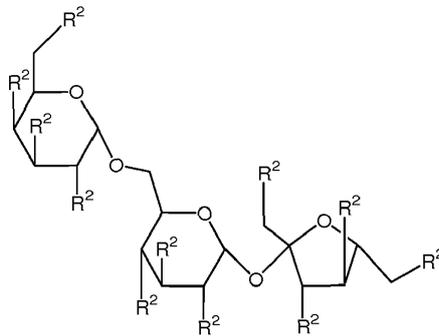
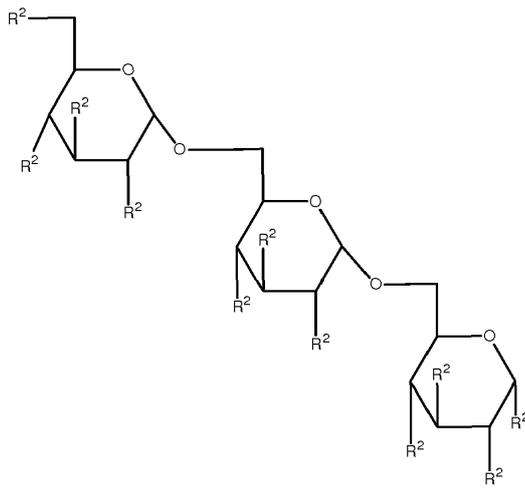
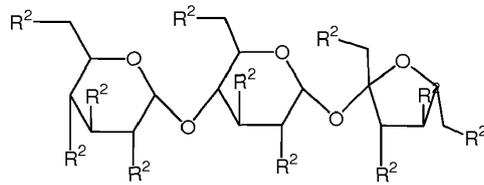
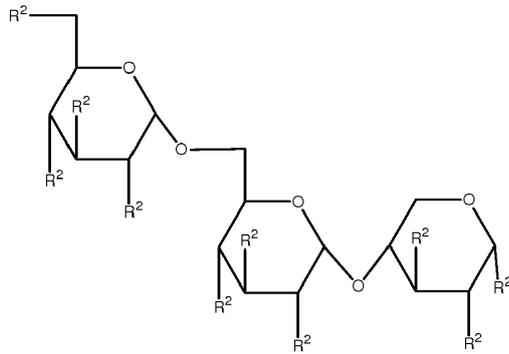
10 En otra forma de realización, el polianión puede ser un oligosacárido polianiónico que tiene la estructura general (I-b):

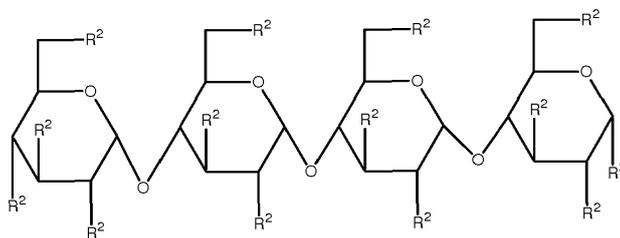


donde cada R<sup>1</sup> se selecciona independientemente de OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, COO<sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OH o H; y n es un número entero entre 0, 1 y 2; y en la que al menos dos de R<sup>1</sup> se seleccionan del grupo que consiste en OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, COO<sup>-</sup>, y OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

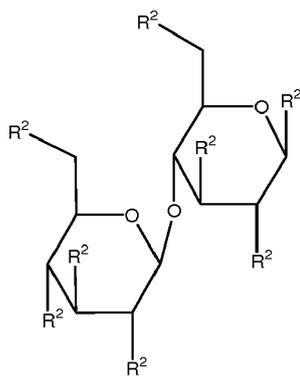
15 En otra forma de realización, el polianión puede ser un oligosacárido polianiónico seleccionado del grupo que consiste en:







y



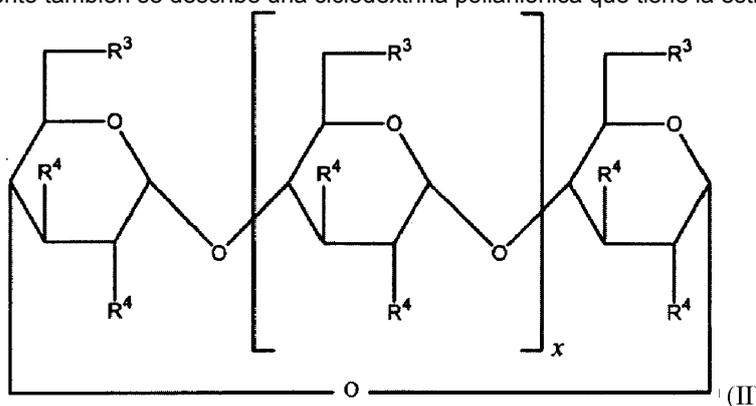
en los que cada  $R^2$  se selecciona independientemente de  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $OPO_3^-$ , OH o H; y en los que al menos dos de  $R^2$  se seleccionan del grupo que consiste en  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ , y  $OPO_3^-$ .

En otra forma de realización, el polianión puede ser un oligosacárido polianiónico seleccionado del grupo que consiste en sulfato de maltosa, sulfato de maltotriosa, sulfato de maltotetraosa, sulfato de panosa, sulfato de isomaltotriosa, sulfato de erlosa, sulfato de celobiosa y sulfato de rafinosa.

10

En una forma de realización adicional, el polianión puede ser el oligosacárido polianiónico sulfato de celobiosa.

En el presente documento también se describe una ciclodextrina polianiónica que tiene la estructura general (II):



15 donde cada  $R^3$  se selecciona independientemente de un grupo O-alquilo, O-arilo, O-aralquilo, O-alqueniilo, O-alquiniilo opcionalmente sustituido,  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $OPO_3^-$ , OH o H y cada  $R^4$  se selecciona independientemente de  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $OPO_3^-$ , OH o H; x es un número entero entre 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10, y en la que la ciclodextrina polianiónica incluye al menos dos sustituyentes aniónicos seleccionados del grupo que consiste en  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$  y  $OPO_3^-$ .

20

La ciclodextrina puede ser  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina o  $\gamma$ -ciclodextrina.

En el presente documento también se describe un método para cribar un inhibidor de histonas, comprendiendo dicho método:

25

- (i) poner en contacto una histona con un compuesto candidato
- (ii) determinar la unión de dicho compuesto candidato a dicha histona
- (iii) seleccionar dicho compuesto candidato que se une a dicha histona.

5 En el presente documento se describe adicionalmente un método para cribar un inhibidor de histonas, comprendiendo dicho método:

- (i) proporcionar una histona marcada con nanopartículas
- (ii) administrar dicha histona marcada a un sujeto de ensayo
- 10 (iii) administrar un compuesto candidato a dicho sujeto de ensayo
- (iv) controlar de la localización de histonas en un órgano en relación con un sujeto de control
- (v) seleccionar dicho compuesto candidato que altera la localización de histonas en un órgano en relación con un sujeto de control.

15 En un aspecto, la histona marcada puede administrarse al sujeto de ensayo antes, después o al mismo tiempo que el compuesto de ensayo.

En el presente documento también se describe un método adicional de cribado de un inhibidor de histonas, comprendiendo dicho método:

- 20 (i) proporcionar una histona marcada con nanopartículas
- (ii) poner en contacto dicha histona marcada con nanopartículas con un compuesto candidato
- (iii) administrar dicha histona marcada y dicho compuesto de ensayo a un sujeto de ensayo
- 25 (iv) controlar la localización de histonas en un órgano de dicho sujeto de ensayo en relación con un sujeto de control.
- (v) seleccionar dicho compuesto candidato que altera la localización de histonas en un órgano en relación con un sujeto de control.

En un aspecto el compuesto candidato es un polianión.

30 De acuerdo con la invención, o uno cualquiera de los aspectos anteriores, el polianión puede inhibir la unión de una histona a una célula, tejido u órgano.

#### Breve descripción de los dibujos

35 Una forma de realización preferida de la presente invención se describirá ahora, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

40 La **Figura 1** representa un ejemplo de los datos generados utilizando el ensayo de citometría de flujo para la citotoxicidad de histonas, en este caso, las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se incubaron solas (panel izquierdo) o con 200 µg/ml de histonas de timo de ternero (panel derecho) durante 1 hora *in vitro*. Las cifras en cada panel representan el porcentaje de HUVEC en cada cuadrante, indicándose cuadrantes de células viables (Calceína-AM-brillante, PI-apagado) y muertas (Calceína-AM-apagado, PI-brillante).

45 La **Figura 2** representa la capacidad de diferentes concentraciones de histonas de timo de ternera (100-800 µg/ml) para causar la muerte de (A) HUVEC y (B) células endoteliales microvasculares humanas (HMEC) después de 1 h de exposición *in vitro*.

50 La **Figura 3** representa la capacidad de diferentes concentraciones (6,25-100 µg/ml) de sulfato de maltosa, sulfato de maltotriosa, sulfato de maltopentosa, sulfato de isomaltotriosa y sulfato de β-ciclodextrina para inhibir la citotoxicidad *in vitro* de las histonas de timo de ternera (200 µg/ml) para HUVEC.

La **Figura 4** representa la capacidad de un intervalo de concentración más amplio (1,6-100 µg/ml) de sulfato de maltosa, sulfato de maltotriosa y sulfato de maltopentosa para inhibir la citotoxicidad *in vitro* de las histonas de timo de ternera (200 µg/ml) para HUVEC.

55 La **Figura 5** muestra los datos primarios de citometría de flujo que muestran que sulfato de maltotriosa a 25 µg/ml y 100 µg/ml puede inhibir drásticamente los efectos citotóxicos *in vitro* de las histonas de timo de ternera (200 µg/ml) para HUVEC. Las cifras en cada panel representan el porcentaje de HUVEC en cada cuadrante, indicándose cuadrantes de células viables (Calceína-AM-brillante, PI-apagado) y muertas (Calceína-AM-apagado, PI-brillante).

La **Figura 6** muestra los datos primarios de citometría de flujo que muestran que sulfato de maltotriosa a 25

µg/ml y 100 µg/ml puede inhibir total y parcialmente, respectivamente, los efectos citotóxicos *in vitro* de las histonas de timo de ternera (400 µg/ml) para HMEC. Las cifras en cada panel representan el porcentaje de HMEC en cada cuadrante, indicándose cuadrantes de células viables (Calceína-AM-brillante, PI-apagado) y muertas (Calceína-AM-apagado, PI-brillante).

5 La **Figura 7** demuestra que la eliminación de heparán sulfato de la superficie celular de HMEC con heparanasa plaquetaria humana o Flavobacterium heparinasa no tiene ningún efecto sobre la citotoxicidad *in vitro* de las histonas de timo de ternera (400 µg/ml) para HMEC.

La **Figura 8** demuestra que la línea celular CHO-K1 de tipo silvestre, que expresa heparán sulfato de superficie celular, y la línea celular CHO mutante (pgsA-745) que carece de heparán sulfato, son igualmente susceptibles a la citotoxicidad *in vitro* de las histonas de timo de ternera.

10 La **Figura 9A** es una serie de adquisiciones de 30 segundos de gammagrafía, comenzando desde el inicio de la inyección de histonas marcadas con nanopartículas de Tc99m en la vena de la oreja de un conejo anestesiado.

La **Figura 9B** es una serie de adquisiciones de 30 segundos de gammagrafía, comenzando desde el inicio de la inyección de nanopartículas de Tc99m en la vena de la oreja de un conejo anestesiado.

15 La **Figura 10A** es una serie de adquisiciones de 30 segundos de gammagrafía, comenzando desde el inicio de la inyección de histonas marcadas con nanopartículas de Tc99m en la vena de la oreja de un conejo anestesiado.

La **Figura 10B** es una serie de adquisiciones de 30 segundos de gammagrafía, comenzando desde el inicio de la inyección de histonas marcadas con nanopartículas de Tc99m en la vena de la oreja de un conejo anestesiado tratado previamente con 15 mg/kg de maltohexaosa sulfato sódico.

20 La **Figura 11** es una serie de adquisiciones de 30 segundos (tramas 1-4) y adquisiciones de 60 segundos (tramas 5-8) de gammagrafía, comenzando desde el inicio de la inyección de histonas marcadas con nanopartículas de Tc99m en la vena de la oreja de un conejo anestesiado tratado previamente con 15 mg/kg de maltotetraosa sulfato sódico.

La **Figura 12** es una serie de adquisiciones de 30 segundos de gammagrafía, comenzando desde el inicio de la inyección de histonas marcadas con nanopartículas de Tc99m en la vena de la oreja de un conejo anestesiado tratado previamente con 15 mg/kg de celobiosa sulfato sódico.

30 La **Figura 13** es una gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier para un modelo de sepsis de ratón inducido por lipopolisacárido (LPS) y evaluación de la eficacia *in vivo* de los artículos de ensayo 1 (sulfato de maltotriosa; TA1), 2 (sulfato de celobiosa; TA2) y 3 (heparina; TA3). Los artículos de ensayo se administraron conjuntamente i.p. el día 1 con LPS (50 mg/kg), y luego se dosificaron a diario i.p. durante 2 días más. Los artículos de ensayo 1 y 2 se evaluaron a 2 concentraciones de dosis (dosis alta, 100 mg/kg, y dosis baja, 15 mg/kg), y el artículo de ensayo 3 en una dosis (1,1 mg/kg). Los eventos marcados en el gráfico registran los tiempos hasta que los ratones fueron encontrados muertos o tuvieron que ser sacrificados.

## Definiciones

40 Se usan ciertos términos en el presente documento que tendrán los significados expuestos como se indica a continuación.

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" significa "incluyendo principalmente, pero no necesariamente únicamente". Además, las variaciones de la palabra "que comprende", tales como "comprender" y "comprende", tienen significados correspondientemente variados.

A menos que el contexto requiera otra cosa o específicamente se establezca lo contrario, los enteros, etapas o elementos de la invención que se mencionan en el presente documento como enteros, etapas o elementos singulares incluyen claramente formas tanto singulares como plurales de los enteros, etapas o elementos citados.

50 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a cualquiera y todos los usos que remedian una afección o síntomas, impiden el establecimiento de una afección o enfermedad, o de otro modo previenen, dificultan, retrasan o invierten la progresión de una afección o enfermedad u otros síntomas no deseados de cualquier manera que sea.

55 Se debe tener en cuenta que la referencia en el presente documento a uso en aplicaciones terapéuticas se entenderá que es igualmente aplicable a aplicaciones humanas y no humanas, tales como veterinarias. Por lo tanto, se entenderá que, salvo que se indique lo contrario, una referencia a un paciente, sujeto o individuo significa un ser humano o no humano, tal como un individuo de cualquier especie de importancia social, económica o de

investigación, incluyendo, pero sin limitación, una especie aviar, lagomorfo, ovino, bovino, equino, porcino, felino, canino, primate y roedor.

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "cantidad eficaz" incluye dentro de su significado una cantidad suficiente pero no tóxica de un compuesto o composición de la invención para proporcionar el efecto deseado. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro dependiendo de factores tales como el efecto deseado, la especie que se está tratando, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección a tratar, el agente en particular que se está administrando, el modo de administración, etc. Por lo tanto, no es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, un experto en la técnica puede determinar una "cantidad eficaz" apropiada utilizando solo la experimentación rutinaria.

Como se usa en el presente documento, el término "monosacárido" incluye dentro de su significado un azúcar o carbohidrato de fórmula general  $C_nH_{2n}O_n$ . Por ejemplo, el término monosacárido incluye, pero sin limitación, glucosa, galactosa, fructosa, eritrosa, treosa, eritrosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, manosa, gulosa, idosa, talosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, sorbosa, tagatosa y sedoheptulosa. Los monosacáridos pueden ser tanto naturales como sintéticos. La mayoría de los monosacáridos existen como un monosacárido de anillo abierto o un monosacárido cíclico.

Como se usa en el presente documento, el término "monosacárido desoxi" o "azúcar desoxi" incluye dentro de su significado un azúcar que contiene menos átomos de oxígeno que átomos de carbono, dando como resultado uno o más carbonos en la molécula que carecen de un grupo hidroxilo unido. Por ejemplo, el término monosacárido desoxi incluye, pero sin limitación, fucosa, desoxirribosa y ramnosa.

Como se usa en el presente documento, el término "alcohol de azúcar" incluye en su significado una forma hidrogenada de carbohidrato o monosacárido, cuyo grupo carbonilo (aldehído o cetona) se ha reducido a un grupo hidroxilo primario o secundario (por lo tanto, el alcohol). Los alcoholes de azúcar tienen la fórmula general  $H(CH_2O)_nH$ . Por ejemplo, el término alcohol de azúcar incluye, pero sin limitación, glicol, glicerol, eritritol, treitol, ribitol, arabitol, xilitol, sorbitol (glucitol), manitol, dulcitol (galactitol), iditol y fucitol.

Como se usa en el presente documento, el término "oligosacárido" incluye dentro de su significado carbohidratos que están compuestos por dos a diez residuos de monosacáridos unidos a través de enlaces glucosídicos, que pueden hidrolizarse por ácido para dar las unidades constitutivas de monosacáridos.

Como se usa en el presente documento, el término "polisacárido" incluye dentro de su significado polímeros de monosacáridos que contienen diez o más residuos de monosacáridos unidos a través de enlaces glucosídicos, que pueden hidrolizarse por ácido para dar las unidades de monosacáridos constituyentes.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" incluye en su significado radicales hidrocarburo monovalentes de cadena lineal o cadena ramificada que tienen de 1 a 18 átomos de carbono, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 átomos de carbono. Por ejemplo, el término alquilo incluye, pero sin limitación, metilo, etilo, 1-propilo, isopropilo, 1-butilo, 2-butilo, isobutilo, terc-butilo, amilo, 1,2-dimetilpropilo, 1,1-dimetilpropilo, pentilo, isopentilo, hexilo, 4-metilpentilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 2-etilpentilo, 3-etilpentilo, heptilo, 1-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 4,4-dimetilpentilo, 1,2-dimetilpentilo, 1,3-dimetilpentilo, 1,4-dimetilpentilo, 1,2,3-trimetilbutilo, 1,1,2-trimetilbutilo, 1,1,3-trimetilbutilo, 5-metilheptilo, 1-metilheptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, triskaidecilo, tetradecilo, quindecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "alquileo" incluye dentro de su significado radicales hidrocarburo saturados, de cadena lineal, divalentes.

Como se usa en el presente documento, el término "arilo" incluye en su significado radicales hidrocarburo aromáticos monovalentes, sencillos, polinucleares, conjugados y fusionados, por ejemplo, fenilo, naftilo, antraceno, pirenilo, fenantraceno.

Como se usa en el presente documento, el término "arileno" incluye dentro de su significado radicales hidrocarburo aromáticos divalentes, sencillos, polinucleares, conjugados y fusionados.

Como se usa en el presente documento, el término "aralquilo" incluye en su significado un residuo alquilo inferior sustituido por uno o más grupos arilo o arilo sustituido, tales como, por ejemplo, bencilo, fenilmetilo, feniletilo,

fenilpropilo, fenilisopropilo, fenil-butilo terciario, y similares.

El término "alquenilo" se refiere a un radical hidrocarburo que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Un grupo alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> es un grupo alquenilo que tiene de dos a seis átomos de carbono en el esqueleto de alquenilo lineal o ramificado. Los ejemplos de radicales alquenilo incluyen, sin limitación, vinilo, propenilo, 2-butenilo y similares. Un grupo alquenilo puede estar sustituido con uno o restos como se describe para grupos alquilo.

El término "alquinilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical hidrocarburo que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Un grupo alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> es un grupo alquinilo que tiene de dos a seis átomos de carbono en el esqueleto de alquinilo lineal o ramificado. Los restos de alquinilo ejemplares incluyen propinilo, 3-hexinilo y similares. Un grupo alquinilo puede estar sustituido con uno o restos como se describe para grupos alquilo.

Como se usa en el presente documento, el término "opcionalmente sustituido" como se usa en el presente documento significa que el grupo al que se refiere este término puede estar sin sustituir, o puede estar sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, halo, haloalquilo, haloalquinilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, tioalcoxi, alqueniloxi, haloalcoxi, haloalqueniloxi, grupos que contienen nitrógeno tales como NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N(alquilo)<sub>2</sub>, NH(alquilo), nitroalquilo, nitroalquenilo, nitroalquinilo, nitroheterocicliilo, alquilamino, dialquilamino, alquenilamina y alquinilamino, acilo, alquenoilo, alquinoilo, acilamino, diacilamino, aciloxi, alquilsulfoniloxi, heterocicloxi, heterocicloamino, haloheterocicloalquilo, alquilsulfenilo, alquilcarboniloxi, alquiltio, aciltio, grupos que contienen fósforo tales como fosfona y fosfinilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, aralquilo, alquilheteroarilo, ciano, cianato, isocianato, grupos que contienen azufre tales como SO<sub>3</sub>H, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub>alquilo, SO<sub>3</sub>arilo, NHSO<sub>3</sub>H, y NHSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>2</sub>H, COO<sup>-</sup>, CO<sub>2</sub>alquilo, C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NH(alquilo), y -C(O)N(alquilo)<sub>2</sub>. Los sustituyentes preferidos incluyen alquilo C<sub>1-10</sub>, alcoxi C<sub>1-10</sub>, -CH<sub>2</sub>-alcoxi (C<sub>1-10</sub>), arilo C<sub>6-10</sub>, por ejemplo, fenilo, -CH<sub>2</sub>-fenilo, halo, hidroxilo, hidroxialquilo (C<sub>1-10</sub>), y halo-alquilo (C<sub>1-10</sub>), por ejemplo, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>. Los sustituyentes particularmente preferidos incluyen alquilo C<sub>1-10</sub>, alcoxi C<sub>1-10</sub>, halo, hidroxilo, hidroxialquilo (C<sub>1-10</sub>), por ejemplo, CH<sub>2</sub>OH, y halo-alquilo (C<sub>1-10</sub>), por ejemplo, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>.

Como se usa en el presente documento, el término "sepsis" incluye dentro de su significado todos los estadios de la enfermedad o afección como se caracteriza por textos de referencia médica estándar y/o se conoce por un experto en la técnica. Por ejemplo, la sepsis incluye la sepsis grave, sepsis aguda y crónica y choque séptico. La sepsis también incluye episodios de sepsis asociados con pacientes con quemaduras, regímenes terapéuticos para pacientes con cáncer, complicaciones perinatales en pacientes de maternidad, profilaxis inmunosupresora para los receptores de injertos, y pacientes quirúrgicos postoperatorios.

Como se usa en el presente documento, el término "nanopartícula" se refiere a cualquier partícula sólida de menos de 1 micrómetro (1000 nm) de diámetro. En particular, una nanopartícula puede ser una nanopartícula FibrinLite que consiste en plaquetas metálicas de radionúclido de tecnecio-99m encapsulado por una pluralidad de capas de carbono grafitico. El diámetro de las nanopartículas FibrinLite se distribuye log-normal en el intervalo de 20-400 nm con un diámetro medio de aproximadamente 200 nm.

