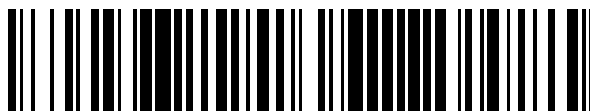


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 737**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/7004 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/7016 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013** **PCT/EP2013/055474**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013** **WO13167303**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** **E 13709917 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019** **EP 2846808**

54 Título: **Composiciones de azúcar para tratamiento de la hemofilia A y/o la enfermedad de Von Willebrand**

30 Prioridad:

08.05.2012 EP 12167178

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

05.11.2019

73 Titular/es:

CSL BEHRING GMBH (100.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE

72 Inventor/es:

SCHULTE, STEFAN;
SPIRIG, ROLF;
ZOLLNER, SABINE;
MOSES, MICHAEL;
WORMSBAECHER, WILFRIED y
STOEHR, HANS-ARNOLD

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 729 737 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

Composiciones de azúcar para tratamiento de la hemofilia A y/o la enfermedad de Von Willebrand.

5 La invención se refiere a ciertas composiciones de azúcar, y su uso en terapia.

El factor Von Willebrand (VWF) es una glicoproteína plasmática multímera grande con dos funciones principales de la hemostasia. En primer lugar, el mismo media la formación del tapón de plaquetas en el sitio de lesión vascular por interacciones con la matriz subendotelial, seguido por activación y agregación de las plaquetas. En segundo lugar, actúa como molécula transportadora para el factor procoagulante VIII (FVIII). La expresión de VWF está restringida a los megacariocitos y las células endoteliales, pero el VWF plasmático se deriva principalmente del endotelio. Una de sus características particulares es una estructura polímera que fluctúa en tamaño desde 500 kDa a más de 20.000 kDa, siendo las formas de mayor tamaño las más eficientes hemostáticamente. Durante la síntesis, VWF sufre modificación extensa después de la traducción, que incluye dimerización, escisión proteolítica para eliminar un propéptido y multimerización (De Meyer, Deckmyn, y Vanhoorelbeke, *Blood* (2009) 113: 5049-57). A lo largo del camino secretor, se añaden a cada monómero maduro de 2050 aminoácidos 12 glucanos enlazados a N y 10 glucanos enlazados a O, que dan cuenta de aproximadamente 20% de su peso molecular total (Millar y Brown *Blood Rev* (2006) 20. 2: 83-92). Es interesante, que se ha demostrado que los N-glucanos, así como los O-glucanos de VWF transportan los antígenos del grupo sanguíneo ABO(H) (Canis et al. *J Thromb Haemost* (2010) 8. 1: 137-45). Su importancia se pone de manifiesto por la observación de que los individuos de grupo sanguíneo O(H) tienen niveles plasmáticos 20-30% más bajos de VWF que los grupos sanguíneos no-O(H) (Jenkins y O'Donnell *Transfusion* (2006) 46. 10: 1836-44). Aunque se han llevado a cabo varios estudios orientados a la investigación del aclaramiento de VWF, el proceso detallado no está bien comprendido hasta ahora. Aproximadamente 95 % de las moléculas plasmáticas de FVIII están unidas de modo no covalente a VWF, y se ha sugerido por esta razón que el FVIII unido a VWF sigue estrechamente a VWF en su camino de aclaramiento (Lenting, VAN Schooten, y Denis *J Thromb Haemost* (2007) 5. 7: 1353-60).

La deficiencia de VWF es responsable de un trastorno hemorrágico denominado enfermedad de von Willebrand (VWD) en tanto que los niveles plasmáticos elevados de VWF representar un factor de riesgo trombótico importante. Están disponibles una diversidad de concentrados de VWF derivados de plasma (con o sin FVIII) para tratar la VWD. El tratamiento actual con concentrados de VWF requiere a menudo infusiones repetidas frecuentes.

WO 2010/020423 A2 se refiere a polisacáridos sulfatados no anticoagulantes (NASPs) que se sugiere aumentan una activación del factor XI. Así, la referencia presenta un método de mejora de la coagulación de la sangre dependiente del factor XI en un individuo que precisa coagulación sanguínea mejorada, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASP al individuo, en donde el NASP mejora la coagulación de la sangre de una manera dependiente del factor XI. Trastornos hemorrágicos propuestos que pueden tratarse con NASPs incluyen hemofilia A, hemofilia B y VWD. Sin embargo, no se ha demostrado o indicado impacto alguno sobre el aclaramiento in vivo del factor von Willebrand.

Por tanto, una reducción en el aclaramiento y por consiguiente una prolongación de la semi-vida de VWF podría reducir la frecuencia de infusiones requerida y mejorar con ello la calidad de vida de los pacientes de VWD. Además, esto podría impactar también positivamente en el tratamiento de la hemofilia A debido a la fuerte correlación de la semi-vida de FVIII con la semi-vida de VWF. (Fijnvandraat, Peters y Ten Cate, *British Journal of Haematology* (1995): 474-476).

45 Sumario de la invención

Los inventores han encontrado sorprendentemente que azúcares accesibles, preferiblemente los azúcares terminales, que son constituyentes de los antígenos del grupo sanguíneo ABO(H), tienen una influencia importante en el aclaramiento de VWF. Por esta razón, un aspecto de la invención es una composición para uso en el tratamiento de VWD y/o la hemofilia A como se define en la reivindicación 1. La composición comprende un azúcar aislado para uso en el tratamiento de VWD y/o hemofilia A, en donde el azúcar es un residuo de azúcar accesible derivado del antígeno del grupo sanguíneo ABO(H), en donde el azúcar es un monosacárido aislado y el monosacárido es uno o más de galactosa, fucosa y N-acetilgalactosamina. Preferiblemente, la composición conduce a una reducción en el aclaramiento y aumenta la semi-vida in vivo de VWF, conduciendo esto más preferiblemente a un aumento concomitante en la semi-vida de FVIII.

El VWF puede producirse endógenamente, o puede ser exógeno. El mismo puede derivarse de plasma o producirse recombinantemente.

El monosacárido aislado puede ser un monosacárido simple o una combinación de cualesquiera dos o la totalidad de galactosa, fucosa y N-acetilgalactosamina.

En el caso de un individuo que recibe VWF exógeno, la composición puede administrarse a un individuo que se encuentra en necesidad de ello antes de la administración de VWF, o simultáneamente con VWF, o incluso después de la administración de VWF. Preferiblemente, la composición de la invención se administra antes de la administración de VWF.

Un aspecto adicional de la invención es un producto farmacéutico que comprende la composición arriba descrita y una composición que comprende VWF como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de VWD o hemofilia A.

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende VWF y uno o más de galactosa, fucosa o N-acetilgalactosamina como monosacárido para uso en el tratamiento de VWD o hemofilia A.

Otro aspecto adicional de la invención es una composición que comprende dos o más polisacáridos aislados para uso como se ha descrito anteriormente, en donde el monosacárido se selecciona de galactosa, fucosa y N-acetilgalactosamina.

Preferiblemente, el monosacárido comprendido en cualquiera de las composiciones detalladas anteriormente, aumenta la supervivencia de VWF en la sangre de un mamífero por inhibición de la interacción de VWF con un receptor de aclaramiento.

Preferiblemente, el receptor de aclaramiento es un receptor tipo C análogo a lectina, seleccionándose más preferiblemente de los subgrupos de receptores de lectinas tipo C asialoglicoproteína y receptores DC y colectinas, de acuerdo con la definición dada en Zalensky & Gready (2005) FEBS-Journal 272, 6179-6217. Más preferiblemente, el receptor tipo C semejante a lectina se selecciona de ASGR, CLEC4M, CLEC10A, CLEC4F, Colectina-12.

En otra realización preferida, el receptor de aclaramiento es un receptor de barrido clase A tal como el receptor de barrido A5 (SCARA5).

Descripción detallada de la invención

Los inventores han encontrado sorprendentemente que la asialofetúina de bovino, así como la asialoglicoproteína alfa-1 ácida, que se fijan preferiblemente a receptores de galactosa (v. g. el receptor de asialoglicoproteína, ASGPR en el hígado), bloquean el aclaramiento de VWF, lo que sugiere que tales receptores son receptores potenciales de aclaramiento para VWF in vivo. Como se ha mencionado anteriormente, los inventores han encontrado también sorprendentemente que los residuos azúcar accesibles, v. g. los terminales de los antígenos del grupo sanguíneo ABO(H) tienen por sí mismos una influencia importante en el aclaramiento de VWF. Por tanto, un aspecto de la invención es una composición que comprende un monosacárido aislado para uso en el tratamiento de la hemofilia A y/o la VWD, en donde el monosacárido como se define en la reivindicación 1 es un residuo azúcar accesible derivado del antígeno del grupo sanguíneo ABO(H), pero se utiliza en una forma aislada, es decir no como parte de un antígeno del grupo sanguíneo ABO(H).