### Descripción detallada

La invención se define en las reivindicaciones y se refiere a un polianión según se reivindica para su uso en un método para el tratamiento de pacientes que padecen sepsis debida a una infección. Los polianiones forman complejos rápidamente y, por lo tanto, neutralizan o inhiben la actividad citotóxica de las proteínas de histonas extracelulares, por ejemplo, las que se encuentran en la circulación sanguínea de los pacientes con sepsis. Además, los polianiones pueden formar complejos con las histonas extracelulares y prevenir la acumulación de histonas en los órganos, en particular en los pulmones. En formas de realización preferidas, los polianiones se seleccionan por su baja interferencia con la coagulación sanguínea y la hemostasia, y/o su capacidad para persistir en la circulación.

La presente invención, como se define en las reivindicaciones, se basa en el descubrimiento de que los polianiones de oligosacáridos que tienen propiedades anticoagulantes insignificantes pueden formar complejos con las histonas en la circulación de un animal vivo y evitar la unión de las histonas a los órganos. Estos polianiones proporcionan un nuevo medio de intervención terapéutica en la sepsis y ofrecen alternativas más atractivas al uso de anticuerpos neutralizantes, APC o heparina.

### Sepsis

- La sepsis es una reacción sistémica caracterizada por hipotensión arterial, acidosis metabólica, disminución de la resistencia vascular sistémica, taquipnea y disfunción orgánica. La sepsis (incluido el choque séptico) es una respuesta inflamatoria sistémica a una infección o traumatismo asociada con y mediada por la activación de varios mecanismos de defensa del huésped, incluida la red de citocinas, los leucocitos y los sistemas de complemento y coagulación/fibrinólisis. La coagulación intravascular diseminada (DIC) con deposición generalizada de fibrina en la microvasculatura de diversos órganos puede ser una manifestación temprana de sepsis. DIC es un mediador importante en el desarrollo del síndrome de insuficiencia orgánica múltiple y contribuye al mal pronóstico de los pacientes con choque séptico.
- 10 La sepsis puede desarrollarse a partir de organismos, sus productos metabólicos o toxinas en el torrente sanguíneo. Es decir, la sepsis incluye bacteriemia, fungemia, viremia y parasitemia. Por lo tanto, el choque séptico (fallo circulatorio agudo que es resultado de la sepsis a menudo asociado con un fallo orgánico múltiple y una alta tasa de mortalidad) puede ser causado por una serie de organismos o procesos patológicos. La sepsis también puede ser causada por estímulos no infecciosos, tales como traumatismos, quemaduras graves, torsión intestinal, embolia de líquido amniótico y trasplante de órganos.

- Muchos pacientes con sepsis presentan un rápido empeoramiento durante un periodo de 24-48 horas. Por lo tanto, el tratamiento rápido es esencial para el tratamiento eficaz de la sepsis. Desafortunadamente, el diagnóstico del tipo de infección requiere un análisis microbiológico para identificar el patógeno que puede tardar varios días. Por lo tanto, la terapia para eliminar un patógeno (por ejemplo, una terapia con antibióticos) debe iniciarse sin conocer el tipo y la especie del patógeno, y sin ningún medio para conocer el alcance de la infección.

- Se han realizado varios intentos para encontrar una nueva terapia eficaz para pacientes con sepsis, tales como anticuerpos monoclonales contra mediadores clave de la inflamación y proteína C activada (APC). Sin embargo, estos tratamientos han tenido poco impacto clínico y la APC se ha retirado recientemente del mercado. Se ha utilizado heparina de baja dosis en el tratamiento de pacientes con sepsis, aunque su uso en este contexto es complicado y controvertido debido al aumento reconocido del riesgo de sangrado en los pacientes con sepsis debido a los recuentos de plaquetas inferiores y/o factores de coagulación agotados, especialmente cuando la sepsis ha inducido la coagulación intravascular diseminada (DIC). El agotamiento de las plaquetas y/o los factores de coagulación debido a la baja dosis de heparina puede conducir entonces a una disfunción de la coagulación y puede producirse una hemorragia catastrófica. La heparina también puede inducir en algunos pacientes una afección conocida como trombocitopenia inducida por heparina (HIT), en la que la destrucción de plaquetas mediada por anticuerpos también puede conducir a una hemorragia peligrosa.

### 35 **Histonas**

- Las histonas son pequeñas proteínas básicas con un alto contenido de lisina o arginina y funcionan en el empaquetamiento del ADN. Las histonas están altamente conservadas y se pueden agrupar en cinco clases principales: H1/H5, H2A, H2B, H3, y H4 organizadas en dos superclases de las histonas centrales (H2A, H2B, H3 y H4) y las histonas enlazadoras (H1 y H5).

- Dos de cada histona central se ensamblan para formar partículas centrales de nucleosoma octaméricas envolviendo el ADN alrededor del complejo de proteínas. Las histonas enlazadoras se unen al nucleosoma y al ADN, donde entran y salen del nucleosoma, lo que bloquea el ADN en su lugar y facilita la formación de una estructura de orden superior.

- Como se describe en el presente documento, una histona puede ser una histona de longitud completa, un fragmento o variante de la misma. Una variante de histona puede modificarse, por ejemplo, mediante la eliminación, adición y/o sustitución de aminoácidos. Como alternativa, una histona puede modificarse por acetilación y/o metilación de lisina y arginina. En general, las modificaciones no comprometen sustancialmente la naturaleza policatiónica de la histona o la capacidad de la histona para localizarse en un órgano.

- Las sustituciones de aminoácidos adecuadas incluyen, pero no están necesariamente limitadas a, sustituciones de aminoácidos conocidas en la técnica como "conservativas". Una sustitución "conservativa" es aquella en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de tal manera que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la actividad biológica, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido estén sustancialmente inalteradas. Las sustituciones de aminoácidos se pueden hacer generalmente en base a la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido

glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina, histidina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservativos incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Una variante de histona también puede contener, o como alternativa, cambios de aminoácidos no conservativos.

Una variante de histona puede modificarse mediante la eliminación, adición y/o sustitución de uno o más aminoácidos, y puede diferir de la secuencia no modificada por la sustitución, eliminación o adición de cinco aminoácidos o menos, tal como, por ejemplo, cuatro o tres, o dos, o un aminoácido.

Como se usa en el presente documento, una "variante" de histona se refiere a una histona con una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de histona de origen natural. En general, dos secuencias son "sustancialmente similares" si las dos secuencias tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos que son iguales (porcentaje de "identidad de secuencia"). Por consiguiente, una "variante" de una secuencia de histonas puede compartir al menos aproximadamente el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 83%, 85%, 88%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencia con una secuencia de histona de referencia.

En general, las variantes de secuencias de histona poseen actividad biológica cualitativa en común. También se incluyen dentro del significado del término "variante" los homólogos de histonas. Un homólogo de histona es típicamente de una especie diferente pero que comparte sustancialmente la misma función o actividad biológica que la histona correspondiente de otra especie. Por ejemplo, los homólogos de las histonas incluyen, pero sin limitación, los de diferentes especies de mamíferos o microorganismos.

Además, el término "variante" también incluye análogos de secuencias de histona. Un "análogo" de histona es un polipéptido que es un derivado de una histona dada, cuyo derivado comprende la adición, delección, sustitución de uno o más aminoácidos, de manera que el polipéptido conserva sustancialmente la misma función. Como se ha apreciado anteriormente, el término "sustitución conservativa de aminoácidos" se refiere a una sustitución o reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades similares dentro de una secuencia de histona.

Una "variante" de una histona puede diferir en secuencia (de la histona relacionada) por sustitución, delección o adición de cinco aminoácidos o menos, tal como, por ejemplo, cuatro, o tres, o dos, o un aminoácido.

En el presente documento también se describen fragmentos de histonas. Un "fragmento" de histona es un polipéptido que es un constituyente de una histona o una variante de la misma. Típicamente, el fragmento posee una actividad biológica cualitativa en común con la histona de la que es un constituyente. Típicamente, el fragmento de histona puede tener una longitud mayor de 50 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 residuos de aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 45 residuos de aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 residuos de aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 35 residuos de aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 30 residuos de aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 25 residuos de aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 residuos de aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 residuos de aminoácidos de longitud, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 residuos de aminoácidos de longitud. Un fragmento de un polipéptido puede tener 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más de 25 residuos de aminoácidos de longitud.

### **Polianiones**

Los inventores proponen que, dado que las histonas son policationes con un alto punto isoeléctrico, formarán complejos con polianiones distintos al ADN, tales como polisacáridos polianiónicos sulfatados (por ejemplo, heparina), oligosacáridos y disacáridos polianiónicos, polianiones lineales, polianiones de ciclitol y polianiones de arileno urea.

En algunas formas de realización, el polianión puede formar complejo con y, por lo tanto, inhibir la actividad biológica de las histonas circulantes sin ningún impacto en el sistema de coagulación. Esto brindaría al médico tratante la opción de un rango de dosis más amplio de un polianión que podría utilizarse completamente independiente del recuento plaquetario y el estado de coagulación del paciente con sepsis, incluso cuando el DIC está presente, sin aún promover el sangrado. Estos polianiones tampoco deben promover la destrucción de las plaquetas.

En formas de realización preferidas, el polianión es estable y no se degrada rápidamente *in vivo*. Además, los polianiones como se describen en el presente documento pueden ser estables a temperatura ambiente y, por lo tanto, almacenarse durante largos periodos sin una degradación sustancial.

5

#### **Polisacáridos polianiónicos**

La heparina es un polisacárido sulfatado de origen que se usa ampliamente en la medicina clínica como un anticoagulante. Su actividad anticoagulante se puede controlar, o incluso neutralizar, en pacientes mediante la administración de un polication farmacéuticamente aceptable, tal como protamina.

10

Solo con fines ilustrativos, se propone que la heparina, un polianión, forme complejo con las histonas policationicas circulantes y, por lo tanto, será beneficiosa para los pacientes con sepsis en una dosis suficiente para formar complejos con las histonas circulantes, pero insuficiente para tener un efecto anticoagulante aparente. Otros polisacáridos polianiónicos conocidos por los expertos en la técnica, tales como heparán sulfato, incluyendo los proteoglicanos perlecan y sindecan, sulfato de condroitina; sulfato de dermatan; El polisulfato de pentosano (Elmiron), sulodexida (HS/DS), ácido hialurónico sobresulfatado, fucoidán y sulfato de condroitina sobresulfatado (Arteparon®) también se pueden usar en dosis que sean suficientes para formar complejos con las histonas circulantes, pero insuficientes para tener un efecto anticoagulante apreciable.

15

En otro aspecto, el polisacárido polianiónico puede ser una heparina parcialmente desulfatada que ha sido modificada químicamente para eliminar algunos de los grupos sulfato, una heparina de bajo peso molecular o una heparina modificada químicamente (por ejemplo, peryodato tratado, heparina dividida con glicol) que carece de actividad anticoagulante significativa, pero mantiene la capacidad de complejarse rápidamente con histonas. El polisacárido polianiónico puede seleccionarse del grupo que consiste en heparina N-acetilada, heparina dividida con glicol, heparina dividida con N glicol, enoxaparina, enoxaparina dividida con glicol, y heparina de bajo peso molecular (3 KDa) dividida con glicol.

20

Como se define en las reivindicaciones, el polianión de la invención es un oligosacárido polianiónico que tiene la estructura general (I):

25



30

en la que A y B son cada uno independientemente un monosacárido cíclico o un monosacárido desoxi cíclico;

D es un monosacárido cíclico, un monosacárido desoxi cíclico, un monosacárido de anillo abierto. o un alcohol de azúcar;

35

n es un número entero seleccionado de 0, 1 y 2; y

en la que cada uno del monosacárido cíclico, el monosacárido desoxi cíclico, el monosacárido de anillo abierto, o el alcohol de azúcar está independientemente sustituido opcionalmente con  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $OPO_3^-$ , un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, o un aralquilo opcionalmente sustituido; y

40

en la que el oligosacárido polianiónico incluye al menos dos sustituyentes aniónicos seleccionados del grupo que consiste en  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$  y  $OPO_3^-$ . El polianión no tiene actividad anticoagulante sustancial.

45

En una forma de realización, el monosacárido cíclico se selecciona del grupo que consiste en glucosa, galactosa, fructosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, manosa, gulosa, idosa, talosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, sorbosa, tagatosa y sedoheptulosa. En otra forma de realización, el monosacárido cíclico se selecciona del grupo que consiste en glucosa, galactosa y fructosa.

50

En una forma de realización, el monosacárido desoxi cíclico se selecciona del grupo que consiste en fucosa, desoxirribosa y ramnosa.

55

En una forma de realización, el alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en glicol, glicerol, eritritol, treitol, ribitol, arabitol, xilitol, sorbitol (glucitol), manitol, dulcitol (galactitol), iditol y fucitol. En otra forma de realización, el alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sorbitol y dulcitol.

En una forma de realización, el monosacárido de anillo abierto se selecciona del grupo que consiste en glucosa, galactosa, fructosa, eritrosa, treosa, eritrolosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, manosa, gulosa, idosa, talosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, sorbosa, tagatosa y sedoheptulosa.

5 En una forma de realización, el monosacárido de anillo abierto puede aminarse de forma reductiva con aril o alquil aminas.

En una forma de realización, los monosacáridos cíclicos están unidos por un enlace 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 o 1,6.

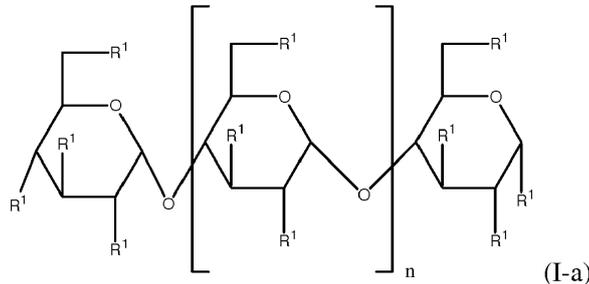
10 En una forma de realización, los monosacáridos cíclicos están unidos por un enlace  $\alpha$ . En otra forma de realización, los monosacáridos cíclicos están unidos por un enlace  $\beta$ . En una forma de realización adicional, cuando están presentes más de 2 monosacáridos, cada uno de los monosacáridos está unido por enlaces  $\alpha$ . En una forma de realización adicional, cuando están presentes más de 2 monosacáridos, cada uno de los monosacáridos está unido por enlaces  $\beta$ . En otra forma de realización, cuando están presentes más de 2 monosacáridos, los monosacáridos están unidos por una combinación de enlaces  $\alpha$  y  $\beta$ .

En una forma de realización, A, B y D son cada uno un monosacárido cíclico seleccionado del grupo que consiste en glucosa, galactosa y fructosa, y cada grupo hidroxilo de la glucosa, galactosa o fructosa está opcionalmente sustituido con  $\text{SO}_3^-$  o  $\text{PO}_3^-$ .

20 El oligosacárido polianiónico se puede seleccionar del grupo que comprende sulfato de maltosa, sulfato de maltotriosa, sulfato de maltotetraosa, sulfato de panosa, sulfato de isomaltotriosa, sulfato de erlosa, sulfato de celobiosa y sulfato de rafinosa.

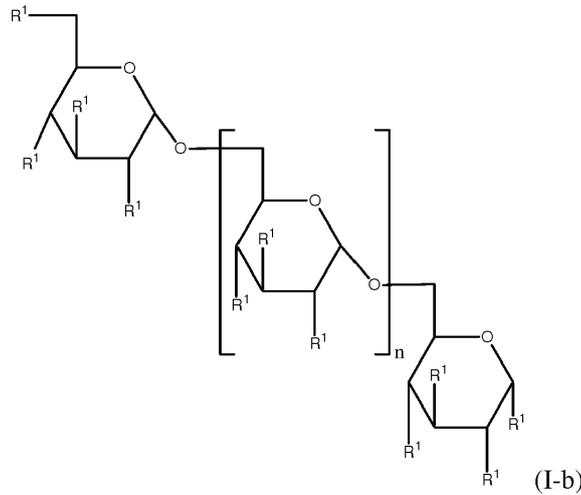
25 En una forma de realización adicional, el oligosacárido polianiónico puede ser sulfato de celobiosa.

En otra forma de realización, el polianión puede ser un oligosacárido polianiónico que tiene la estructura general (I-a):



30 donde cada  $\text{R}^1$  se selecciona independientemente de  $\text{OSO}_3^-$ ,  $\text{COO}^-$ ,  $\text{OPO}_3^-$ ,  $\text{OH}$  o  $\text{H}$ ; y  $n$  es un número entero entre 0, 1 y 2; y en la que al menos dos de  $\text{R}^1$  se seleccionan del grupo que consiste en  $\text{OSO}_3^-$ ,  $\text{COO}^-$ , y  $\text{OPO}_3^-$ . En una forma de realización,  $n$  es 1 o 2. En una forma de realización, cada  $\text{R}^1$  es  $\text{OSO}_3^-$ .

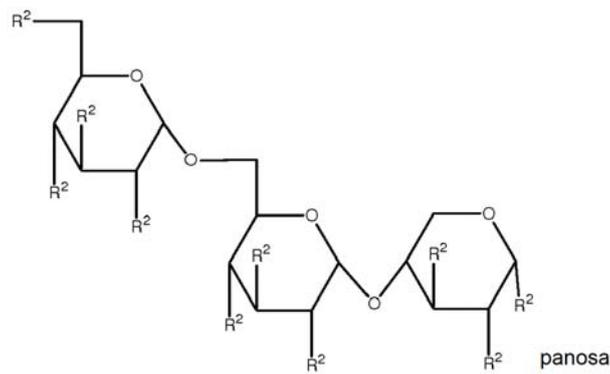
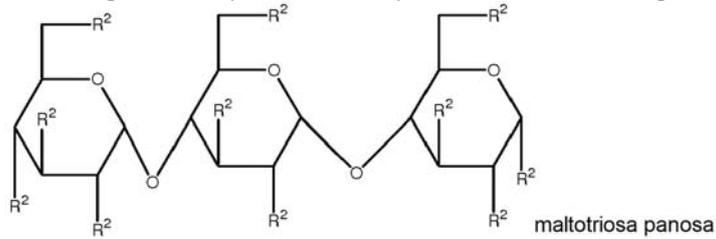
35 En otra forma de realización, el polianión puede ser un oligosacárido polianiónico que tiene la estructura general (I-b):



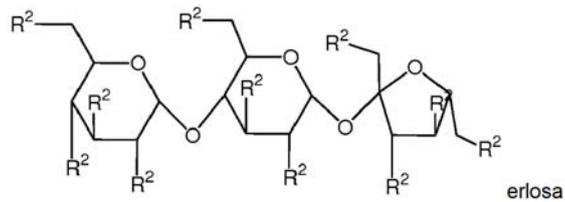
donde cada  $R^1$  se selecciona independientemente de  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $OPO_3^-$ ,  $OH$  o  $H$ ; y  $n$  es un número entero entre 0, 1 y 2; y en la que al menos dos de  $R^1$  se seleccionan del grupo que consiste en  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ , y  $OPO_3^-$ . En una forma de realización,  $n$  es 1 o 2. En una forma de realización, cada  $R^1$  es  $OSO_3^-$ .

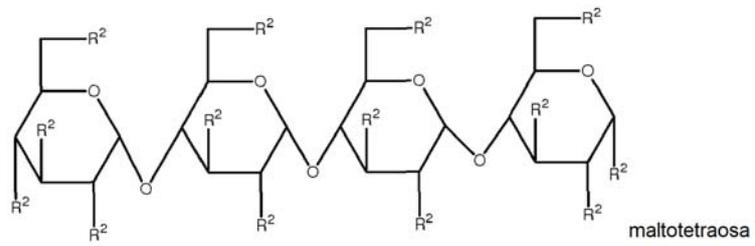
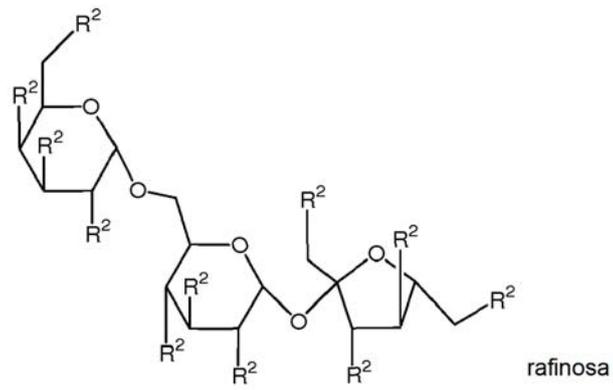
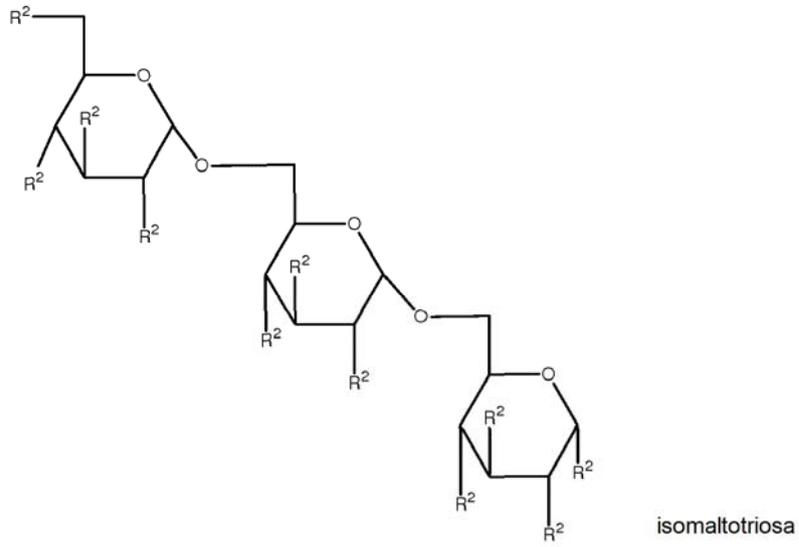
5

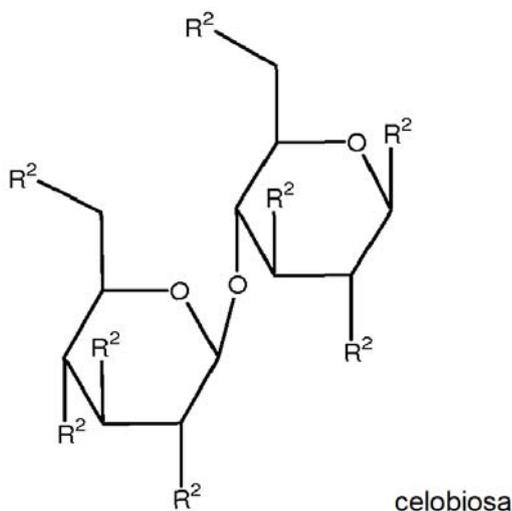
En otra forma de realización, el oligosacárido polianiónico se puede seleccionar del siguiente grupo:



10

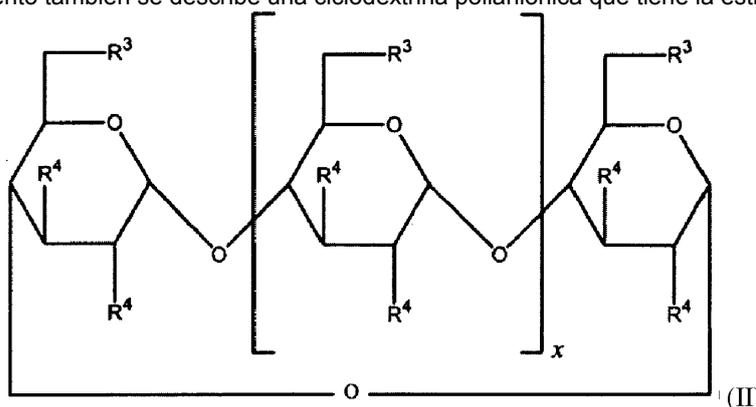






donde cada  $R^2$  se selecciona independientemente de  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $OPO_3^-$ , OH o H; y en los que al menos dos de  $R^2$  se seleccionan del grupo que consiste en  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ , y  $OPO_3^-$ .

5 En el presente documento también se describe una ciclodextrina polianiónica que tiene la estructura general (II):



10 donde cada  $R^3$  se selecciona independientemente de un grupo O-alquilo, O-arilo, O-aralquilo, O-alquenoilo, O-alquinilo opcionalmente sustituido,  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $OPO_3^-$ , OH o H y cada  $R^4$  se selecciona independientemente de  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $OPO_3^-$ , OH o H; x es un número entero entre 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10, y en la que la ciclodextrina polianiónica incluye al menos dos sustituyentes aniónicos seleccionados del grupo que consiste en  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ , y  $OPO_3^-$ .

x puede ser 4, 5 o 6. La ciclodextrina puede ser  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina o  $\gamma$ -ciclodextrina.

15 En otra forma de realización, el oligosacárido es un oligosacárido sulfatado o un oligosacárido de anillo abierto.

En otras formas de realización, el polianión puede ser una forma de anillo abierto sulfatado del extremo de azúcar reductor de un trisacárido o tetrasacárido tal como maltotriitol sulfatado y maltotetraitol, respectivamente. Los derivados de esos trisacáridos o tetrasacáridos pueden ser restos aminados en forma reductora con grupos alquilo y arilo, manteniendo o abriendo el anillo del azúcar reductor.

20 En el presente documento también se describe un polianión que es un disacárido, oligosacárido, disacárido de anillo abierto u oligosacárido de anillo abierto que tiene la siguiente fórmula estructural:

25  $E-(G)_a$

en la que a es un número entero entre 1 y 10; E se selecciona del grupo que consiste en: una diosa, una

- triosa, una tetraosa, una pentosa, una hexosa, una heptosa, una octosa y una nonosa, y cada G independiente se selecciona del grupo que consiste en: una diosa, una triosa, una tetraosa, una pentosa, una hexosa, una heptosa, una octosa y una nonosa;
- 5 en la que E y G, y donde a es un número entero de 2 o más, G y G, unidos a través de un grupo seleccionado de:  $-\text{O}-(\text{CH}_2)_x-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{OCH}_2-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{NR}(\text{CH}_2)_x-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_x\text{NR}_1-$ ,  $-\text{NR}(\text{CH}_2)_x\text{NR}_1-$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2)_x-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_x\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}_2)-(\text{CH}_2)_x-\text{N}(\text{R}_2)-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{N}(\text{R}_2)-\text{C}(\text{O})-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_x-\text{Ar}-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}_2)-$  y  $-\text{N}(\text{R}_2)-(\text{CH}_2)_x-\text{N}(\text{R}_2)-$ ; R, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo y C(O)-alquilo; x es un número entero entre 0 y 10;
- 10 en la que E y G pueden estar sustituidos con un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en: alquilo, alquenoilo, arilo, halo, heteroarilo, un derivado amida tal como  $-\text{NHCOCH}_3-$ , alcoxi tal como  $-\text{OCH}_3-$ ,  $-\text{O}-$  y  $-\text{OH}$ ;
- y en la que dicha diosa, triosa, tetraosa, pentosa, hexosa, heptosa, octosa y nonosa pueden sulfatarse, fosforilarse o carboxilarse.
- 15 E y cada G pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en una pentosa, una hexosa y una heptosa, y se unen a través de un grupo seleccionado de:  $-\text{O}-(\text{CH}_2)_x-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{OCH}_2-$ ,  $-\text{NR}(\text{CH}_2)_x-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_x\text{NR}_1-$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2)_x-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_x\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}_2)-(\text{CH}_2)_x-\text{N}(\text{R}_2)-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{N}(\text{R}_2)-\text{C}(\text{O})-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_x-\text{Ar}-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}_2)-$ , y R, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan del grupo que consiste en: hidrógeno, acetilo y alquilo, y x es un número entero entre 1 y 6.
- 20 En otro aspecto, la hexosa puede seleccionarse del grupo que consiste en: glucosa, galactosa, manosa, fructosa, fucosa, e idosa, y la pentosa puede ser xilosa.

#### **Polianiones lineales y unidos**

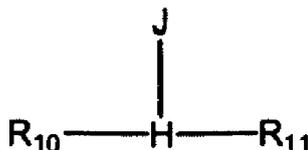
- 25 En el presente documento también se describen polianiones que son una construcción sulfatada de 2 azúcares unidos de manera reductora, a través de sus extremos reductores, que tienen por lo tanto anillos abiertos y que presentan una estructura de poliol lineal. Por ejemplo, el enlazador  $-\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2-$  puede unir 2 unidades de glucosa o ácido glucurónico reducidas. La longitud de la cadena y el número de posibles grupos sulfato por molécula en este tipo de estructura también pueden extenderse mediante la elección apropiada del tipo de
- 30 azúcar como las subunidades de partida, por ejemplo, una heptosa, tal como sedoheptulosa, en lugar de una hexosa, tal como glucosa. En otros aspectos, el polianión puede ser una construcción sulfatada con un enlazador entre el monosacárido cíclico y los monosacáridos de anillo abierto.

- En otros aspectos, el polianión puede ser un poliol polianiónico lineal de 12, 13, 13, 15, 16, 17 o 18 longitudes de
- 35 cadena de átomos de carbono. El poliol polianiónico lineal puede contener enlaces insaturados, cadenas ramificadas o estructuras de anillo que pueden estar saturadas o insaturadas. El poliol polianiónico lineal puede estar opcionalmente sustituido. Los ejemplos de precursores alcohólicos son 1,2,13,14-tetradecan-tetraol, 5-(hidroximetil)undecano-1,5,6,7,11-pentol, octadecano-1,18-diol, y derivados de escualeno hidrolizado. En un aspecto, el poliol lineal polianiónico está sulfatado. En otros aspectos, el poliol lineal polianiónico incluye al menos 2
- 40 sustituyentes seleccionados de un grupo sulfato, un grupo carboxilato y un grupo fosfato.

En otros aspectos, el polianión puede ser un compuesto polianiónico basado en alquil polioles o unido a anillos aromáticos, por ejemplo, suramina y derivados relacionados.

#### **45 Polianiones de ciclitol**

En el presente documento también se describe un polianión que es un ciclitol que tiene la siguiente fórmula estructural:



- 50 en la que:

H se selecciona del grupo que consiste en: N, CH, O, S, o un enlazador seleccionado de  $-\text{CO}-\text{NH}-\text{K}-\text{NH}-\text{CO}-$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{K}-\text{CO}-\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-\text{K}-\text{NH}-$ ,  $-\text{O}-\text{K}-\text{O}-$ ;

K se selecciona del grupo que consiste en alquileo y arileno;

- 55 R<sub>10</sub> es un anillo carbocíclico de 4, 5, o 6 miembros que está saturado o insaturado, en el que el anillo

comprende al menos un grupo sulfato, al menos un grupo carboxilato, o al menos un grupo fosfato.

R<sub>11</sub>, se selecciona del grupo que consiste en: un anillo carbocíclico de 4, 5 o 6 miembros que está saturado o insaturado, en el que el anillo comprende al menos un grupo sulfato, al menos un grupo carboxilato, o al menos un grupo fosfato, hidrógeno, arilo y alquilo;

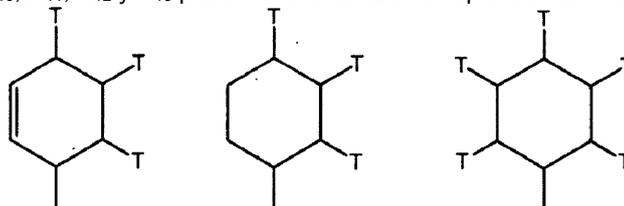
5 J se selecciona del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo, arilo, -L-C(R<sub>12</sub>)(R<sub>13</sub>) y acetato;

L se selecciona del grupo que consiste en: -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-, -CH<sub>2</sub>-Ar-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-Ar-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-, en los que el grupo L puede comprender opcionalmente uno o más grupos sulfato, uno o más grupos carboxilato, o uno o más grupos fosfato.

10 R<sub>12</sub> y R<sub>13</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: un anillo carbocíclico de 4, 5, o 6 miembros que está saturado o insaturado, hidrógeno, arilo y alquilo, en el que R<sub>12</sub> y/o R<sub>13</sub> pueden comprender uno o más grupos sulfato, uno o más grupos carboxilato o uno o más grupos fosfato, y x es un número entero entre 0 y 10.

En un aspecto, L se selecciona del grupo que consiste en: -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-, en la que x es un número entero entre 2 y 10,  
15 CH<sub>2</sub>-Ar-CH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>CH(OSO<sub>3</sub>H)CH<sub>2</sub>.

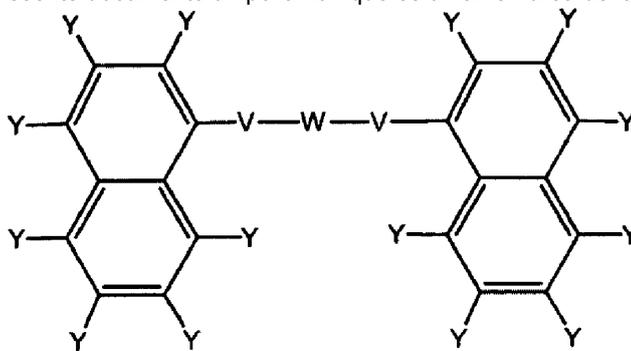
En un aspecto alternativo, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub> y R<sub>13</sub> pueden seleccionarse independientemente de los siguientes:



en los que T se selecciona independientemente del grupo que consiste en: SO<sub>3</sub>H, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, COOH, COO<sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub>H y  
20 OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

### Polianiones de arilen urea

También se describe en el presente documento un polianión que es un arilen urea de la siguiente fórmula:



25 en la que cada Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en: SO<sub>3</sub>H, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, hidrógeno, alquilo, halo, fenilo, un derivado amida, -NHCOCH<sub>3</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -O-, -OCH<sub>3</sub>, COOH, COO<sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub>H y OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

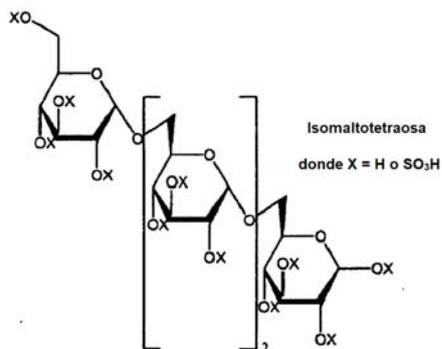
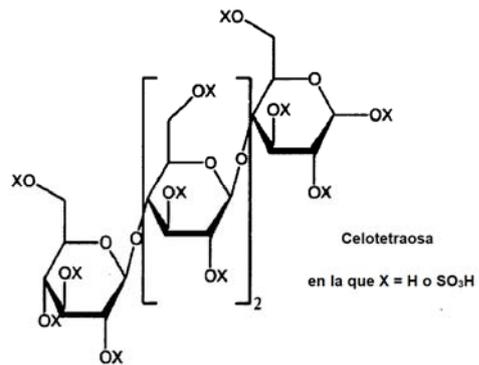
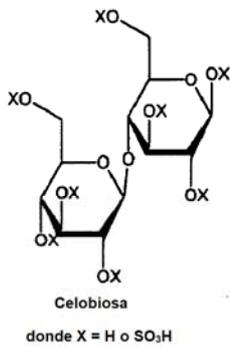
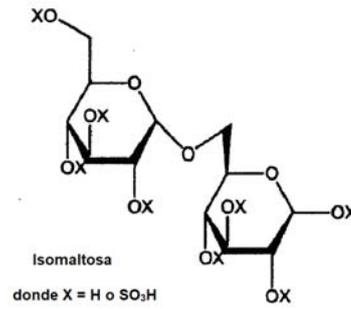
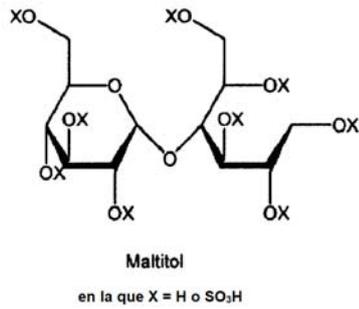
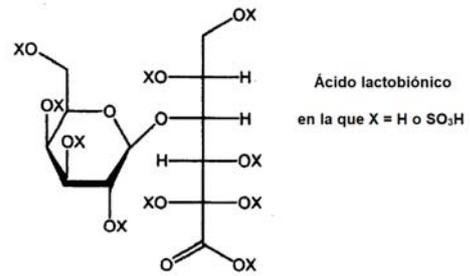
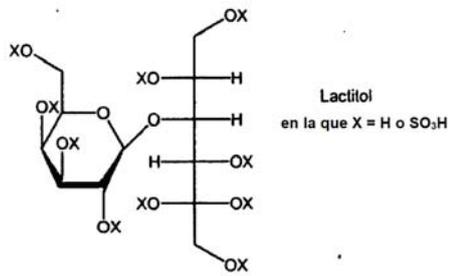
30 cada V se selecciona independientemente del grupo que consiste en: -(NHC(O)Ph)<sub>z</sub>-, (CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub> y fenilo;

W es -NH-C(O)-NH-;

u y z pueden ser independientemente entre sí un número entero entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

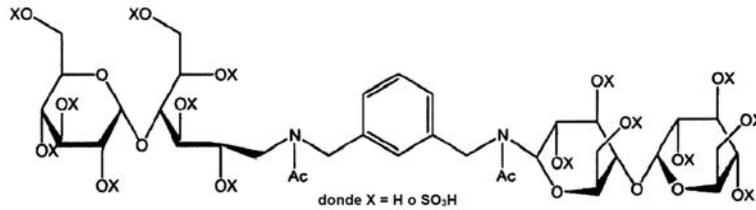
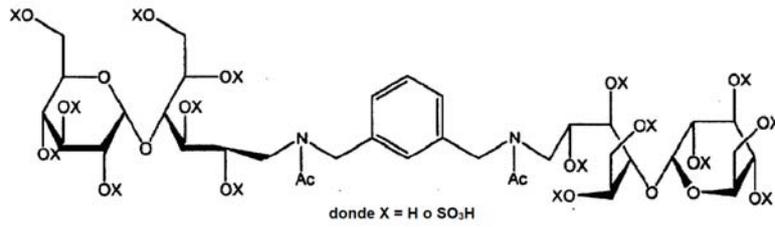
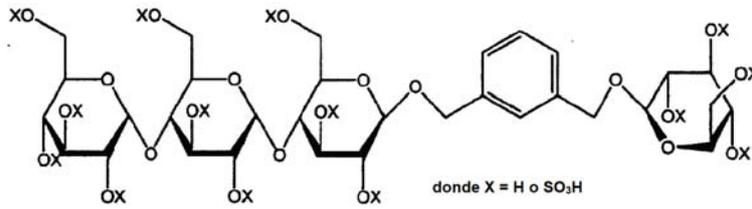
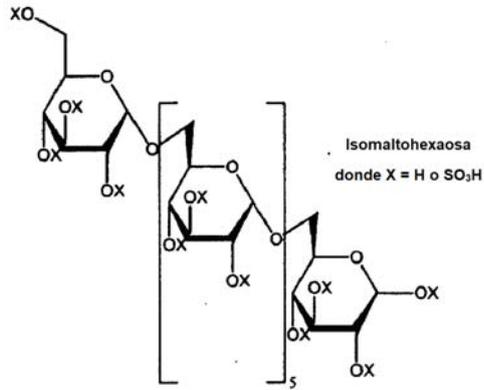
En un aspecto, la arilen urea puede ser una suramina, o una sal de la misma.

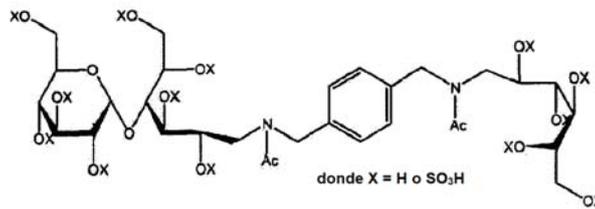
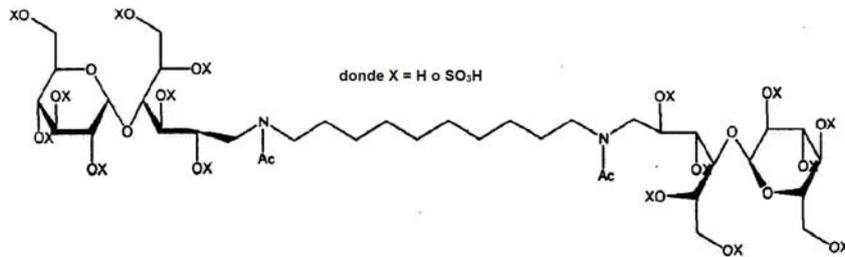
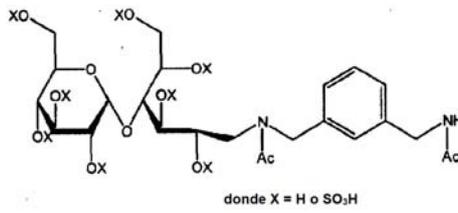
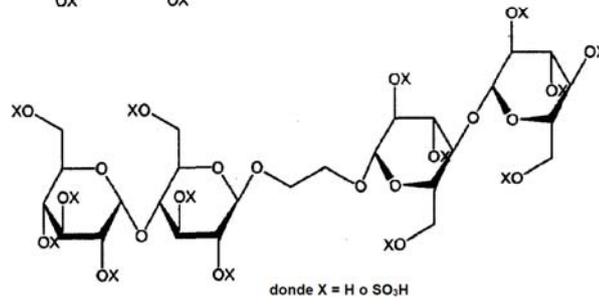
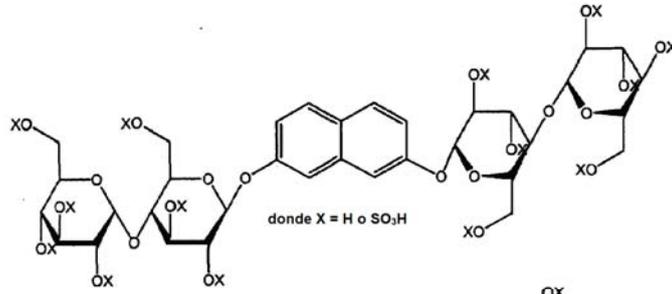
35 Los ejemplos de polianiones para su uso de la invención incluyen los siguientes:

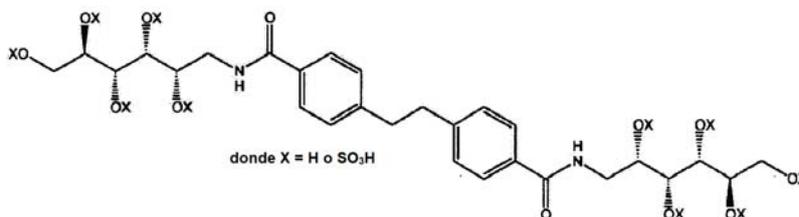
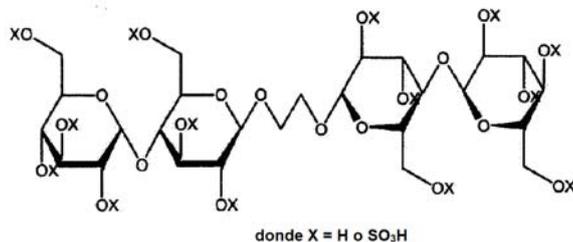


5

Otros polianiones se muestran a continuación a modo de ejemplo solamente. Estos polianiones adicionales no forman parte de la invención reivindicada.







### Preparación de polianiones

5

Los polianiones como se definen en las reivindicaciones para su uso en los métodos de la invención o como se describen en el presente documento solo a modo de ejemplo pueden comprarse o prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

10 Los compuestos de oligosacáridos sulfatados usados en los métodos y composiciones de la invención pueden prepararse por sulfatación de un oligosacárido correspondiente también por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el compuesto de oligosacárido se puede tratar con un agente de sulfatación tal como el complejo de piridina-trióxido de azufre en presencia de un disolvente apropiado.

15 El polianión puede ser una mezcla de compuestos obtenidos por reacción de un oligosacárido con complejo de piridina-trióxido de azufre.

El oligosacárido puede tener uno o más grupos sulfato presentes. Estos grupos sulfato pueden reaccionar con diversas bases para formar sales. Los compuestos sulfatados son estables cuando están en forma de sal. Los compuestos sulfatados en forma libre se pueden derivar de una sal de los mismos utilizando una resina de intercambio catiónico tal como Dowex 50W-X8. Opcionalmente, una sal puede someterse a un intercambio iónico convencional para convertirla en una cualquiera de diversas otras sales deseables.

20

Los oligosacáridos que están sulfatados pueden ser productos de origen natural, por ejemplo, rafinosa, estaquiosa o ciclodextrinas. Como alternativa, los polianiones pueden prepararse por síntesis química o los oligosacáridos pueden prepararse por degradación enzimática o química de polisacáridos de origen natural seguido de la modificación química posterior.

25

### Actividad anticoagulante de los polianiones

30

Algunos polianiones pueden tener una actividad anticoagulante. El término "actividad anticoagulante" se refiere a una actividad de una sustancia que previene, inhibe o prolonga la coagulación sanguínea en un ensayo de coagulación sanguínea *in vitro* o *in vivo*.