Preferiblemente, la composición reduce el aclaramiento in vivo de VWF, conduciendo a un aumento concomitante en la concentración de FVIII. Preferiblemente, el aclaramiento de VWF in vivo se reduce al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, 2,5 veces o 3 veces; reduciéndose el aclaramiento aún más preferiblemente al menos 3,5 veces, 4 veces o 4,5 veces, y reduciéndose muy preferiblemente el aclaramiento al menos 5 o incluso 6 veces.

El VWF puede producirse endógenamente, o puede ser de origen exógeno. El mismo puede derivarse de plasma o producirse recombinantemente. Si se produce recombinantemente, puede ser una proteína de fusión de VWF con un resto prolongador de la semi-vida, v. g. una fusión de albúmina o una fusión con Fc. Alternativa o adicionalmente, el VWF propiamente dicho puede modificarse para aumentar su semi-vida, v. g. por modificación de la glicoestructura o por conjugación (v. g. PEGilación, poli (ácidos siálicos)).

El azúcar aislado es uno o más de galactosa no modificada, preferiblemente D-galactosa, más preferiblemente β -D-galactosa, fucosa, preferiblemente L-fucosa, más preferiblemente α -L-fucosa y N-acetilgalactosamina, preferiblemente α -N-acetilgalactosamina.

En el caso de un individuo que recibe VWF exógeno, la composición puede administrarse a un individuo que se encuentra en necesidad de ello antes de la administración de VWF, o simultáneamente con VWF, o incluso después de la administración de VWF. Preferiblemente, la composición de la invención se administra antes de la administración de VWF, por ejemplo, aproximadamente 5 min antes de la administración de VWF.

Un aspecto adicional de la invención es un producto farmacéutico que comprende la composición conforme a la invención y una composición que comprende VWF como una preparación combinada para uso simultáneo, separado

o secuencial en el tratamiento de VWF o hemofilia A. La composición de la invención comprende uno cualquiera o más de galactosa, fucosa o N-acetilgalactosamina como monosacárido. Preferiblemente, la composición de la invención comprende una mezcla de dos cualesquiera, más preferiblemente una mezcla de la totalidad de dichos tres monosacáridos. El VWF puede ser derivado de plasma o recombinante. El mismo puede comprender restos prolongadores de la semi-vida. Por ejemplo, VWF derivado de plasma o recombinante puede conjugarse con, por ejemplo, polietilenglicol u otros polímeros fisiológicamente aceptables, conjugarse o enlazarse como una proteína de fusión con albúmina, o con un fragmento Fc de IgG. El VWF recombinante puede expresarse como una proteína de fusión con un resto prolongador de la semi-vida, v. g. como una proteína de fusión con albúmina o una fusión con Fc. El VWF recombinante puede ser también un VWF modificado, comprendiendo por ejemplo sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos que se introducen a fin de modificar sus propiedades o aumentar su semi-vida in vivo.

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende VWF y uno o más de galactosa, fucosa o N-acetilgalactosamina como un monosacárido, para uso en el tratamiento de VWD o hemofilia A. Las mismas opciones detalladas anteriormente para el aspecto previo de la invención son aplicables aquí.

Otro aspecto adicional de la invención es una composición como se ha descrito arriba que comprende dos o más azúcares aislados, en donde el azúcar se selecciona de galactosa, fucosa y N-acetilgalactosamina. Los dos o más azúcares aislados están presentes como monosacáridos.

Otro aspecto de la invención es la composición arriba descrita para uso médico, en particular para uso en el tratamiento de VWD o hemofilia A.

Preferiblemente, el azúcar comprendido en cualquiera de las composiciones arriba detalladas aumenta la supervivencia de VWF en la sangre de un mamífero por inhibir la interacción de VWF con un receptor de aclaramiento.

Preferiblemente, el receptor de aclaramiento es un receptor tipo C semejante a lectina, que es una clase de lectinas animales (y humanas) que se fijan a un carbohidrato de una manera dependiente de calcio. Más preferiblemente, el receptor de aclaramiento se selecciona de los subgrupos siguientes de receptores de lectinas tipo C: asialoglicoproteína y receptores DC y colectinas. Más preferiblemente, el receptor tipo C semejante a lectina se selecciona de ASGPR, CLEC4M, CLEC10A, CLEC4F, Colectina-12.

En otra realización preferida, el receptor de aclaramiento es un receptor de barrido clase A tal como el receptor de barrido A5 (SCARA5).