35 Los ensayos de coagulación sanguínea se conocen en la técnica e incluyen ensayos que miden el tiempo requerido para la formación de un coágulo de fibrina. Por ejemplo, el ensayo puede incluir tiempo de protrombina (PT), tiempo de tromboplastina parcial (PTT), tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), ensayo de fibrinógeno, tiempo de coagulación de trombina (TCT) y tiempo de coagulación activada (ACT).

40 La actividad anticoagulante de un polianión puede afectar a las aplicaciones clínicas o las dosis eficaces del polianión útil en los métodos descritos en el presente documento. Por lo tanto, como se define en las

reivindicaciones, el polianión de la invención no tiene una actividad anticoagulante sustancial, de modo que el polianión aumenta el tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial (PTT), el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), el tiempo de coagulación de la trombina (TCT), o el tiempo de coagulación activada (ACT) en un 0% a un 10% del intervalo normal.

5

En otras formas de realización, el polianión aumentará el PT, PTT, APTT, TCT o ACT en aproximadamente el 1 a aproximadamente el 5% del rango normal. En una forma de realización adicional, el polianión aumentará el PT, PTT, APTT, TCT o ACT en aproximadamente el 2,5 a aproximadamente el 7,5% del rango normal. En aún una forma de realización adicional, el polianión aumentará el PT, PTT, APTT, TCT o ACT en aproximadamente el 5 a

10

### Nanopartículas

La Patente de Estados Unidos Número 6.977.068 titulada "Method for detection of fibrin clots" describe métodos para el uso de nanopartículas de radionúclidos encapsuladas con carbono en la detección de coágulos de fibrina. La solicitud de patente Internacional número PCT/AU2006/000554, presentada el 28 de abril de 2006 y publicada como WO 2006/116798 A1, titulada "A method of forming an injectable radioactive composition of a carbon encapsulated radioactive particulate", describe un proceso para la producción de una formulación inyectable de nanopartículas encapsuladas con carbono. El proceso descrito en el presente documento puede denominarse "proceso FibrinLite" y las nanopartículas producidas de este modo pueden denominarse "FibrinLite".

15

20

Se entenderá que un experto en la técnica será consciente de que los métodos para producir una dispersión acuosa de compuestos de nanopartículas encapsuladas con carbono pueden incluir una etapa de captura acuosa de un aerosol radioactivo y que esta etapa se puede lograr de varias maneras. Por ejemplo, la etapa de captura acuosa de un aerosol radiactivo utilizado para hacer compuestos de nanopartículas encapsuladas con carbono puede incluir, pero sin limitación, la recolección del aerosol en un lavador Venturi, la concentración del aerosol en un electrodo líquido o el uso de un dispositivo ciclónico.

25

Descritos únicamente a modo de ejemplo, los compuestos de nanopartículas encapsuladas con carbono pueden prepararse utilizando el proceso descrito en el documento de patente PCT/AU2006/000554, en el que el proceso implica la captura del aerosol radiactivo en agua utilizando un precipitador de Browitt descrito en la patente de Estados Unidos número 5.792.241.

30

Como se ha descrito anteriormente, las nanopartículas encapsuladas con carbono pueden proporcionar una alta radioactividad específica y un alto marcado de avidéz de macromoléculas tales como histonas.

35

Como se describe en el documento de patente PCT/AU2006/000554, se puede preparar una partícula radiactiva encapsulada con carbono (nanopartícula) cargando un crisol de carbono con tecnecio u otro isótopo, precalentando el crisol cargado, la emisión instantánea de las partículas, la captura de partículas en agua u otras soluciones acuosas.

40

Como se describe en el documento de patente PCT/AU2006/000554, el isótopo se puede usar para cargar un crisol de grafito adecuado, ya sea mediante un método evaporativo, si la actividad específica del isótopo es suficientemente alta, por ejemplo, 100 mCi/ml, simplemente colocando una alícuota del isótopo en solución en el crisol y evaporando el líquido a sequedad mediante un calentamiento resistivo cuidadosamente regulado del crisol. Como alternativa, el crisol puede cargarse electrolíticamente usando el crisol como un cátodo y un ánodo de un alambre de platino fino en un tubo de suministro de fluido. El tubo administra una solución de isótopos en el crisol (y facilita su recirculación a través del crisol) y el isótopo se puede concentrar en la superficie interna del crisol mediante la acción combinada de la electrólisis y el bombeo continuo.

45

Después de cargar, el crisol se somete a una etapa de precalentamiento para eliminar cualquier vehículo en la solución de isótopos, por ejemplo, se elimina el cloruro de sodio, preferiblemente por evaporación en un flujo de gas inerte, por ejemplo, argón. La etapa de precalentamiento reduce la cantidad de carbono libre que posteriormente se elimina del crisol, reduce el nivel de isótopos libres que contaminan las nanopartículas y aumenta la proporción de isótopos que está presente en las fracciones de partículas más pequeñas.

50

El crisol pretratado se calienta instantáneamente a, por ejemplo, 2740-2790°C durante 3 segundos por medio de un servo dispositivo electrónico para producir un perfil de calentamiento del crisol estrechamente regulado que presenta un rápido tiempo de subida (por ejemplo, 0,3-0,7 segundos) seguido de una meseta plana que se mantiene, por

55

ejemplo, a  $2765^{\circ}\text{C} \pm 15^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de calentamiento predeterminado (por ejemplo, 2,5-15 segundos). Durante esta etapa, las nanopartículas se eliminan de la superficie del crisol.

- Las partículas eliminadas del crisol se precipitan en agua que contiene una baja concentración de un agente tensoactivo, por ejemplo, desoxicolato sódico 10 micromolar y condiciones de muy baja fuerza iónica (por ejemplo, menos de 100 micromolar). En un aspecto preferido, las nanopartículas pueden precipitarse en una concentración muy baja de un tampón débilmente ácido o esto puede añadirse a la dispersión de nanopartículas después de la recogida del precipitador, por ejemplo, una concentración final de dihidrogenocitrato sódico 300 micromolar a pH 4,1.
- 10 Por consiguiente, las nanopartículas pueden producirse como una dispersión acuosa estable con una concentración de electrólitos muy baja, menos que el equivalente de NaCl 1,0 mM. Cualquiera de los métodos descritos en el documento de patente PCT/AU2006/000554 o derivados de los mismos para la preparación de las partículas puede utilizarse en la preparación de las nanopartículas descritas en el presente documento. En un ejemplo, esto se puede lograr, por ejemplo, calentando el crisol de grafito cargado con isótopos a aproximadamente  $1600 - 1650^{\circ}\text{C}$  durante
- 15 15 segundos para eliminar el cloruro de sodio del vehículo antes de la eliminación del radioisótopo por encima de  $2700^{\circ}\text{C}$ . El punto de ebullición del cloruro de sodio es solo de  $1413^{\circ}\text{C}$ , y el radioisótopo Tc-99m no es volátil a esta temperatura. Cuando se utilizan radioisótopos alternativos, el destinatario experto podrá determinar la temperatura de eliminación apropiada, tal como, por ejemplo, en el documento de patente PCT/AU2006/000554.
- 20 Las dispersiones acuosas de nanopartículas fabricadas de acuerdo con el documento de patente PCT/AU2006/000554 no floculan, ni precipitan ni sedimentan en reposo durante, por ejemplo, 48 horas. La dispersión de nanopartículas puede contener una concentración muy baja (por ejemplo, en el rango de aproximadamente 1 micromolar a aproximadamente 20 micromolar, típicamente aproximadamente 10 micromolar) de un tensoactivo aniónico, típicamente desoxicolato de sodio que es compatible con y puede inyectarse en la
- 25 circulación sanguínea de un sujeto vivo (véanse las Figuras 5 y 6 en el presente documento). Las nanopartículas pueden almacenarse de cualquier manera apropiada, preferiblemente para permitir la estabilidad de la dispersión, tal como mediante el almacenamiento a una concentración baja de un tampón débilmente ácido, tal como a una concentración final de dihidrogenocitrato sódico 300 micromolar a pH 4,1. La dispersión de las nanopartículas es estable y puede fraccionarse por tamaño mediante el uso de filtros de membrana hidrófilos fácilmente disponibles,
- 30 tales como los filtros de jeringa de éster de celulosa mixta (MCE) Millipore, disponibles con una porosidad de 800, 450 y 220 nm. Más del 90% de la radioactividad en una preparación típica de nanopartículas pasará a través de un filtro MCE de 800 nm, y la cromatografía en capa fina puede mostrar que la misma preparación contiene típicamente menos del 5% de isótopo soluble.

### 35 **Isótopos radioactivos**

- El experto en la técnica apreciará que cualquier radioisótopo de un elemento metálico puede incorporarse en la nanopartícula. Como se describe en los documentos de patente PCT/AU2006/000554 y PCT/AU2009/000508, se puede incorporar un rango diverso de radioisótopos en las nanopartículas, incluyendo los que emiten radiación
- 40 gamma, tal como Tc-99m, Ga-67; los que emiten radiación beta, tal como Y-90; los que emiten radiación alfa, tal como Bi-213; y los que emiten radiación de positrones, tal como Cu-64. Se puede utilizar cualquier isótopo radiactivo metálico adecuado, incluidos  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{153}\text{Gd}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113\text{m}}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{24}\text{Na}$ ,  $^{103}\text{Pd}$ ,  $^{81}\text{Rb}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{201}\text{Th}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{192}\text{Ir}$ .
- 45 El rango de isótopos que se pueden usar en las nanopartículas, incluye aquellos que son ideales para aplicaciones de diagnóstico por imágenes, tal como tomografía computarizada de fotón único (SPECT) usando Tc-99m o Ga-67, y la tomografía por emisión de positrones (PET) utilizando Cu-64 o Zr-89 o gammagrafía.

- Como se describe en los documentos de patente PCT/AU2006/000554 y PCT/AU2009/000508, un radionúclido
- 50 ejemplar es Tc-99m. Cada una de las nanopartículas puede transportar decenas de miles o más de átomos de isótopos en su núcleo, de modo que se pueden obtener niveles muy altos de actividad específica que están muy por encima de los que se pueden obtener con los métodos tradicionales de etiquetado. Para, y utilizando Tc-99m como el radioisótopo encapsulado modelo, puede prepararse una carga de Tc-99m en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mCi, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mCi, de aproximadamente 7,5 a
- 55 aproximadamente 95 mCi, de aproximadamente 10 a aproximadamente 90 mCi, de aproximadamente 15 a aproximadamente 85 mCi, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 mCi, de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mCi, de aproximadamente 30 a aproximadamente 70 mCi, de aproximadamente 35 a aproximadamente 65 mCi, de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mCi, de aproximadamente 45 a aproximadamente 55 mCi, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 55 mCi. Una preparación típica de

partículas se puede hacer fácilmente para contener entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30 mCi en 2 ml de suspensión acuosa, según se desee. A partir de la caracterización en fase de vapor de las partículas mediante la medición de las partículas de movilidad de barrido (SMPS), se puede demostrar que la suspensión puede contener aproximadamente 50 µg de material de nanopartículas, de modo que la actividad específica se puede realizar hasta 5 600 mCi/mg, o por encima de 22 GBq/mg. La actividad específica de la preparación se puede ajustar según se desee variando la actividad del isótopo utilizado para cargar el crisol en el generador de aerosol.

#### Etiquetado de histonas con nanopartículas

10 En el aspecto preferido, el etiquetado de las histonas es sustancialmente irreversible en condiciones típicas encontradas por la histona marcada *in vivo*. Típicamente, el etiquetado de alta avidéz de la histona es tal que hay menos de aproximadamente un 10% de disociación en condiciones *in vivo*. La Solicitud de Patente Internacional Número PCT/AU2009/000508 presentada el 23 de abril 2009 y publicada como WO 2009/129577 A1, titulada "Methods for radiolabelling macromolecules", describe un proceso para el etiquetado de macromoléculas biológicas, 15 tales como polipéptidos.

El documento de patente PCT/AU2009/000508 describe un método mediante el cual se pueden preparar macromoléculas radiomarcadas utilizando nanopartículas, los presentes inventores aprovechan el proceso de encapsulación de carbono (véase PCT/AU2006/000554) que envuelve un isótopo metálico en una jaula de carbono, 20 por lo que se aísla físicamente del contacto con su entorno externo, una propiedad especialmente valiosa para las partículas y, por lo tanto, para la macromolécula, particularmente cuando se van a usar *in vivo*. El potencial de lixiviación y bio-captación de los iones metálicos radioactivos *in vivo* de la macromolécula radiomarcada es virtualmente inexistente porque solo el exterior de carbono del compuesto de nanopartículas está expuesto al entorno biológico *in vivo*.

25 El documento de patente PCT/AU2009/000508 describe métodos mediante los cuales las nanopartículas pueden revestirse con policaciones tales como una histona, de modo que las partículas resultantes tengan un núcleo de alta actividad específica de radiomarcador detectable, así como una histona estrechamente unida.

30 La histona radiomarcada se puede usar para localizar un isótopo fácilmente detectable en un sitio predeterminado *in vivo*, basado en la interacción biológica específica que la histona tiene con un órgano, tal como el pulmón. Por ejemplo, como se demuestra en el presente documento, las nanopartículas de Tc99m en complejos con histonas de timo de ternera son selectivas para el tejido pulmonar, y cuando se administran a un sujeto se dirigirán preferiblemente al pulmón, según se visualiza mediante gammagrafía. De esta manera, las nanopartículas 35 revestidas con histona pueden usarse como un agente de cribado para probar la capacidad de los compuestos candidatos para inhibir la acumulación de histonas en el pulmón.

#### Condiciones para el radiomarcado de histonas utilizando nanopartículas

40 Las nanopartículas producidas u obtenidas de este modo pueden usarse en los métodos descritos en el documento de patente PCT/AU2009/000508 para radioetiquetar histonas.

\*\*\*

Las interfaces hidrófobas, tales como una interfaz aire-agua, interfaces hidrocarburo-agua y, por inferencia, una interfaz grafito-agua como en las suspensiones acuosas de nanopartículas, generalmente atraen un ligero 45 predominio de iones hidroxilo en agua pura. El resultado es que estas interfaces se comportan como ligeramente cargadas negativamente, aunque los potenciales superficiales suelen ser muy bajos (decenas de milivoltios). Las nanopartículas también pueden llevar una carga negativa aumentada en su superficie debido a la adsorción del tensoactivo aniónico, típicamente desoxicolato, que se usa en su preparación. Si las partículas y una macromolécula están cargadas negativamente de manera similar en el mismo medio acuoso, pueden repelerse 50 débilmente entre sí en la escala de decenas de nanómetros cuando sus capas dobles difusas de cargas se superponen. Sin embargo, la selección de un pH del medio acuoso en el que la carga neta en la histona es sustancialmente cero, tal como en el pI de la histona, criba muy rápidamente este potencial, de modo que ofrece poca barrera energética a la adsorción y cohesión de partículas a una macromolécula en estos sistemas. Dicho cribado, con longitudes de Debye <10 nm, producirá una situación en la que la dispersión atractiva, la correlación 55 iónica o las fuerzas hidrófobas generalmente dominarán la energía de interacción total de estas superficies. El resultado es que las partículas, una vez acopladas con la histona, se adherirán tenazmente a esa macromolécula de una manera esencialmente irreversible. Las condiciones promueven de este modo la unión ávida de la histona y el compuesto de nanopartículas. En aspectos preferidos, el medio en el que se produce el contacto puede comprender un pH y una concentración de electrolito que promueve la influencia de las fuerzas atractivas de corto alcance entre

las nanopartículas y la histona sobre las fuerzas repulsivas electrostáticas de largo alcance al disminuir esta última en extensión y magnitud. Como resultado de un contacto exitoso, la macromolécula puede describirse como asociada o en complejo con el compuesto de nanopartículas. La entidad resultante también puede denominarse complejo. Se observa que los términos "complejo" y "en complejo con" en el presente contexto no pretenden implicar  
5 ninguna disposición estructural particular de la histona y el compuesto de nanopartículas distinto de lo que ocurre como resultado de un contacto exitoso en el que se unen estrechamente.

Las nanopartículas se pueden usar para etiquetar una histona poniéndose en contacto con las nanopartículas y la macromolécula en condiciones de pH adecuado y preferiblemente también una concentración de electrolito  
10 adecuada. Se pueden seleccionar condiciones de solución adecuadas que faciliten el proceso de cribado descrito anteriormente y, por lo tanto, permitan que las fuerzas atractivas de corto alcance dominen sobre las fuerzas electrostáticas repulsivas, de modo que las nanopartículas se unen virtualmente de forma irreversible a una macromolécula. En vista de la divulgación en el presente documento, se apreciará que pueden determinarse empíricamente las condiciones de unión apropiadas y, si se desea, óptimas, tales como el pH y la concentración de  
15 electrolito, para un contacto deseado entre nanopartículas y una histona.

El contacto puede producirse en cualquier medio adecuado, aunque normalmente se preferirá un medio acuoso. Antes del contacto, las nanopartículas pueden prepararse o almacenarse en un medio de almacenamiento adecuado, generalmente seleccionado para permitir la estabilidad de la dispersión. Por lo tanto, la dispersión de  
20 nanopartículas puede contener una concentración muy baja (por ejemplo, aproximadamente 10 micromolar) de un tensioactivo aniónico, tal como desoxicolato de sodio. Antes de la etapa de contacto del método descrito en el presente documento, las nanopartículas se pueden tratar previamente para ajustar las condiciones de la dispersión para favorecer la unión de las nanopartículas y la histona. Por ejemplo, se pueden ajustar condiciones tales como el tipo de tampón, el pH, la concentración de electrolitos y el tipo, la presencia o ausencia de tensioactivo y la  
25 concentración de cualquier componente, incluidas las nanopartículas. El ajuste del pH y la fuerza iónica del medio pueden tener lugar en presencia o ausencia de la histona. Típicamente, el ajuste del pH y la fuerza iónica del medio, cuando se encuentre en presencia de las nanopartículas, ocurrirá también en presencia de la macromolécula para promover la unión entre las nanopartículas y la macromolécula, en lugar de la unión entre las nanopartículas que causará agregación y agrupamiento.

30 La unión de nanopartículas a una histona se puede lograr mediante el uso de un pH cercano al pI de la macromolécula y una concentración adecuada del electrolito simple NaCl, que es eficaz para inducir una unión ávida de las nanopartículas a la macromolécula a concentraciones de más de aproximadamente 1 mM de NaCl. Como se apreciará, las condiciones apropiadas para inducir una unión ávida de nanopartículas a una histona pueden lograrse  
35 utilizando uno cualquiera o más de una gran diversidad de electrolitos. Se puede usar una concentración de electrolito simple superior a aproximadamente 1 milimolar para inducir una unión ávida de nanopartículas a una histona y, por lo tanto, cuando las nanopartículas tienen un núcleo de partículas radiactivas, para la preparación de una histona radiomarcada. En general, se espera que la concentración de electrolito simple de la solución o medio para el contacto esté en el intervalo de aproximadamente 1 milimolar a aproximadamente 200 milimolar; típicamente,  
40 de aproximadamente 10 milimolar a aproximadamente 175 milimolar; de aproximadamente 20 milimolar a aproximadamente 150 milimolar; de aproximadamente 50 milimolar a aproximadamente 150 milimolar. Más típicamente, se espera que la concentración de electrolito de la solución esté en el intervalo de aproximadamente 1 milimolar a aproximadamente 200 milimolar; típicamente de aproximadamente 10 milimolar a aproximadamente 175 milimolar; de aproximadamente 20 milimolar a aproximadamente 150 milimolar; de aproximadamente 40 milimolar a  
45 aproximadamente 150 milimolar; de aproximadamente 50 milimolar a aproximadamente 150 milimolar; de aproximadamente 75 milimolar a aproximadamente 150 milimolar; de aproximadamente 90 milimolar a aproximadamente 150 milimolar; de aproximadamente 100 milimolar a aproximadamente 150 milimolar; aproximadamente 150 milimolar. Un experto en la técnica entenderá que la fuerza iónica de una solución de electrolito o medio para la etapa de contacto descrita en el presente documento se puede lograr, por ejemplo,  
50 utilizando NaCl, en donde se puede lograr una fuerza iónica adecuada con una concentración de NaCl de aproximadamente 150 mM o, por ejemplo, una concentración de MgSO<sub>4</sub> de menos de aproximadamente 75 mM. Un experto en la técnica también entenderá que se puede lograr una fuerza iónica adecuada de una solución de electrolito mediante el uso de varias especies iónicas diferentes, por ejemplo, una mezcla de NaCl y MgSO<sub>4</sub>. Además, un experto en la técnica entenderá que la fuerza iónica se puede lograr mediante el uso de al menos una  
55 especie iónica y al menos una especie no iónica, tal como un polímero de osmolito o de alto peso molecular, tal como polietilenglicol. Por ejemplo, cuando se reduce la concentración eficaz del agua, puede ser necesario aumentar la concentración de electrolito, por ejemplo, a aproximadamente 250 mM.

Se puede usar cualquier especie iónica adecuada. Por ejemplo, las especies iónicas pueden seleccionarse del grupo

que comprende sales de Na, Ni, Al, Ru, Pt, Os, Ir, Fe, Se, Sn, K, Te, Mn, Mo, V, Mg, Zn, Ca, Cu, Co. En aspectos preferidos, las especies iónicas se limitarán típicamente a aquellas que no son tóxicas en las concentraciones eficaces, por ejemplo, Na, K, Ca.

- 5 El tampón usado en la etapa de contacto puede ser de cualquier pH adecuado seleccionado como adecuado para promover fuerzas de atracción de corto alcance entre las nanopartículas y la histona al suprimir las fuerzas electrostáticas repulsivas. Preferiblemente, el tampón estará en el intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 10 o más, de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 8, de aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente pH 8,5, de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 8, de aproximadamente pH 4,5 a
- 10 aproximadamente pH 7,5, de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 7. Más preferiblemente, el pH de la etapa de contacto, tal como el pH del medio acuoso, estará cerca del pI de la macromolécula a utilizar en el contacto, tal como un polipéptido. Aún más preferiblemente, el pH de la etapa de contacto estará sustancialmente en el pI de la macromolécula que se utilizará en el contacto. Como se describe en el presente documento, el destinatario experto puede determinar el pH óptimo y deseado teniendo en cuenta otras condiciones de reacción, tal
- 15 como el tipo y la concentración de electrólitos y la macromolécula o macromoléculas.

El contacto puede comprender la modificación de las condiciones durante el transcurso del contacto, tal como un aumento o disminución de la temperatura de incubación durante el contacto, o un aumento o disminución de la agitación del medio o la mezcla durante el contacto.