Los receptores tipo C semejantes a lectinas se revisan en Zalensky & Gready (2005) FEBS-Journal 272, 6179-6217, que se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad. Los receptores asialoglicoproteína y DC son un subgrupo de receptores tipo C semejantes a lectinas. Los mismos son proteínas transmembranales tipo II que contienen una cola citoplásmica corta, un dominio transmembranal, una región de tallo extracelular y un dominio de lectina tipo C que se fija a Ca^{2+} /carbohidrato. La longitud de la región de tallo, que está implicada en la oligomerización, varía notablemente entre miembros diferentes de este subgrupo. Miembros de este subgrupo son, por ejemplo, el receptor de asialoglicoproteína, la lectina de fijación de galactosa de los macrófagos (MGL), la molécula-3-de agarre de adhesión intercelular específica de las células dendríticas no-integrina (DC-SIGN), y otros. El receptor asialoglicoproteína es un heterotrímero, expresado en el parénquima hepático, codificado por dos genes (ASGR1 y ASGR2). El mismo fija e internaliza los oligosacáridos terminados en galactosa de las glicoproteínas desialiladas. Después de la disociación del ligando en los lisosomas ácidos, el receptor se recicla a la superficie celular.

Las colectinas son un subgrupo diferente de receptores tipo C semejantes a lectinas. Las mismas contienen un dominio de colágeno y funcionan como parte de la primera defensa inmune innata en línea.

CLEC4M, CLEC10A, y CLEC4F son también miembros de la familia del dominio de lectinas tipo C.

SCARA-5 pertenece a un grupo de moléculas de barrido que tienen como su función primaria la iniciación de respuestas inmunes. Se expresa en células epiteliales.

La dosis del azúcar aislado puede estar comprendida en el intervalo de 30 mg a 10 g por kg, preferiblemente 50 mg a 8 g por kg, y más preferiblemente 100 mg a 6 g por kg del monosacárido. Las personas expertas podrán determinar la dosis óptima como cuestión rutinaria.

La expresión "azúcar aislado" tiene por objeto hacer referencia al monosacárido respectivo como se define en la reivindicación 1.

El término "oligosacárido" se refiere a una cadena de residuos azúcar con dos o más residuos, preferiblemente 3 o más residuos.

El término "glicopéptidos" se refiere a un péptido o proteína con una o más estructuras glucano unidas, v. g., unidas a O o unidas a N. La estructura del glucano puede ser lineal o ramificada, y puede comprender uno o más residuos azúcar.

5 El término "semi-vida" se refiere al tiempo necesario para eliminar de la circulación in vivo la mitad de la proteína. El área bajo la curva (AUC) se determinó principalmente para evaluar los efectos del aclaramiento. Una reducción en el aclaramiento conduce a valores AUC más altos, y a un aumento de la semi-vida.

10 El término "antígeno del grupo sanguíneo ABO(H)" se refiere a antígenos carbohidrato presentes en los eritrocitos que son reconocidos comúnmente por anticuerpos anti-A o anti-B. El sistema de grupo sanguíneo ABO(H) es el sistema más importante de tipos de sangre en la transfusión de sangre humana. El antígeno H es un precursor inicial para los antígenos del grupo sanguíneo ABO(H), y es una estructura de carbohidrato enlazada principalmente a proteína, con una fracción menor unida a caramida. El mismo está compuesto de una cadena de β -D-galactosa, β -D-N-acetilglucosamina, β -D-galactosa, y α -L-fucosa enlazada unida en posición 2. El antígeno A contiene una α -N-acetilgalactosamina unida al residuo D-galactosa en el extremo del antígeno H, mientras que el antígeno B tiene un residuo α -D-galactosa unido a la D-galactosa del antígeno H. Por tanto, los residuos azúcar terminales del sistema de grupo sanguíneo ABO(H) son galactosa, N-acetilgalactosamina y fucosa.

20 La expresión "factor von Willebrand" (VWF) se refiere a una glicoproteína de la sangre implicada en la hemostasis. La misma promueve la adhesión de las plaquetas a los sitios de lesión vascular por formación de un puente molecular entre la matriz de colágeno sub-endotelial y las plaquetas. Es también un portador para el FVIII de la coagulación, protegiéndolo de la degradación y el aclaramiento. El término puede referirse al VWF natural, pero incluye también variantes del mismo, v. g. proteínas de fusión o conjugados, o variantes de secuencia en las que se han insertado, delecionado o sustituido uno o más residuos, que mantienen al menos una función biológica.