- 20 La histona radiomarcada puede someterse a una o más etapas de purificación posteriores al contacto. Esto puede comprender separar la macromolécula radiomarcada de la macromolécula no marcada y/o del compuesto de nanopartículas libres. En una reacción típica, el contacto puede dar como resultado una unión satisfactoria de las nanopartículas a una histona para proporcionar histona radiomarcada, mientras se retiene en los medios acuosos de
- 25 los componentes sin reaccionar de la etapa de contacto, típicamente una proporción de compuesto de nanopartículas que no se han adherido a la histona. La eliminación de componentes sin reaccionar puede ser deseable, por ejemplo, en circunstancias en las que el compuesto de nanopartículas libres sería perjudicial, tal como el transporte de sangre a órganos no diana. La eliminación de la macromolécula no unida es deseable en el caso de que, de otro modo, compita con la macromolécula marcada por sitios de unión específicos, tales como receptores
- 30 celulares o sitios de antígenos, y por lo tanto disminuya la capacidad de obtención de imágenes o la sensibilidad de cribado. La eliminación de componentes sin reaccionar puede ser parcial, sustancialmente completa o completa. En este contexto, se entenderá que la eliminación "parcial" incluye la eliminación de cualquier cantidad de uno o más componentes sin reaccionar o no deseados, más típicamente la eliminación de hasta aproximadamente el 80%, 90% o el 95% de uno o más componentes sin reaccionar o no deseados, y la eliminación "completa" se entenderá como
- 35 la eliminación de más del 95% de uno o más componentes sin reaccionar o no deseados. Típicamente, se prefiere la eliminación de al menos el 95% de los componentes sin reaccionar o no deseados, más preferiblemente la eliminación de más de aproximadamente el 96%, 97%, 98% o el 99% de los componentes sin reaccionar o no deseados.

- 40 Por lo tanto, se entenderá que la referencia a "purificación" en este contexto significa cualquier grado de purificación, por lo que la macromolécula radiomarcada (o macromolécula "marcada" con un progenitor inactivo de un radioisótopo) después de una etapa de "purificación" contiene menos impurezas, tal como componentes sin reaccionar o no deseados del contacto, en comparación con antes de la etapa de purificación.

- 45 Cualquier método capaz de separar histona radiomarcada de componentes sin reaccionar o no deseados, tales como nanopartículas radiactivas no unidas o histona, puede usarse en una etapa de purificación. Por ejemplo, el método puede comprender lavar uno o más componentes no deseados de la histona radiomarcada, o puede comprender extraer la histona radiomarcada de uno o más componentes no deseados, o puede comprender una centrifugación a alta velocidad, o puede comprender una combinación de tales etapas.

50

#### ***Métodos para el revestimiento de compuestos de nanopartículas con histonas***

- Los compuestos de nanopartículas de radionúclidos encapsulados con carbono pueden prepararse de acuerdo con el documento de patente PCT/AU2006/000554. Se puede producir una dispersión acuosa estable de pH neutro o
- 55 ligeramente ácido de nanopartículas que comprenden radionúclido encapsulado con carbono (por ejemplo, Tc-99m) La dispersión de nanopartículas también puede contener una concentración muy baja (por ejemplo, 10 micromolar) de un tensioactivo aniónico, desoxicolato de sodio, que es compatible con y puede inyectarse en la circulación sanguínea de un sujeto vivo (véanse las Figuras 5 y 6 en el presente documento). Estas partículas pueden transportar decenas de miles o más de átomos de isótopos como la fuente de marcado, de modo que se pueden

obtener niveles muy altos de actividad específica que están muy por encima de los que se pueden obtener con los métodos tradicionales de etiquetado. Para compuestos de nanopartículas con Tc-99m como el radioisótopo encapsulado modelo, se puede hacer fácilmente una preparación típica de nanopartículas para contener entre 1 y 30 mCi en 2 ml de suspensión acuosa, según se desee. A partir de la caracterización en fase de vapor de las partículas mediante técnicas de medición de las partículas de movilidad de barrido (SMPS), se puede demostrar que esta suspensión contiene aproximadamente 50 µg de material de nanopartículas, de modo que la actividad específica se puede realizar hasta 600 mCi/mg, o por encima de 22 GBq/mg.

El proceso de encapsulación por carbono envuelve el isótopo metálico en una jaula de carbono, de modo que se aísla físicamente del contacto con su entorno externo, una propiedad especialmente valiosa para las partículas cuando se van a usar *in vivo*. El potencial de lixiviación y bio-captación de los iones metálicos radiactivos *in vivo* es virtualmente inexistente. Solo el exterior de carbono del compuesto de nanopartículas está expuesto al entorno biológico *in vivo*. Debido a que el carbono está en una forma gráfica, tiene propiedades adsorbentes naturales, y esto puede usarse como base para la adsorción física de polipéptidos seleccionados. Sin embargo, primero se requiere determinar las condiciones apropiadas que favorecerán la unión de los polipéptidos, y los siguientes estudios y ejemplos ilustran cómo se pueden determinar estas condiciones.

Los compuestos de nanopartículas son aptos para una unión de alta aidez a través de interacciones hidrófobas o de dispersión, que implican su superficie gráfica. Para que la superficie gráfica forme interacciones hidrófobas con macromoléculas, tal como los polipéptidos, el polipéptido debe poder acercarse a la superficie del grafito en un rango muy cercano, lo que a su vez requiere que se supriman las fuerzas electrostáticas repulsivas. Los inventores muestran que esta condición puede cumplirse cuando el polipéptido se presenta en las preparaciones de nanopartículas con una carga superficial neta mínima, ya sea ajustando el pH cerca del punto isoeléctrico del polipéptido, o protegiendo la carga del polipéptido con una concentración apropiada de contraiones electrolíticos. Se pueden usar experimentos de unión empíricos para establecer las condiciones de unión apropiadas.

#### Métodos de cribado

En el presente documento también se describen métodos para cribar un compuesto que modula la actividad de una o más histonas. En general, estos métodos comprenden poner en contacto la histona con un compuesto candidato en condiciones adecuadas para permitir la interacción del compuesto candidato y la histona y ensayar la actividad o pérdida de actividad de la histona.

La histona puede seleccionarse de H1, H2A, H2B, H3, H4 o H5. La histona también puede comprender una mezcla de diferentes histonas, por ejemplo, histonas de timo de ternera. En algunos aspectos se pueden usar variantes, fragmentos y análogos de una histona.

En un aspecto se proporciona un método para cribar compuestos de unión a histonas. El método utiliza la administración de una o más histonas radiomarcadas a un sujeto de ensayo, seguido de la administración de uno o más compuestos candidatos al sujeto de ensayo. Después, se toma una imagen de la histona radiomarcada y la ubicación de la histona radiomarcada permite evaluar la capacidad de los compuestos candidatos para inhibir la acumulación de histonas en un órgano tal como el pulmón.

En otro aspecto, el compuesto candidato puede administrarse al sujeto de ensayo antes o al mismo tiempo que la histona radiomarcada. Como alternativa, el compuesto candidato puede mezclarse con la histona radiomarcada antes de la administración de la mezcla al sujeto de ensayo.

Se pueden usar imágenes externas mediante métodos conocidos en la técnica, tales como tomografía computarizada de fotón único (SPECT), tomografía por emisión de positrones (PET) o gammagrafía. En otros aspectos, las histonas se pueden marcar con tintes fluorescentes, tal como FITC (isotiocianato de fluoresceína) o puntos cuánticos. En otro ejemplo, la histona puede estar marcada con un resto bioluminiscente. La ubicación y la concentración de la histona marcada se pueden determinar *in vivo*.

La formación de imágenes por cualquier modalidad conocida en la técnica puede revelar la presencia o el exceso de la histona marcada en un sitio de tejido u órgano que puede deberse a un fracaso de un compuesto candidato para inhibir la acumulación de histonas. De manera similar, una disminución en la abundancia de la histona marcada en un tejido u órgano, en comparación con una histona marcada de control en ausencia del compuesto de ensayo, indica que un compuesto candidato inhibe la histona y evita la acumulación en el tejido u órgano.

Debe observarse que cuando se inyectan por vía intravenosa, los compuestos de nanopartículas sin marcar se eliminan casi por completo de la circulación en 20 minutos mediante el sistema reticuloendotelial, es decir, las células fagocíticas, tal como las células de Kupffer del hígado. Por lo tanto, la presencia o el exceso de la histona marcada en el hígado, el bazo y la médula ósea puede indicar la rápida depuración de las nanopartículas circulantes por el sistema reticuloendotelial que puede deberse a un compuesto candidato que inhibe la unión de las histonas al pulmón, por ejemplo.

Las histonas, variantes, fragmentos y análogos de las mismas son útiles para el cribado e identificación de compuestos y agentes que interactúan con estas moléculas. En particular, los compuestos deseables son aquellos que modulan la actividad de estas moléculas. Dichos compuestos pueden ejercer un efecto modulador al inhibir la función de la histona, variantes, fragmentos y análogos de los mismos. Además, las variantes de histonas, fragmentos y análogos de los mismos son útiles para el cribado e identificación de compuestos y agentes que promueven la degradación de las histonas. Los compuestos adecuados pueden ejercer su efecto en virtud de una interacción directa (por ejemplo, unión) o indirecta. Como alternativa o adicionalmente, los compuestos adecuados pueden ejercer su efecto modulando la interacción de histonas, variantes, fragmentos y análogos de los mismos con otras proteínas o péptidos.

Los compuestos que se unen, o que de otra manera interactúan con histonas, y específicamente compuestos que modulan su actividad o promueven su degradación, pueden identificarse mediante una diversidad de métodos adecuados. Los métodos no limitantes incluyen, co-inmunoprecipitación, métodos de detección basados en inmunología tales como transferencia de Western, cromatografía de afinidad, filtración en gel, ensayos de movilidad en gel, espectroscopía de masas, purificación por afinidad en tándem, presentación de fagos, transferencia de marcadores, micromatrices de proteínas.

Además, la capacidad de los compuestos candidatos que se unen, o que de otra manera interactúan con las histonas y que modulan la actividad o promueven la degradación de las histonas, puede evaluarse por el efecto de esos compuestos candidatos sobre la función de las histonas. La función puede medirse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica.

### 30 ***Cromatografía de afinidad***

La cromatografía de afinidad se puede usar para determinar si un agente candidato o una pluralidad de agentes candidatos interactúan o se unen con una histona o una variante o fragmento de la misma. Por ejemplo, la histona, variantes, fragmentos o análogos de la misma, pueden inmovilizarse en un soporte (como la Sepharose) y los compuestos candidatos, ya sea solos o en mezclas, se pasan por la columna. Los compuestos que se unen al polipéptido de histona inmovilizado o una variante o fragmento del mismo, se pueden eluir de la columna e identificar, por ejemplo, mediante espectrometría de masas.

De esta manera, pueden identificarse proteínas u otros compuestos que no interactúan directamente con histonas, fragmentos de variantes o análogos de las mismas. Por ejemplo, un compuesto que interactúa directamente con una histona puede a su vez estar asociado con un agente que puede modular la actividad de la histona sin interacción directa con la histona. La interacción del complejo del compuesto y el agente asociado con el polipéptido de histona inmovilizado o una variante o fragmento del mismo, facilitará la identificación de compuestos que pueden modular la actividad de la histona sin interacción directa con la histona.

Los moduladores potenciales de la actividad de la histona pueden generarse para el cribado por los métodos anteriores mediante una serie de técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar métodos tales como cristalografía de rayos X y espectroscopía de resonancia magnética nuclear para modelar la estructura de histonas, fragmentos de variantes o análogos de las mismas, facilitando así el diseño de posibles agentes moduladores utilizando el modelado basado en ordenador. También se pueden usar diversas formas de química combinatoria para generar moduladores putativos.

Las histonas, variantes, fragmentos o análogos de las mismas pueden usarse en cribas de alto rendimiento para ensayar compuestos candidatos para determinar la capacidad de unirse o interactuar de otro modo con los mismos. Estos compuestos candidatos pueden cribarse adicionalmente frente a histonas funcionales, fragmentos de variantes o análogos de las mismas, para determinar el efecto del compuesto sobre la actividad enzimática.

### ***Métodos inmunológicos***

Los métodos inmunológicos pueden usarse para determinar si un agente candidato o una pluralidad de agentes candidatos interactúan o se unen con una histona o una variante o fragmento de la misma. En un aspecto, una histona o una variante o fragmento de la misma, puede ponerse en contacto con al menos un compuesto candidato antes de usar la inmunoprecipitación para determinar si un agente candidato o la pluralidad de agentes candidatos interactúan o se unen con una histona o una variante o fragmento de la misma. Usando esta técnica, al menos un compuesto candidato puede ponerse en contacto con una histona o una variante o fragmento, típicamente mezclando soluciones de cada uno. Esa mezcla (muestra) puede incubarse entonces con un anticuerpo específico para el compuesto candidato o la histona que puede inmunoprecipitarse de la solución, por ejemplo, mediante captura con una proteína de unión a anticuerpo unida a un soporte sólido. La inmunoprecipitación de una proteína mediante este método facilita la co-inmunoprecipitación de un agente asociado con esa proteína. La identificación de un agente asociado se puede establecer mediante una serie de métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, SDS-PAGE, transferencia Western y espectrometría de masas.

Los anticuerpos específicos para un compuesto candidato o una histona pueden inmovilizarse sobre un soporte. Detectar un compuesto candidato asociado con la histona típicamente implica poner en contacto el anticuerpo inmovilizado con una muestra que contiene supuestamente un compuesto candidato asociado con una histona en condiciones adecuadas para la unión entre el anticuerpo inmovilizado y la histona o compuesto candidato, y aclarar el soporte con un reactivo adecuado para eliminar la muestra no unida. Posteriormente, la muestra unida que contiene supuestamente un compuesto candidato asociado con una histona se puede eluir, por ejemplo, mediante aclarado con un desnaturalizante, y la identidad de los componentes de la muestra unida se puede establecer utilizando varios métodos conocidos en la técnica, incluidos, pero sin limitación, SDS-PAGE, transferencia Western, y espectrometría de masas.

El anticuerpo puede inmovilizarse sobre el soporte por unión directa, o unirse indirectamente al soporte a través de uno o más compuestos adicionales. Los ejemplos no limitantes de soportes adecuados incluyen placas de ensayo (por ejemplo, placas de microtitulación) o tubos de ensayo fabricados con polietileno, polipropileno o poliestireno, cloruro de polivinilo, membranas (por ejemplo, membranas de nitrocelulosa), perlas/discos (incluidas perlas magnéticas y discos) y materiales en partículas tales como papel de filtro, membrana de nitrocelulosa, Sepharose, agarosa, dextrano reticulado y otros polisacáridos.

En ciertos aspectos, la detección de un agente candidato o una pluralidad de agentes candidatos que interactúan o se unen con una histona o una variante o fragmento de la misma se realiza como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En general, el ensayo implica el revestimiento de un reactivo de captura adecuado sobre un soporte sólido, tal como los pocillos de una placa de microtitulación o una columna, fabricados a partir de un material tal como polietileno, polipropileno, poliestireno y similares. En un aspecto, se usa un anticuerpo anti-histona como reactivo de captura. En otro ejemplo, el reactivo de captura se prepara revistiendo al menos un compuesto candidato sobre el soporte sólido. En un aspecto adicional, el reactivo de captura puede ser heparina, heparán sulfato, heparán sulfato conjugado con albúmina sérica bovina, heparán sulfato proetoglucano (por ejemplo, perlecán), células de mamíferos o similares. En otro aspecto, la histona se puede usar como reactivo de captura.

El reactivo de captura puede estar unido a la superficie del soporte, por ejemplo, mediante una interacción no covalente o covalente o un enlace físico. Si se usa un enlace covalente, el agente de reticulación se puede utilizar para unir el reactivo de captura al soporte (por ejemplo, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxi-succinimida, maleimidias bifuncionales).

El soporte puede tratarse con un agente de bloqueo (por ejemplo, leche desnatada, albúmina de suero bovino, caseína, albúmina de huevo) para evitar la unión no deseada del material a los sitios en exceso en la superficie del soporte.

La muestra puede administrarse a la superficie del soporte después del revestimiento y el bloqueo. En general, la muestra se diluye a un nivel apropiado utilizando un tampón adecuado. El grado de dilución de la muestra y la selección de un tampón apropiado dependerán de factores tales como la muestra bajo análisis y el tipo de soporte y reactivo de captura utilizado en el ensayo. Estos pueden determinarse sin esfuerzo inventivo por los expertos en la técnica.

Una vez aplicada al soporte revestido con reactivo de captura, la muestra generalmente se incuba en condiciones adecuadas para maximizar la sensibilidad del ensayo y para minimizar la disociación. La incubación se puede realizar a una temperatura generalmente constante, que varía de aproximadamente 0°C a aproximadamente 40°C, y preferiblemente que varía de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C. El pH de la mezcla de incubación

- puede estar en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 7 a aproximadamente 8. En una forma de realización, la mezcla de incubación es a pH 7,4. Pueden emplearse diversos tampones para lograr y mantener el pH objetivo durante la incubación, cuyos ejemplos no limitativos incluyen Tris-fosfato, Tris-HCl, borato, fosfato, acetato y carbonato. El tiempo de incubación generalmente se asocia con la temperatura y puede ser inferior a aproximadamente 12 horas para evitar la unión no específica. Preferiblemente, el tiempo de incubación es de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 3 horas, y más preferiblemente de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 1,5 horas a temperatura ambiente.
- 10 Después de la incubación, la muestra biológica se puede eliminar del reactivo de captura inmovilizado para eliminar la muestra no unida, por ejemplo, lavando/aclarando el soporte. El pH de un tampón de lavado adecuado puede estar en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 7 a aproximadamente 8. El lavado/aclarado puede realizarse tres o más veces. El lavado/aclarado se puede realizar usando un tampón de lavado generalmente a temperaturas de aproximadamente 0°C a aproximadamente 40°C, y preferiblemente de aproximadamente 4°C a aproximadamente 30°C.

- En una etapa posterior, los componentes inmovilizados de la muestra unida al reactivo de captura pueden ponerse en contacto con un reactivo de detección. La elección del reactivo detectable puede depender de factores que incluyen el reactivo de captura utilizado y el tipo de muestra bajo análisis. Preferiblemente, las moléculas inmovilizadas de la muestra unida al reactivo de captura se ponen en contacto con un reactivo de detección a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C, y preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C. En un aspecto, las moléculas inmovilizadas de la muestra unida al reactivo de captura se ponen en contacto con un reactivo de detección a temperatura ambiente (TA) durante aproximadamente una hora. El reactivo de detección puede ser un anticuerpo. En aplicaciones en las que el reactivo detectable es un anticuerpo, es preferible un exceso molar del anticuerpo con respecto a la concentración máxima de las moléculas de la muestra inmovilizada sobre el soporte. El anticuerpo puede detectarse directa o indirectamente. El anticuerpo puede tener una etiqueta colorimétrica o una etiqueta fluorométrica. Se puede usar un anticuerpo adicional que se una al reactivo de detección. El anticuerpo adicional puede tener una etiqueta colorimétrica o una etiqueta fluorométrica.
- 20
- 25
- 30 La determinación de la presencia y los niveles de una muestra unida al reactivo de captura se puede lograr usando métodos conocidos en la técnica, y dependerá del reactivo de detección utilizado. Por ejemplo, la detección puede incluir colorimetría, quimioluminiscencia o fluorometría. La detección y las mediciones cuantitativas se pueden realizar en función de la señal derivada del reactivo o reactivos de detección en comparación con la señal de fondo derivada de las muestras de control.
- 35

#### **Tratamiento de la sepsis**

- El tratamiento de la sepsis típicamente implica el tratamiento de la causa subyacente de la afección, por ejemplo, mediante terapia con antibióticos. Si bien se han desarrollado tratamientos alternativos, como la proteína C activada (APC), estos han tenido poco impacto clínico debido a las propiedades anticoagulantes de la terapia o al modo de acción lento en relación con la rápida progresión de la sepsis.
- La toxicidad de la histona se ha identificado recientemente como un mediador de la disfunción de las células endoteliales, la insuficiencia orgánica y la muerte en la sepsis. Los inventores han descubierto que los polianiones de oligosacáridos, que tienen propiedades anticoagulantes insignificantes, pueden formar complejos con las histonas en la circulación de un animal vivo y prevenir la acumulación de histonas en los órganos. Esto proporciona la base para un tratamiento de la sepsis que típicamente implica la administración de al menos un polianión a un paciente que necesita dicho tratamiento, aunque el método de tratamiento no forma parte de la invención reivindicada.

#### **Composiciones, dosificaciones y rutas de administración**

- Solo a modo de ejemplo, el polianión o polianiones para su uso en la presente invención se pueden administrar como composiciones terapéutica o preventivamente. En una aplicación terapéutica, las composiciones se administran a un sujeto que ya padece una enfermedad (por ejemplo, sepsis), en una cantidad suficiente para resolver o detener parcialmente la enfermedad y/o sus complicaciones o para mejorar la supervivencia de un paciente.

En general, las composiciones adecuadas pueden prepararse de acuerdo con métodos que son conocidos por los

expertos en la técnica y, por consiguiente, pueden incluir un vehículo, diluyente, y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Los métodos para preparar composiciones administrables son evidentes para los expertos en la técnica, y se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 15<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa.

El polianión puede estar presente como una sal farmacéuticamente aceptable. Por "sal farmacéuticamente aceptable" se entiende aquellas sales que, dentro del alcance de un buen criterio médico, son adecuadas para su uso en contacto con tejidos de seres humanos y animales inferiores sin demasiada toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, y son proporcionales con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica.

La cantidad terapéuticamente eficaz de un polianión divulgado en el presente documento para cualquier sujeto particular dependerá de una diversidad de factores incluyendo: la gravedad de la sepsis; actividad de las composiciones empleadas; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración; la tasa de secuestro de las composiciones; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el tratamiento, junto con otros factores relacionados bien conocidos en medicina.

Un experto en la técnica podría, por experimentación rutinaria, determinar una cantidad eficaz, no tóxica de los componentes de las formulaciones que se requerirían para lograr el resultado deseado.

Generalmente, se espera que una dosificación eficaz de polianión esté en el intervalo de aproximadamente 0,0001 mg a aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal por 24 horas; típicamente, de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 750 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal por 24 horas. Más típicamente, se espera que una dosis eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 25 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal por 24 horas.

Como alternativa, la dosificación eficaz de polianión puede ser de hasta aproximadamente 500 mg/m<sup>2</sup>. Generalmente, se espera que una dosificación eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 mg/m<sup>2</sup>, preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 350 mg/m<sup>2</sup>, más preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup>, aún más preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 mg/m<sup>2</sup>, incluso más preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 mg/m<sup>2</sup>, y todavía incluso más preferiblemente de aproximadamente 75 a aproximadamente 150 mg/m<sup>2</sup>.

Además, será evidente para un experto en la técnica que la cantidad y el espaciado óptimos de las dosificaciones individuales se determinarán por la naturaleza y extensión de la sepsis que se trata, la forma, la ruta y el sitio de administración, y la naturaleza del individuo en particular que se trata. Además, dichas condiciones óptimas pueden determinarse mediante técnicas convencionales. En algunas aplicaciones terapéuticas, el tratamiento será por la duración de la sepsis, aunque el método de tratamiento no forma parte de la invención reivindicada.

También será evidente para un experto en la técnica que el transcurso óptimo de tratamiento, tal como el número de dosis del polianión administrado por hora o día durante un número definido de horas o días, puede determinarse por los expertos en la técnica usando el transcurso convencional de las pruebas de determinación de tratamiento.

En general, las composiciones adecuadas pueden prepararse de acuerdo con métodos que son conocidos por los expertos en la técnica y, por consiguiente, pueden incluir un vehículo, diluyente, y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Los modos convenientes de administración incluyen inyección (subcutánea, intravenosa, intraarterial, etc.), administración oral, intranasal o inhalación. Dependiendo de la vía de administración, la formulación y/o el polianión pueden recubrirse con un material para proteger el polianión de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar la actividad terapéutica del compuesto. El polianión también se puede administrar por  
5 vía parenteral o intraperitoneal.

Las dispersiones de uno o más polianiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, las preparaciones farmacéuticas pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

10 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (en los casos donde sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Idealmente, la composición es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y puede incluir un conservante para estabilizar la composición contra la acción contaminante de  
15 microorganismos tales como bacterias y hongos.

En un aspecto, el polianión o polianiones se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El polianión o polianiones y otros ingredientes también pueden incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente en la dieta de un individuo. Para la administración terapéutica oral, el polianión o polianiones pueden incorporarse con excipientes en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Adecuadamente, dichas composiciones y preparaciones pueden contener al menos el 1% en peso de polianión activo. El porcentaje del polianión en composiciones y preparaciones farmacéuticas puede variar, por supuesto, y, por ejemplo, puede variar convenientemente de aproximadamente el 2% a aproximadamente  
25 el 90%, de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 80%, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 75%, de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 65%; de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 60%, de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 50%, de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 45%, o de aproximadamente el 35% a aproximadamente el 45%, del peso de la unidad de dosificación. La cantidad de polianión en composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosis adecuada.

30 En otro aspecto, el polianión se puede administrar en forma de liposomas. Los liposomas generalmente se derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas, y están formados por cristales líquidos hidratados mono o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las composiciones en forma de liposomas pueden contener  
35 estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica, y en relación con esto, se hace referencia específica a: Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976), pág. 33 *et seq.*

40 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares. Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables son agua desmineralizada o destilada; solución salina; aceites de origen vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de maní o aceite de coco; aceites de silicona,  
45 incluyendo polisiloxanos, tales como metil polisiloxano, fenil polisiloxano y metilfenil polisiloxano; siliconas volátiles; aceites minerales tales como parafina líquida, parafina blanda o escualano; derivados de celulosa tales como metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica o hidroxipropilmetilcelulosa; alcoholes inferiores, por ejemplo, etanol o isopropanol; aralcoholes inferiores; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles inferiores, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina;  
50 ésteres de ácidos grasos tales como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo u oleato de etilo; polivinilpirrolidona; agar; carragenano; goma de tragacanto o goma arábiga, y vaselina. Típicamente, el vehículo o vehículos formarán del 10% al 99,9% en peso de las composiciones.

El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en  
55 la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el polianión, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas y en los métodos de tratamiento y profilaxis. Pueden incorporarse también compuestos activos suplementarios en las composiciones de acuerdo con la presente invención. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La "forma de unidad de dosificación" como se usa en el presente documento se

refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el individuo a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de polianión o polianiones que se calcula para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. El polianión o polianiones pueden formularse para una administración conveniente y eficaz en cantidades eficaces con un vehículo farmacéuticamente  
5 aceptable adecuado en una unidad de dosificación aceptable. En el caso de composiciones que contienen principios activos complementarios, las dosis se determinan por referencia a la dosis habitual y la forma de administración de dichos ingredientes.

En una forma de realización, el vehículo puede ser un vehículo administrable por vía oral.

10 Otra forma de una composición farmacéutica es una forma de dosificación formulada como gránulos recubiertos entéricamente, comprimidos o cápsulas adecuadas para la administración oral.

También se incluyen en el alcance de esta invención formulaciones de liberación retardada.

15 El polianión también se puede administrar en forma de un "profármaco". Un profármaco es una forma inactiva de un compuesto que se transforma *in vivo* en la forma activa. Los profármacos adecuados incluyen ésteres, ésteres de fosfonato, etc., de la forma activa del polianión.

20 Algunos ejemplos de vehículos, diluyentes, excipientes y adyuvantes adecuados para su uso oral incluyen aceite de cacahuete, parafina líquida, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato sódico, goma de acacia, goma de tragacanto, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, gelatina y lecitina. Además, estas formulaciones orales pueden contener agentes saporíferos y colorantes adecuados. Cuando se usan en forma de cápsula, las cápsulas pueden recubrirse con compuestos tales como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, que retrasan la  
25 desintegración.

En un aspecto, el compuesto se puede administrar por inyección. En el caso de soluciones inyectables, el vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez  
30 apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr incluyendo diversos agentes antibacterianos y/o antifúngicos. Los agentes adecuados se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, alcohol bencílico, ácido ascórbico, tiomerosal y similares. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el polianión en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el análogo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente.

45 Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas, y similares, también pueden contener lo siguiente: una aglutinante, tal como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina, o un agente saporífero tal como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma de unidad de dosificación es una cápsula,  
50 puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Pueden estar presentes otros materiales diversos como revestimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas se pueden cubrir con laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el análogo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un tinte y saborizante tal como aroma a cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de  
55 cualquier forma de unidad de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el análogo se puede incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir además un tampón adecuado para minimizar la hidrólisis ácida. Los

agentes de agente tampón adecuados se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, fosfatos, citratos, carbonatos y mezclas de los mismos.

- 5 Se pueden realizar administraciones únicas o múltiples de las composiciones farmacéuticas. Un experto en la técnica podría, mediante experimentación rutinaria, determinar niveles de dosificación eficaces y no tóxicos del polianión y/o un patrón de administración que sería adecuado para tratar la sepsis.

### **Regímenes de combinación**

- 10 Las ventajas terapéuticas pueden realizarse a través de regímenes de combinación. Los expertos en la materia apreciarán que los polianiones descritos en el presente documento pueden administrarse como parte de un enfoque de terapia de combinación para el tratamiento de la sepsis, aunque los métodos de tratamiento no forman parte de la invención reivindicada. En la terapia de combinación, los agentes respectivos pueden administrarse simultánea o secuencialmente en cualquier orden. Cuando se administran secuencialmente, se puede preferir que los  
15 componentes se administren por la misma ruta.

Como alternativa, los componentes pueden formularse juntos en una sola unidad de dosificación como un producto de combinación. Los agentes adecuados que pueden usarse en combinación con las composiciones de la presente invención serán conocidos por los expertos en la técnica.

- 20 Los usos en los métodos de tratamiento descritos en el presente documento pueden aplicarse junto con la terapia convencional. La terapia convencional también puede comprender la administración de agentes antiinflamatorios, agentes antibióticos, agentes antivirales, agentes antifúngicos u otras formas de intervención médica, por ejemplo, el uso de APC. Esto no forma parte de la invención reivindicada.

- 25 Los ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen esteroides, corticosteroides, inhibidores de COX-2, agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aspirina o cualquier combinación de los mismos.

- 30 Los ejemplos de agentes antibióticos incluyen aminoglucósidos, ansamicinas, carbacefems, carbapenems, cefalosporinas, glucopéptidos, lincosamidas, macrólidos, monobactamas, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas.

- 35 Los ejemplos de agentes antivirales incluyen inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (por ejemplo, análogos de los nucleósidos), inhibidores de la proteasa e inhibidores análogos nucleotídicos de la transcriptasa inversa.

Los ejemplos de agentes antifúngicos incluyen imidazoles, triazoles, tiazoles, alilaminas y equinocandinas.

- 40 Los polianiones divulgados en el presente documento pueden administrarse terapéutica o preventivamente. En una aplicación terapéutica, los compuestos y las composiciones se administran a un paciente que ya padece sepsis, en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, la sepsis y sus síntomas y/o complicaciones. El compuesto o la composición debe proporcionar una cantidad del compuesto activo suficiente para tratar al paciente de manera eficaz.

- 45 Los polianiones divulgados en el presente documento pueden administrarse a pacientes antes de que la sepsis sea clínicamente evidente, por ejemplo, en pacientes con riesgo de desarrollar sepsis. Sin embargo, los métodos de tratamiento practicados en el cuerpo humano o animal no forman parte de la invención reivindicada.

### **Vehículos, diluyentes, excipientes y adyuvantes**

- 50 Los vehículos, diluyentes, excipientes y adyuvantes deben ser "aceptables" en términos de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición, y no ser perjudiciales para el receptor de los mismos. Dichos vehículos, diluyentes, excipientes y adyuvantes se pueden usar para mejorar la integridad y la semivida de las composiciones de la presente invención. Estos también se pueden usar para mejorar o proteger las actividades biológicas de las  
55 composiciones de la presente invención.

Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables son agua desmineralizada o destilada; solución salina; aceites de origen vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de maní o aceite de coco; aceites de silicona,

- incluyendo polisiloxanos, tales como metil polisiloxano, fenil polisiloxano y metilfenil polisiloxano; siliconas volátiles; aceites minerales tales como parafina líquida, parafina blanda o escualano; derivados de celulosa tales como metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica o hidroxipropilmetilcelulosa; alcanoles inferiores, por ejemplo, etanol o isopropanol; aralcanoles inferiores; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles inferiores, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina; ésteres de ácidos grasos tales como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo u oleato de etilo; polivinilpirrolidona; agar; goma de tragacanto o goma arábiga, y vaselina. Típicamente, el vehículo o vehículos formarán del 10% al 99,9% en peso de las composiciones.
- 10 Los vehículos también pueden incluir proteínas de fusión o compuestos químicos que están unidos covalentemente a los compuestos de la presente invención. Dichos vehículos biológicos y químicos se pueden usar para mejorar la administración de los compuestos a los objetivos o mejorar las actividades terapéuticas de los compuestos. Los métodos para la producción de proteínas de fusión se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel et al (In: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) y Sambrook et al (In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Tercera Edición 2001).

- Las composiciones de la invención pueden estar en una forma adecuada para la administración por inyección, en forma de una formulación adecuada para ingestión oral (tales como cápsulas, comprimidos, comprimidos masticables, elixires, por ejemplo), en forma de un ungüento, crema o loción adecuada para la administración tópica, en una forma adecuada para la administración como una gota ocular, en forma de aerosol adecuada para la administración por inhalación, tal como por inhalación intranasal o inhalación oral, en una forma adecuada para la administración parenteral, es decir, inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa.
- 20 Para la administración como solución o suspensión inyectable, los diluyentes o vehículos no tóxicos parenteralmente aceptables pueden incluir solución de Ringer, solución salina isotónica, solución salina tamponada con fosfato, etanol y 1,2 propilenglicol.

- Algunos ejemplos de vehículos, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes adecuados para su uso oral incluyen aceite de cacahuete, parafina líquida, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato sódico, goma de acacia, goma de tragacanto, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, gelatina y lecitina. Además, estas formulaciones orales pueden contener agentes saporíferos y colorantes adecuados. Cuando se usan en forma de cápsula, las cápsulas pueden recubrirse con compuestos tales como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, que retrasan la desintegración.

- 30 Algunos ejemplos de vehículos, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes adecuados para su uso oral incluyen aceite de cacahuete, parafina líquida, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato sódico, goma de acacia, goma de tragacanto, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, gelatina y lecitina. Además, estas formulaciones orales pueden contener agentes saporíferos y colorantes adecuados. Cuando se usan en forma de cápsula, las cápsulas pueden recubrirse con compuestos tales como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, que retrasan la desintegración.
- 35 Las formas sólidas para administración oral pueden contener aglutinantes aceptables en la práctica farmacéutica humana y veterinaria, edulcorantes, agentes desintegrantes, diluyentes, saporíferos, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes de retardo de tiempo. Los aglutinantes adecuados incluyen goma arábiga, gelatina, almidón de maíz, goma de tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa o polietilenglicol. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes desintegrantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma guar, goma xantana, bentonita, ácido alginico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato de calcio, silicato de calcio o fosfato dicálcico. Los agentes saporíferos adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, aroma de cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, zeína, laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfa-tocóferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito de sodio. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Los agentes de retardo de tiempo adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.
- 40 Las formas sólidas para administración oral pueden contener aglutinantes aceptables en la práctica farmacéutica humana y veterinaria, edulcorantes, agentes desintegrantes, diluyentes, saporíferos, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes de retardo de tiempo. Los aglutinantes adecuados incluyen goma arábiga, gelatina, almidón de maíz, goma de tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa o polietilenglicol. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes desintegrantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma guar, goma xantana, bentonita, ácido alginico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato de calcio, silicato de calcio o fosfato dicálcico. Los agentes saporíferos adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, aroma de cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, zeína, laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfa-tocóferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito de sodio. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Los agentes de retardo de tiempo adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.
- 45 Las formas sólidas para administración oral pueden contener aglutinantes aceptables en la práctica farmacéutica humana y veterinaria, edulcorantes, agentes desintegrantes, diluyentes, saporíferos, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes de retardo de tiempo. Los aglutinantes adecuados incluyen goma arábiga, gelatina, almidón de maíz, goma de tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa o polietilenglicol. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes desintegrantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma guar, goma xantana, bentonita, ácido alginico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato de calcio, silicato de calcio o fosfato dicálcico. Los agentes saporíferos adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, aroma de cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, zeína, laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfa-tocóferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito de sodio. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Los agentes de retardo de tiempo adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.
- 50 Las formas líquidas para administración oral pueden contener, además de los agentes anteriores, un vehículo líquido. Los vehículos líquidos adecuados incluyen agua, aceites tales como aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de maní, aceite de coco, parafina líquida, etilenglicol, polietilenglicol, etanol, propanol, isopropanol, glicerol, alcoholes grasos, triglicéridos o mezclas de los mismos.
- 55 Las suspensiones para administración oral pueden comprender además agentes dispersantes y/o agentes de suspensión. Los agentes de suspensión adecuados incluyen carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, poli-vinil-pirrolidona, alginato de sodio o alcohol acetílico. Los agentes dispersantes adecuados incluyen lecitina, ésteres de polioxietileno de ácidos grasos tales como ácido esteárico, mono- o di-oleato, estearato o laurato de polioxietileno sorbitol, mono- o di-oleato, estearato o laurato de polioxietileno sorbitol, y

similares. Las emulsiones para administración oral pueden comprender además uno o más agentes emulsionantes. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen agentes dispersantes como se ha ilustrado anteriormente, o gomas naturales tales como goma guar, goma arábiga o goma tragacanto.

## 5 Programación de las terapias

- Los expertos en la técnica apreciarán que los polianiones pueden administrarse como un agente único o como parte de un enfoque de terapia de combinación para el tratamiento de la sepsis en el momento del diagnóstico o posteriormente, por ejemplo, como tratamiento de seguimiento o terapia de consolidación, como complemento a las terapias actualmente disponibles para la sepsis. Los pacientes que se sabe que tienen un alto riesgo de sepsis también pueden tratarse con polianiones no tóxicos como parte de la profilaxis, por ejemplo, junto con los antibióticos, contra el desarrollo de la sepsis. Sin embargo, esto se describe solo con fines ilustrativos; los métodos de tratamiento practicados en el cuerpo humano o animal no forman parte de la invención reivindicada.
- 15 Los polianiones para su uso de la invención junto con otros polianiones descritos en el presente documento solo a modo de ejemplo ahora se describirán con más detalle, solo a modo de ilustración, con respecto a los siguientes ejemplos. Los ejemplos pretenden servir para ilustrar esta invención y no deben interpretarse como limitantes de la generalidad de la divulgación de la descripción a lo largo de esta memoria descriptiva.

## 20 Ejemplos

### Ejemplo 1: Inhibición por diferentes polianiones de la acción citotóxica de las histonas en células endoteliales humanas

- 25 Se evaluaron inicialmente diferentes concentraciones de histonas de timo de ternera para determinar su toxicidad para las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y las células endoteliales microvasculares humanas (HMEC). Se dispensaron suspensiones de HUVEC/HMEC en Medio199/suero de ternera fetal al 20% (FCS) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos ( $1 \times 10^5$  células/pocillo en 50  $\mu$ l de medio). Después, se añadieron histonas de timo de ternera (50  $\mu$ l/pocillo en M199/FCS al 20%) para dar una concentración final de 100-800  $\mu$ g/ml
- 30 seguido de 25  $\mu$ l/pocillo de Calceína-AM en PBS (concentración final de 0,04  $\mu$ M) y 25  $\mu$ l/pocillo de yoduro de propidio (PI) en PBS (concentración final 2,5  $\mu$ g/ml). Cada placa de 96 pocillos se incubó a 37°C durante 60 min en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%, se puso en hielo y se analizó el contenido de cada pocillo mediante citometría de flujo para detectar células viables y muertas. Las células viables se detectaron como Calceína-AM-brillantes y PI-tenues y las células muertas como Calceína-AM-tenues y PI-brillantes. La **Figura 1** representa un ensayo de
- 35 viabilidad típico que compara HUVEC cultivadas en solitario (9,15% muertas, 78,6% viables) con HUVEC cultivadas durante 60 minutos con 200  $\mu$ g/ml de histonas de timo de ternera (50,4% muertas, 35,6% viables). La toxicidad de las histonas de timo de ternera para HUVEC y HMEC se muestra en detalle en la **Figura 2**, siendo la toxicidad de las histonas para HUVEC (**Figura 2A**) y HMEC (**Figura 2B**) altamente dependiente de la concentración, aunque HMEC fueron más resistentes a la toxicidad de las histonas que HUVEC. Por lo tanto, a 100  $\mu$ g/ml, las histonas destruyeron
- 40 el 15-20% de las HUVEC, pero no tuvieron efecto en la viabilidad de las HMEC, mientras que a 800  $\mu$ g/ml, las histonas destruyeron >85% de las HUVEC y -55% de las HMEC (**Figura 1**). En experimentos de inhibición posteriores, se utilizaron histonas de timo de ternera a 200  $\mu$ g/ml para HUVEC y 400  $\mu$ g/ml para HMEC, dando como resultado estas concentraciones -50% de destrucción de ambas poblaciones de células endoteliales.
- 45 En los experimentos de inhibición, el inhibidor (concentración final que varía de 1,6-100  $\mu$ g/ml) se mezcló con histonas de timo de ternera (concentración final 200 o 400  $\mu$ g/ml) antes de la adición de HUVEC/HMEC, Calceína-AM y PI a cada pocillo. Se encontró que el sulfato de maltotriosa y el sulfato de maltopentosa eran potentes inhibidores de la citotoxicidad de las histonas para HUVEC, inhibiendo completamente la toxicidad de las histonas a 100  $\mu$ g/ml y aún siendo altamente eficaces a 25  $\mu$ g/ml (**Figuras 3 y 4**). Algunos de los datos de citometría de flujo
- 50 primarios para el sulfato de maltotriosa se presentan en la **Figura 5** para destacar aún más la potente actividad inhibitoria de este trisacárido sulfatado. En contraste, el disacárido sulfato de maltosa fue un inhibidor débil de la citotoxicidad de las histonas (**Figuras 3 y 4**), lo que indica que con la serie de maltosa de polianiones, la longitud de la cadena de oligosacáridos desempeña un papel importante en la actividad inhibitoria. El sulfato de isomaltotriosa (glucosa ligada a  $\alpha$ 1-6), sin embargo, fue un inhibidor menos activo que el sulfato de maltotriosa (glucosa ligada a
- 55  $\alpha$ 1-4), lo que sugiere que el enlace del azúcar también puede influir en la actividad inhibitoria (**Figura 3**). Sin embargo, el sulfato de  $\beta$ -ciclodextrina cíclica (heptaglucosa ligada a  $\alpha$ 1-4 cíclica) fue casi tan activo como las moléculas de sulfato de maltotriosa lineal y sulfato de maltopentosa (**Figura 3**).

Utilizando HMEC como la diana celular endotelial, se observaron efectos inhibidores similares del sulfato de

maltotriosa (**Figura 6**) y los otros oligosacáridos sulfatados (**Tabla 1**) sobre la toxicidad de las histonas. De hecho, en la Tabla 1 se muestra un análisis más detallado de la actividad inhibitoria de un rango de polianiones sobre la toxicidad de las histonas, utilizando HMEC como la célula endotelial objetivo.

5 **Tabla 1 Capacidad de diferentes polianiones para inhibir la destrucción por las histonas de HMEC**

Compuesto	% de destrucción por histonas $\pm$ SEM*	
Celobiosa SO <sub>4</sub>	<b>6,9</b>	<b><math>\pm</math>3,3**</b>
Sacarosa octasulfato	43,5	$\pm$ 4,0
Maltosa SO <sub>4</sub>	77,1	$\pm$ 4,7
Maltitol SO <sub>4</sub>	<b>19,6</b>	<b><math>\pm</math>3,9</b>
Maltotriosa SO <sub>4</sub>	<b>17,4</b>	<b><math>\pm</math>2,8</b>
Isomaltotriosa SO <sub>4</sub>	49,5	$\pm$ 5,4
Rafinosa SO <sub>4</sub>	<b>18,0</b>	<b><math>\pm</math>3,0</b>
Panosa SO <sub>4</sub>	<b>9,3</b>	<b><math>\pm</math>0,5</b>
Propanil <i>bis</i> -gluconamida SO <sub>4</sub>	27,8	$\pm$ 1,5
$\beta$ -ciclodextrina carboxilada	105,8	$\pm$ 19,9
$\beta$ -ciclodextrina SO <sub>4</sub>	<b>11,7</b>	<b><math>\pm</math>2,9</b>
Heparina	<b>2,4</b>	<b><math>\pm</math>2,1</b>
Heparina <i>N</i> -acetilada	24,8	$\pm$ 2,7
Heparina dividida con glicol	<b>0</b>	<b><math>\pm</math>1,9</b>
Heparina <i>N</i> -acetilada dividida con glicol	<b>0</b>	<b><math>\pm</math>3,1</b>
Enoxaparina	<b>9,1</b>	<b><math>\pm</math>5,6</b>
Enoxaparina dividida con glicol	<b>0,7</b>	<b><math>\pm</math>3,3</b>
LMWH (3 kDa) dividida con glicol	<b>7,2</b>	<b><math>\pm</math>1,3</b>

\* Los compuestos ensayados a 50  $\mu$ g/ml para determinar su capacidad para inhibir la citotoxicidad de las histonas de timo de ternera (400  $\mu$ g/ml) para HMEC.  
 \*\* Los valores en negrita y cursiva representan compuestos que inhiben la toxicidad de las histonas en >80%.  
 HMEC = células endoteliales microvasculares humanas.  
 LMWH = heparina de bajo peso molecular.

Diferentes disacáridos sulfatados difirieron en su actividad inhibitoria, siendo el sulfato de celobiosa (glucosa ligada a  $\beta$ 1-4) un potente inhibidor de la toxicidad de las histonas mientras que el sulfato de maltosa (glucosa ligada a  $\alpha$ 1-4) y octasulfato de sacarosa (fructosa ligada a glucosa  $\beta$ 1-4) fueron inhibidores más débiles (Tabla 1). Sin embargo, la actividad inhibitoria del maltitol, una forma de maltosa de anillo abierto, fue mayor que la maltosa. Los trisacáridos sulfatados también variaron en su actividad inhibitoria, siendo la maltotriosa sulfatada, la rafinosa y la panosa más activas que la isomaltotriosa sulfatada. El análisis también reveló que las moléculas de glucosa unidas a sulfato presentan alguna actividad inhibitoria (por ejemplo, propanil *bis*-gluconamida SO<sub>4</sub>),  $\beta$ -ciclodextrina sulfatada está activa, pero  $\beta$ -ciclodextrina carboxilada no, y la heparina, heparina de bajo peso molecular y algunas variantes químicas (por ejemplo, *N*-desacetiladas, divididas con glicol) están activas (Tabla 1).

Estudios adicionales revelaron que la citotoxicidad de las histonas no depende del heparán sulfato de la superficie celular. Así, el tratamiento de HMEC con heparinasa plaquetaria humana (4  $\mu$ g/ml, 37°C, 1 h) o heparitinasa I, II y III de *Flavobacterium heparinum* (0,25 unidades/ml, 37°C, 1 h), procedimientos enzimáticos que eliminan el heparán sulfato de la superficie celular, no tuvo ningún efecto sobre la susceptibilidad de las HMEC con respecto a la citotoxicidad de las histonas (Figura 7). De manera similar, la comparación de células de ovario de hámster chino de tipo silvestre (CHO-K1) y una variante deficiente en heparán sulfato de esta línea celular (pgsA-745), reveló que ambas líneas celulares son igualmente susceptibles a la citotoxicidad de las histonas (Figura 8).

## 25 Ejemplo 2: Las histonas inyectadas por vía intravenosa se acumulan en los pulmones de los conejos

Las histonas de timo de ternera se marcaron radiactivamente por adsorción sobre la superficie de nanopartículas de Tc99m. Una suspensión coloidal acuosa (3 ml) de nanopartículas de Tc99m (aproximadamente 50  $\mu$ g; 4 mCi) se trató con histonas (10  $\mu$ g/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las histonas radiomarcadas se inyectaron en una vena de la oreja de un conejo anestesiado colocado en una cámara gamma, y se obtuvieron imágenes dinámicas como una serie de adquisiciones de 30 segundos, comenzando desde el inicio de la inyección. Las imágenes en la **Figura 9A** muestran una acumulación rápida y selectiva de histonas en el pulmón, en consonancia con la localización pulmonar del daño tisular inducido por histonas. Nanopartículas radiomarcadas sin histonas unidas localizadas en el hígado, el bazo y la médula ósea (véase la **Figura 9B**), como se espera para la rápida

depuración de partículas extrañas en circulación por el sistema reticuloendotelial.

**Ejemplo 3: Inhibición competitiva de la acumulación de histonas en el pulmón.**

5 Las histonas de timo de ternera se marcaron radiactivamente por adsorción sobre la superficie de nanopartículas de Tc99m. Esta preparación radiomarcada se dividió luego por la mitad. La primera mitad se inyectó en una vena de la oreja de un conejo anestesiado de control colocado en una cámara gamma, y se obtuvieron imágenes dinámicas como una serie de adquisiciones de 30 segundos, comenzando desde el inicio de la inyección. Como en el Ejemplo 2 anterior, las imágenes en la **Figura 10A** muestran una acumulación rápida y selectiva de histonas radiomarcadas en el pulmón del conejo de control. La segunda mitad de la preparación de histonas radiomarcadas se inyectó en una vena de la oreja de un conejo anestesiado al que se había inyectado por vía intravenosa 15 minutos antes 15 mg/kg de maltohexaosa sulfato de sodio. Las imágenes gamma de este conejo pretratado desde el inicio de la inyección de radiomarcado mostraron que la acumulación de histonas radiomarcadas en el pulmón estaba bloqueada (**Figura 10B** La histona radiomarcada pasó a través de los pulmones y se localizó en el hígado y el bazo.

15 **Ejemplo 4: Bloqueo de la acumulación de histonas en pulmones de conejo por sulfato de maltotetraosa.**

Se inyectó una preparación de histona radiomarcada en una vena de la oreja de un conejo anestesiado al que se había inyectado por vía intravenosa 15 minutos antes 15 mg/kg de maltotetraosa sulfato de sodio. La imagen gamma de este conejo pretratado (**Figura 11**) desde el inicio de la inyección de radiomarcado mostró que la acumulación de histonas radiomarcadas en los pulmones estaba bloqueada; la histona radiomarcada pasó a través de los pulmones sin unirse y se localizó en el hígado y el bazo. Las tramas 1-4 de la **Figura 11** son adquisiciones de 30 segundos, mientras que las tramas 5-8 son adquisiciones de 60 segundos.

25 **Ejemplo 5: Bloqueo de la acumulación de histonas en pulmones de conejo por sulfato de celobiosa**

Se inyectó una preparación de histona radiomarcada en una vena de la oreja de un conejo anestesiado al que se había inyectado por vía intravenosa 15 minutos antes 15 mg/kg de celobiosa sulfato de sodio. La imagen gamma de este conejo pretratado (**Figura 12**) desde el inicio de la inyección de radiomarcado mostró que la acumulación de histonas radiomarcadas en los pulmones estaba bloqueada; la histona radiomarcada pasó a través de los pulmones sin unirse y se localizó en el hígado y el bazo. Las tramas 1-4 de la **Figura 12** son adquisiciones de cámaras gamma de 30 segundos.

35 **Ejemplo 6: Estudio de sepsis inducida por LPS en ratones**

Se realizó un estudio para evaluar la eficacia *in vivo* de los artículos de ensayo 1 (sulfato de maltotriosa; TA1), 2 (sulfato de celobiosa; TA2) y 3 (heparina; TA3) en un modelo de sepsis de ratón inducido por lipopolisacárido (LPS). La endotoxemia se indujo mediante inyección intraperitoneal (i.p.) con LPS el día 1. Los artículos de ensayo se administraron conjuntamente i.p. el día 1, y luego se dosificaron a diario i.p. durante 2 días más. Los artículos de ensayo 1 y 2 se evaluaron a 2 concentraciones de dosis, y el artículo de ensayo 3 a una concentración, como se muestra en la **Tabla 2** a continuación.

**Tabla 2:**

Grupo	Tratamiento	Nivel de dosis (masa/inyección)	Vía de dosis	Número de animales
1	vehículo de control (PBS)	-	i.p.	8 hembras
2	artículo de ensayo 1	dosis <i>alta</i> 100 mg/kg (inicial + 24 desde la dosis anterior d2 y d3)	i.p.	8 hembras
3	artículo de ensayo 1	dosis <i>baja</i> 15 mg/kg (inicial + 24 desde la dosis anterior d2 y d3)	i.p.	8 hembras
4	artículo de ensayo 2	dosis <i>alta</i> 100 mg/kg (inicial + 24 desde la dosis anterior d2 y d3)	i.p.	8 hembras
5	artículo de ensayo 2	dosis <i>baja</i> 15 mg/kg (inicial + 24 desde la dosis anterior d2 y d3)	i.p.	8 hembras
6	artículo de ensayo 3	dosis <i>baja</i> 1,1 mg/kg (inicial + 24 desde la dosis anterior d2 y d3)	i.p.	8 hembras

45 **Resultados:** Los tiempos hasta que los animales fueron encontrados muertos o tuvieron que ser sacrificados, se

muestran en el gráfico de Kaplan-Meier en la **Figura 13**. La dosis alta (100 mg/kg) de sulfato de maltotriosa (TA1) utilizada en este estudio pareció producir cierta toxicidad (grupo de muertes) después de la tercera dosis, pero la dosis baja (15 mg/kg) fue mejor tolerada. El sulfato de celobiosa (TA2) en ambas dosis fue bien tolerado, al igual que la dosis baja elegida para la heparina (TA3; 1,1 mg/kg). Los gráficos de Kaplan-Meier en la **Figura 13** indicaron que se obtuvo una supervivencia extendida para la dosis baja de sulfato de maltotriosa (TA1) y ambas dosis de sulfato de celobiosa (TA2). En el caso de la heparina (TA3), no hubo ningún cambio aparente en el gráfico de supervivencia en comparación con el control (véase la **Figura 13**).

REIVINDICACIONES

1. Un polianión para su uso en un método para tratar sepsis inhibiendo la actividad citotóxica de histonas extracelulares en un sujeto, en el que el polianión no tiene una actividad anticoagulante sustancial, de modo que el tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial (PTT), el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), el tiempo de coagulación de la trombina (TCT), o el tiempo de coagulación activada (ACT) en un 0% a un 10% del intervalo normal; y en el que el polianión es un oligosacárido polianiónico que tiene la estructura general (I):



en la que A y B son cada uno independientemente un monosacárido cíclico o un monosacárido desoxi cíclico;

15 D es un monosacárido cíclico, un monosacárido desoxi cíclico, un monosacárido de anillo abierto. o un alcohol de azúcar;

n es un número entero seleccionado de 0, 1 y 2; y

20 en la que cada uno del monosacárido cíclico, el monosacárido desoxi cíclico, el monosacárido de anillo abierto, o el alcohol de azúcar está independientemente sustituido opcionalmente con  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $OPO_3^-$ , un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, o un aralquilo opcionalmente sustituido; y

en la que el oligosacárido polianiónico incluye al menos dos sustituyentes aniónicos seleccionados del grupo que consiste en  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$  y  $OPO_3^-$ .

2. El polianión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el monosacárido cíclico se selecciona del grupo que consiste en glucosa, galactosa, fructosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, manosa, gulosa, idosa, talosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, sorbosa, tagatosa y sedoheptulosa.

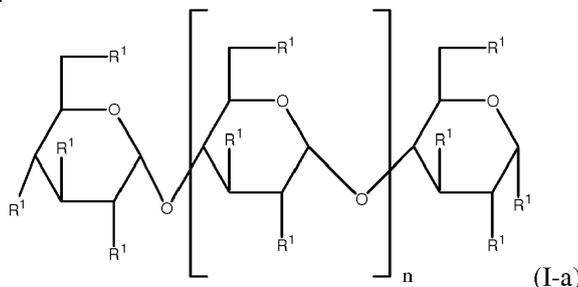
3. El polianión para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el monosacárido cíclico se selecciona del grupo que consiste en glucosa, galactosa y fructosa.

4. El polianión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el monosacárido desoxi cíclico se selecciona del grupo que consiste en fucosa, desoxirribosa y ramnosa.

5. El polianión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en glicol, glicerol, eritritol, treitol, ribitol, arabitol, xilitol, sorbitol (glucitol), manitol, dulcitol (galactitol), iditol y fucitol.

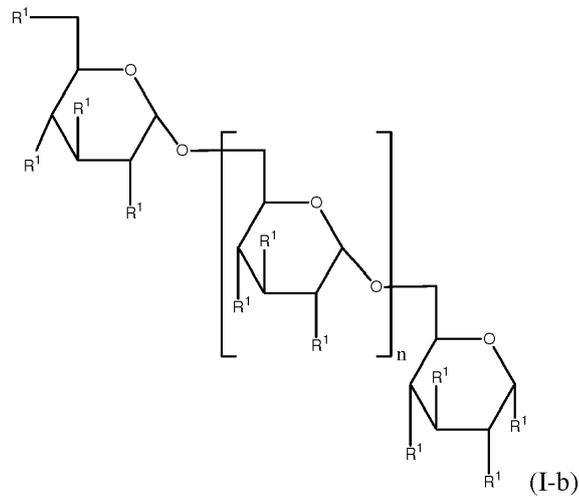
6. El polianión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el monosacárido de anillo abierto se selecciona del grupo que consiste en glucosa, galactosa, fructosa, eritrosa, treosa, eritrolulosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, manosa, gulosa, idosa, talosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, sorbosa, tagatosa y sedoheptulosa.

7. El polianión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligosacárido polianiónico tiene la estructura general (I-a):



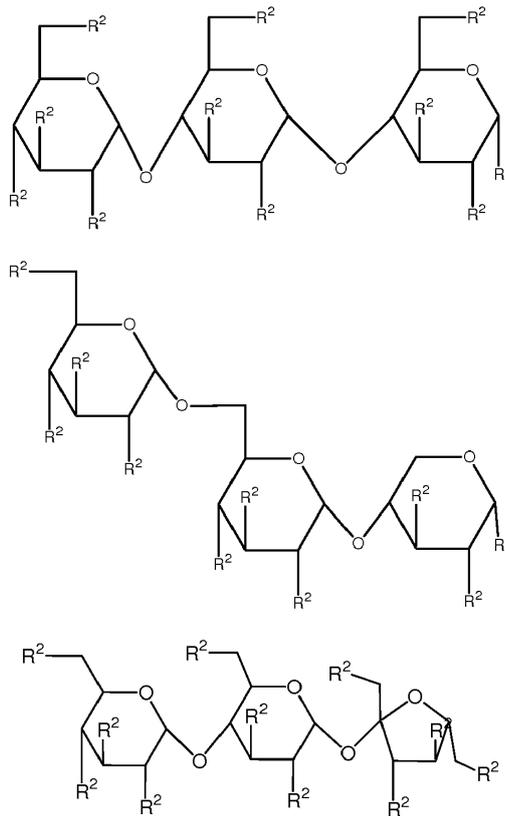
45 en la que cada  $R^1$  se selecciona independientemente de  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $OPO_3^-$ , OH o H; y n es un número entero entre 0, 1 y 2; y en la que al menos dos de  $R^1$  se seleccionan del grupo que consiste en  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ , y  $OPO_3^-$ .

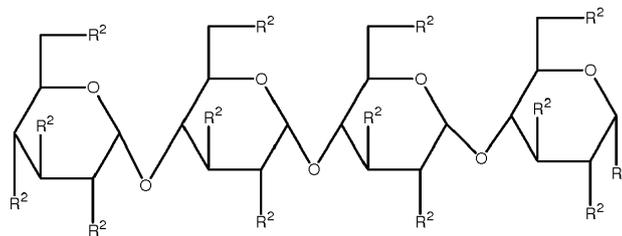
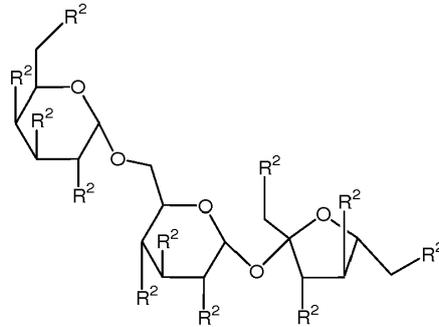
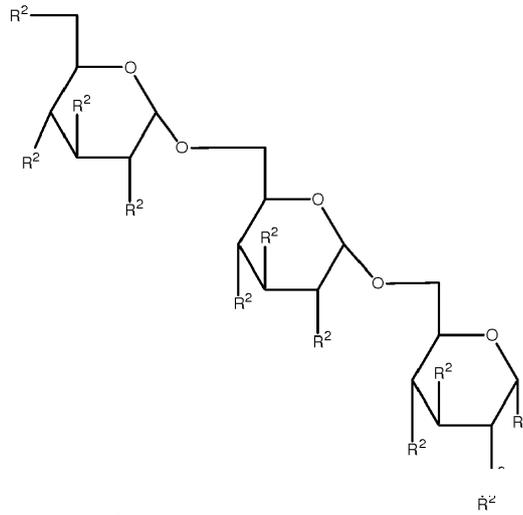
8. El polianión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligosacárido polianiónico tiene la estructura general (I-b):



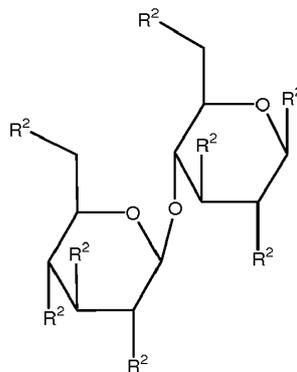
donde cada  $R^1$  se selecciona independientemente de  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ ,  $OPO_3^-$ ,  $OH$  o  $H$ ; y  $n$  es un número entero entre 0, 1 y 2; y en la que al menos dos de  $R^1$  se seleccionan del grupo que consiste en  $OSO_3^-$ ,  $COO^-$ , y  $OPO_3^-$ .

- 5 9. El polianión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligosacárido polianiónico se selecciona del grupo que consiste en:





5  
y



en los que cada R<sup>2</sup> se selecciona independientemente de OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, COO<sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OH o H; y en los que al menos dos de R<sup>2</sup> se seleccionan del grupo que consiste en OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, COO<sup>-</sup>, y OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

10

10. El polianión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligosacárido polianiónico se selecciona del grupo que consiste en sulfato de maltosa, sulfato de maltotriosa, sulfato de maltotetraosa, sulfato de

panosa, sulfato de isomaltotriosa, sulfato de erlosa, sulfato de celobiosa y sulfato de rafinosa.

11. El polianión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligosacárido polianiónico es sulfato de celobiosa.

5

Ensayo de citometría de flujo para determinar la citotoxicidad de la histona para HUVEC

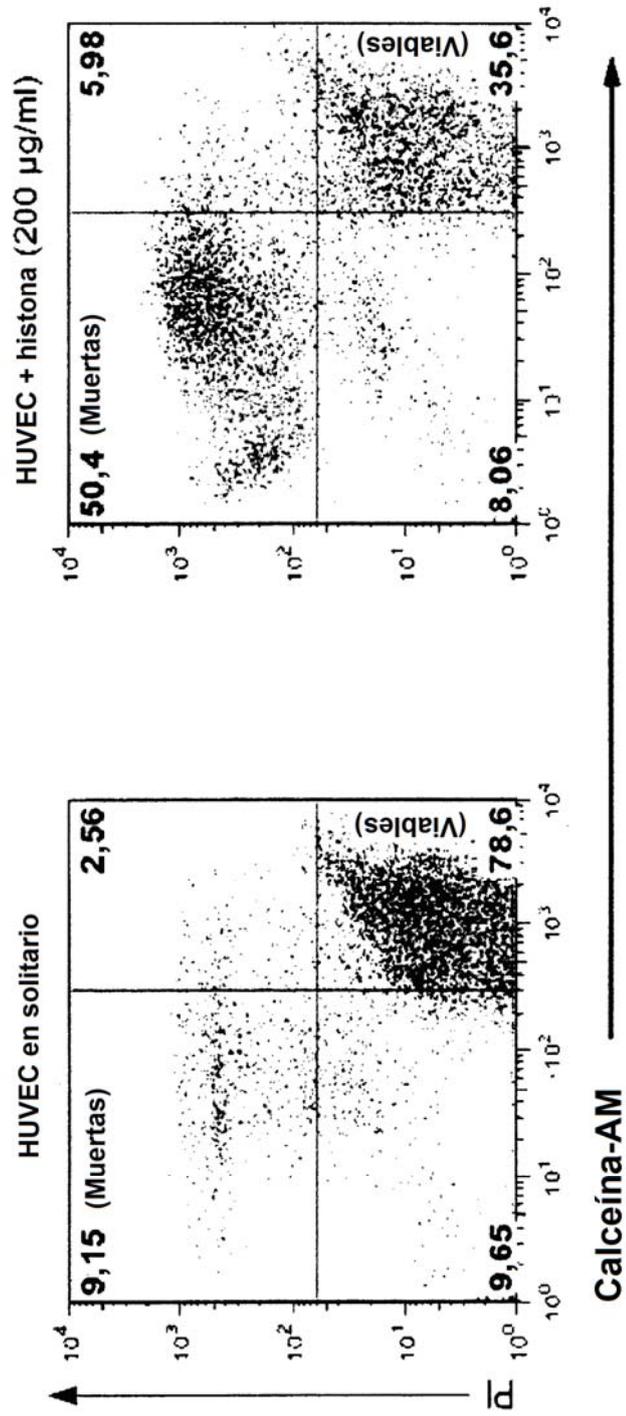


Figura 1

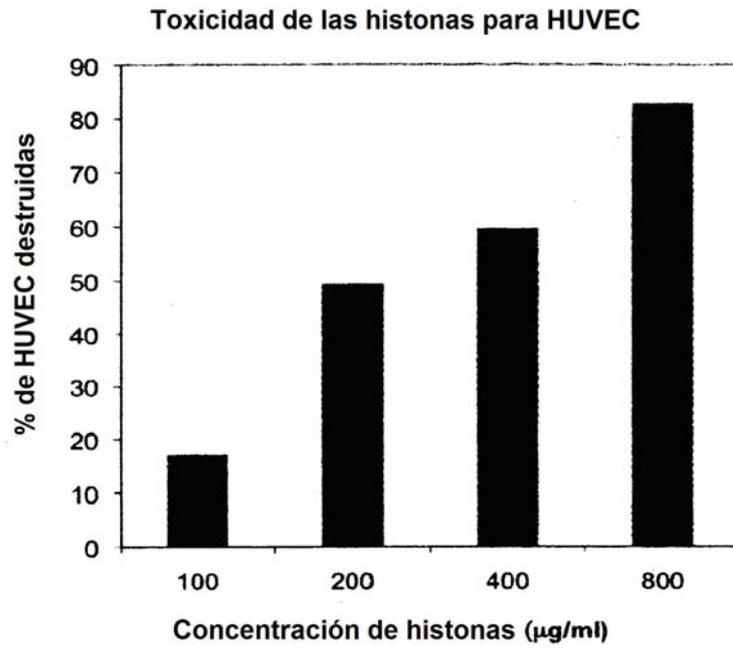


Figura 2A

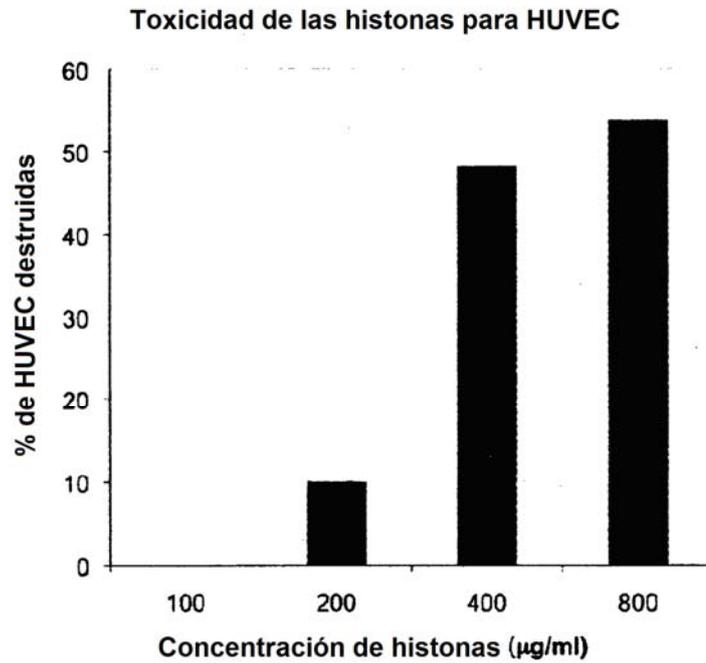


Figura 2B

Capacidad de los diferentes oligosacáridos sulfatados para proteger HUVEC de la citotoxicidad de las histonas

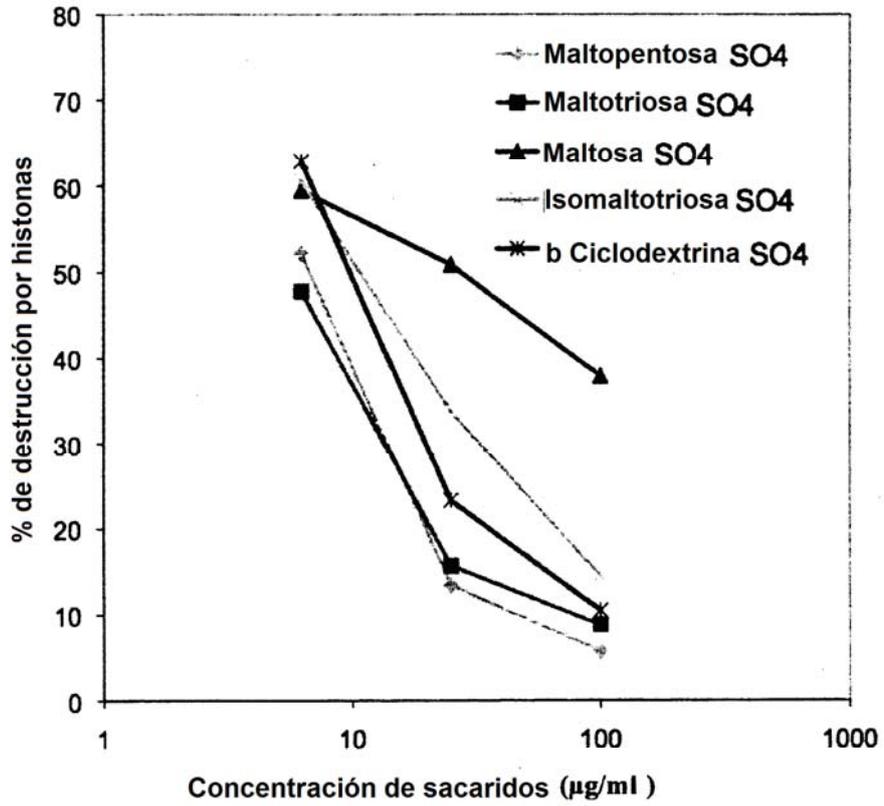


Figura 3

Capacidad de los diferentes oligosacáridos sulfatados para proteger HUVEC de la citotoxicidad de las histonas

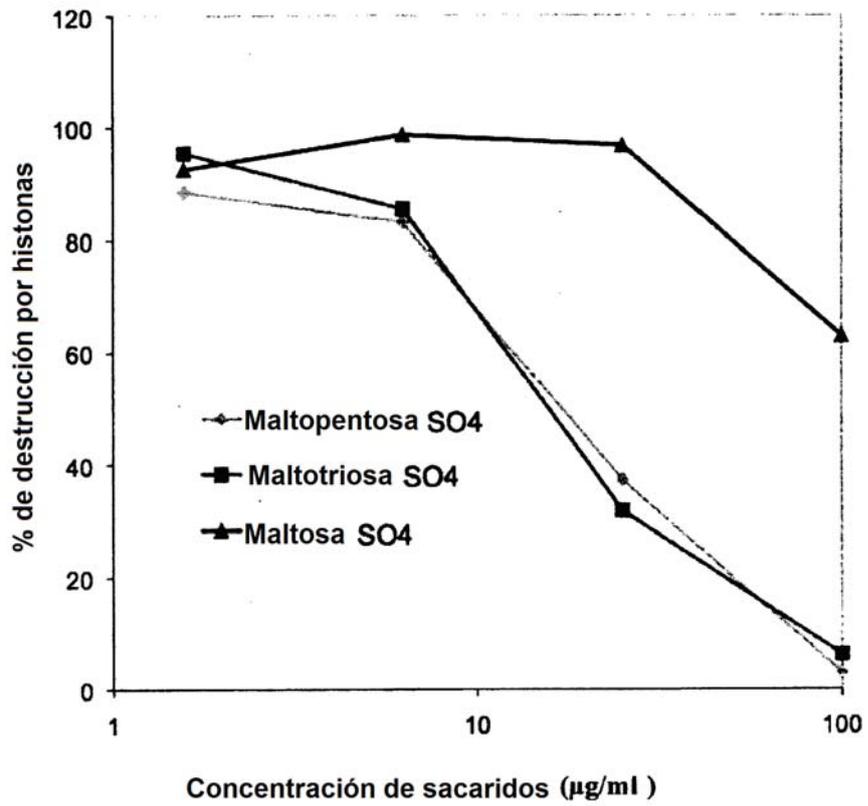


Figura 4

Capacidad de sulfato de maltotriosa para proteger HUVEC de la citotoxicidad de las histonas

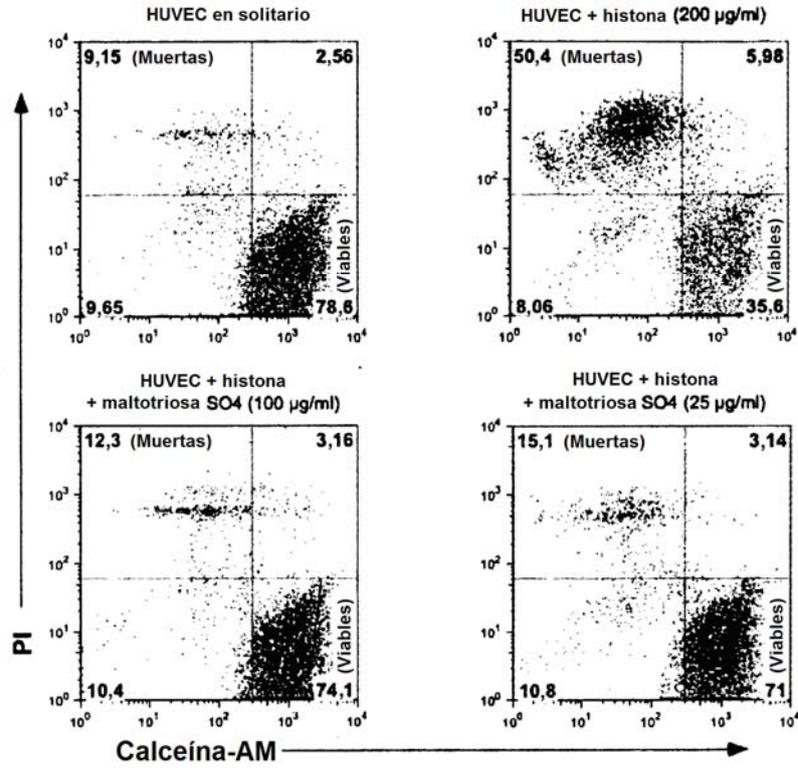


Figura 5

Capacidad de sulfato de maltotriosa para proteger HMEC de la citotoxicidad de las histonas

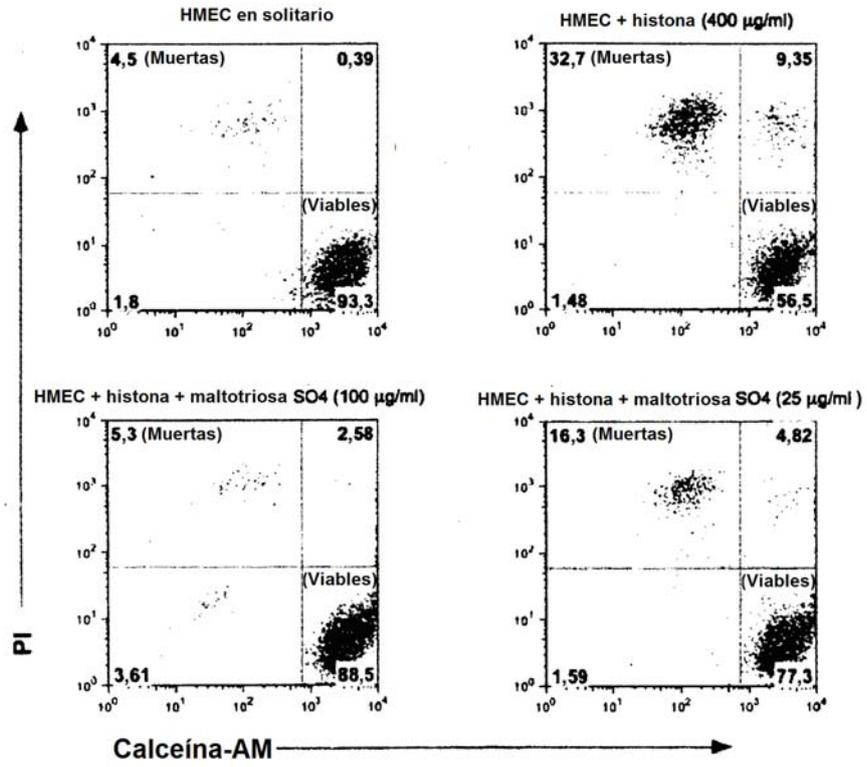


Figura 6

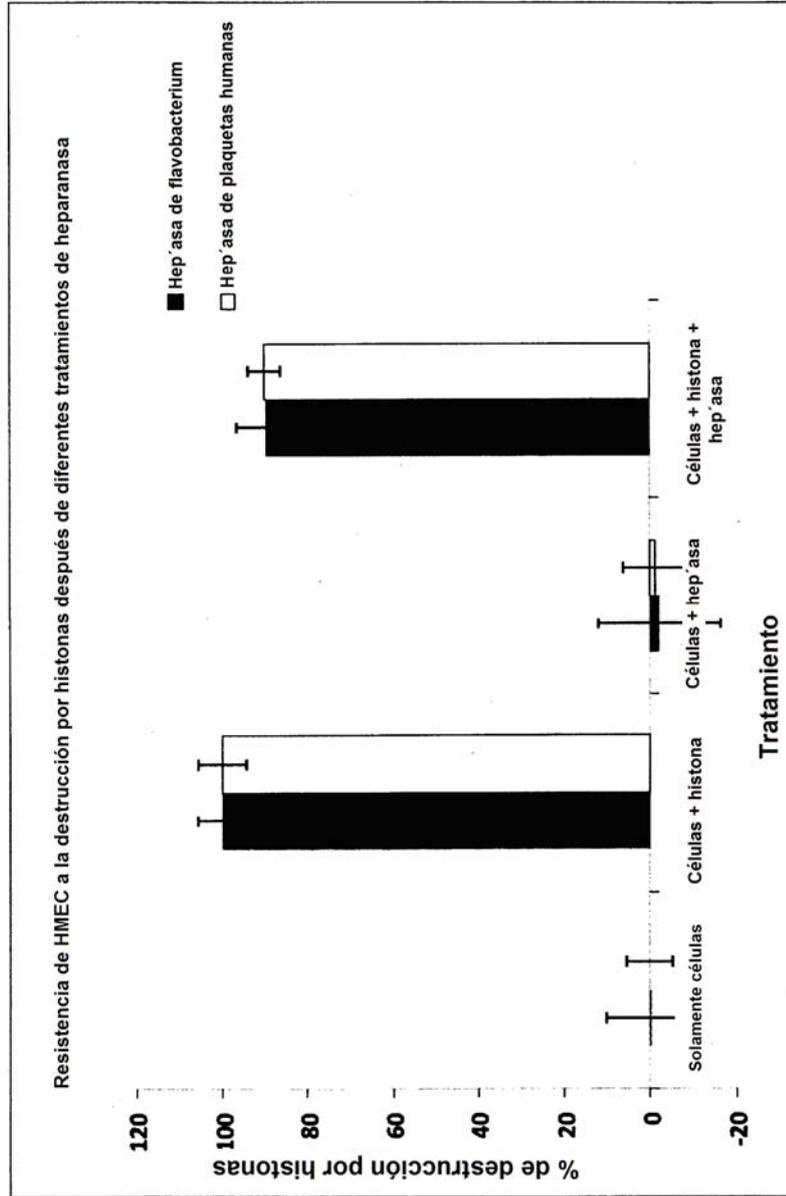


Figura 7

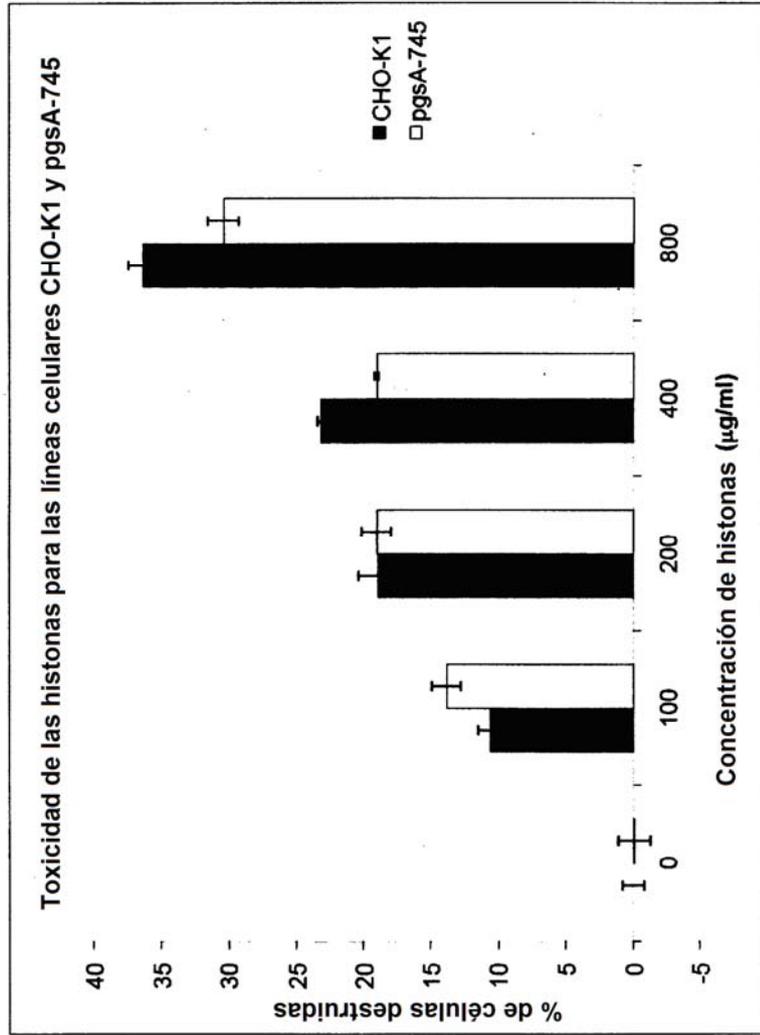
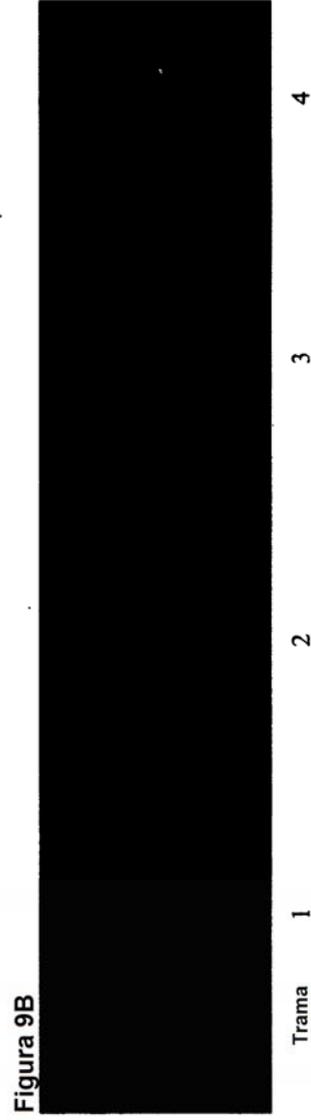
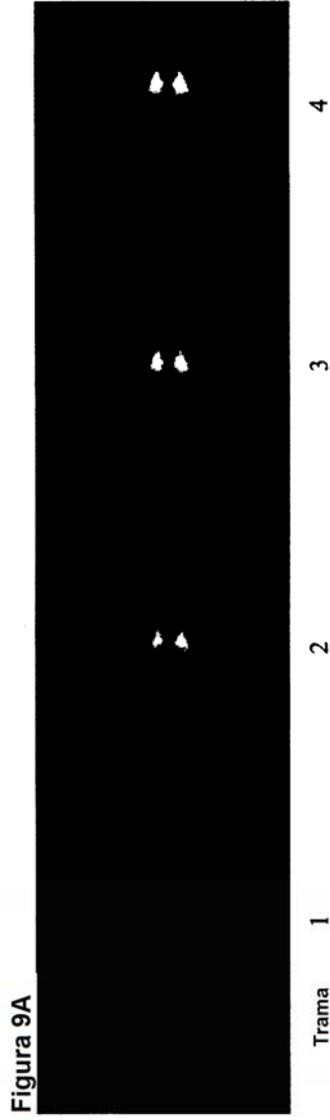


Figura 8



**Figura 10 A**



**Figura 10B**



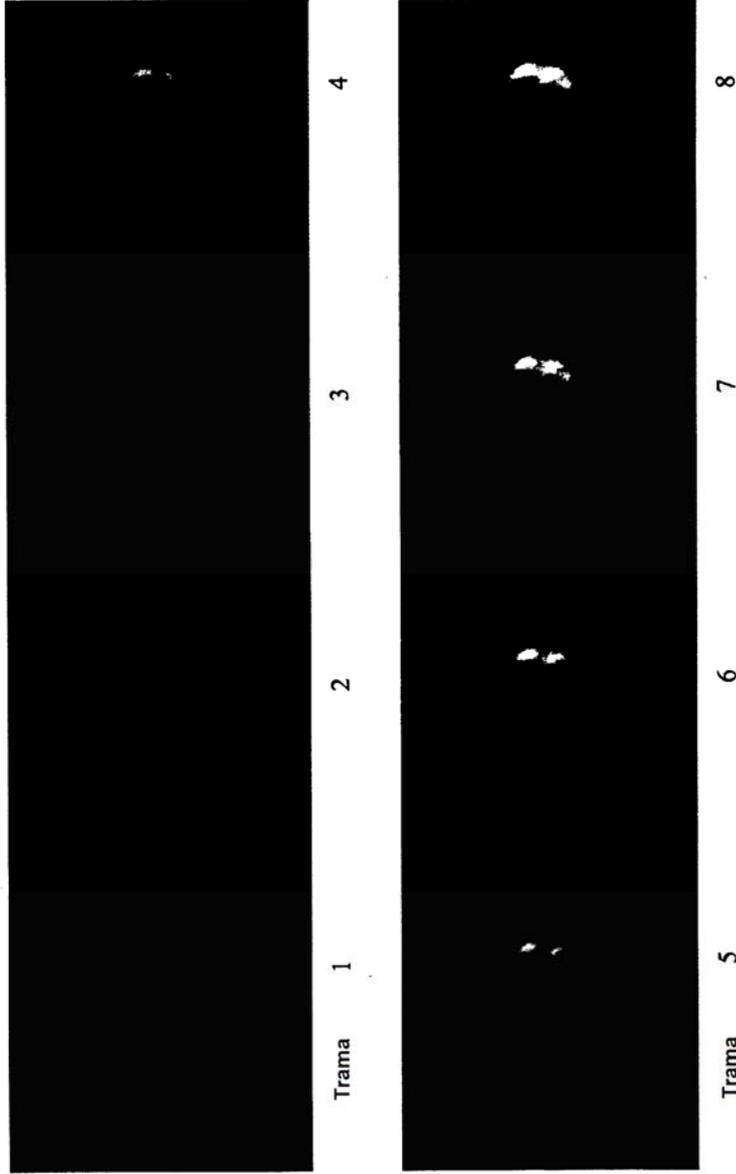


Figura 11



Figura 12

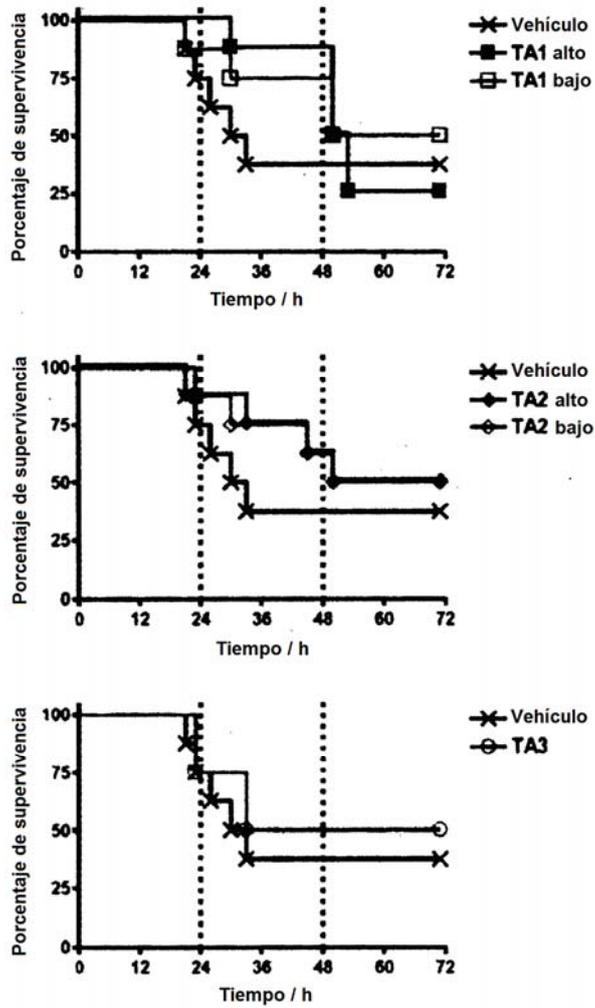


Figura 13