25 La expresión "hemofilia A" se refiere a una deficiencia en el factor FVIII de la coagulación, que usualmente es hereditario.

30 La expresión "enfermedad de von Willebrand" (VWD) se refiere a una anomalía de la coagulación asociada con una deficiencia cualitativa o cuantitativa de VWF.

35 La expresión "residuo azúcar accesible" se refiere a un residuo azúcar que está expuesto en la superficie de una glicoproteína u oligosacárido, refiriéndose el término en particular a un residuo azúcar que es capaz de fijarse a estructuras endoteliales u otras a las cuales se fija VWF y que bloquea por tanto competitivamente la fijación de VWF a estos receptores.

40 La expresión "receptor de aclaramiento" en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier molécula que se fija a VWF y conduce a la eliminación de la molécula fijada del torrente sanguíneo. Típicamente, el aclaramiento tendrá lugar por endocitosis mediada por receptores, y la molécula fijada se degradará en el compartimiento lisosómico.

Ejemplos

45 La invención se ilustra por los ejemplos siguientes, con referencia a las Figuras que siguen:

La Figura 1 muestra la reducción en el aclaramiento (aumento en AUC) de VWF por una mezcla de 3 azúcares en las ratas.
 La Figura 2 muestra el efecto de cada azúcar individual sobre el aclaramiento de VWF en las ratas.
 50 La Figura 3 muestra el efecto de una mezcla de 3 azúcares sobre el aclaramiento de VWF en ratones deficientes en VWF.
 La Figura 4 muestra la reducción en el aclaramiento de pdVWF que en ratones deficientes en VWF por dosis diferentes de asialofetuína.
 La Figura 5 muestra la reducción en el aclaramiento de rFVIII en ratones deficientes en VWF por dosis diferentes de asialofetuína.
 55 La Figura 6 muestra la reducción en el aclaramiento de VWF en ratones deficientes en VWF por asialoAGP.
 La Figura 7 muestra el efecto de prolongación de ASF sobre el aclaramiento de VWF en las ratas en comparación con el grupo de control con fetuína.
 La Figura 8 muestra que el aclaramiento de VWF se inhibía por administración de dosis múltiples de ASF.
 60 La Figura 9 muestra señales de fijación aumentada de ASF a proteínas receptoras de aclaramiento inmovilizadas en comparación con fetuína utilizada como proteína de control.
 La Figura 10 muestra señales de fijación relativa de SPR de concentraciones diferentes de monómeros de VWF en comparación con ASF y fetuína por aplicación de proteínas receptoras de aclaramiento diferentes inmovilizadas covalentemente en un chip.

La Figura 11 muestra la fijación disminuida de ASF a rhASGPR inmovilizada en presencia de galactosa, fucosa y N-acetilgalactosamina.

La Figura 12 muestra la fijación de multímeros VWF derivados de plasma a rhASGPR por aplicación de un ensayo de fijación en fase sólida.

Ejemplo 1: Influencia de los monosacáridos sobre el aclaramiento de VWF derivado de plasma humano en ratas y ratones

Los azúcares de grupo sanguíneo A, B y O(H) están constituidos por 3 unidades diferentes de monosacárido (en el caso de H solamente dos); a saber, galactosa (Gal), fucosa (Fuc) y N-acetilgalactosamina (GalNAc). Para evaluar el efecto de estos azúcares sobre el aclaramiento de pd-VWF, se inyectaron ratas por vía intravenosa con un bolus de una "mezcla de azúcares", constituida por Gal, Fuc y GalNAc, obtenida de Sigma Aldrich, St Louis, USA, (2g/kg de cada uno) 15 min antes de la infusión de Haemate® P (200 UI/kg) tipo O(H). Alternativamente, se utilizó cada azúcar individualmente a 2 g/kg. Para evitar el enmascaramiento de los antígenos de grupo sanguíneo presentes en VWF por anticuerpos específicos de grupo sanguíneo, se utilizó material aislado de individuos de tipo de grupo sanguíneo O(H). Además, se ha utilizado adicionalmente como referencia asialofetúina de bovino (250 mg/kg), un ligando descrito para bloqueo de los receptores de galactosa como el ASGPR en el hígado. Se incluyó ulteriormente glucosa (2 g/kg) en el estudio como control negativo. Se recogieron muestras de sangre y se analizaron respecto al antígeno de VWF humano por ELISA.

Como se muestra en Fig. 1, la solución que contenía Gal, Fuc y GalNAc aumentaba notablemente el AUC y retardaba por tanto el aclaramiento de VWF. El efecto de cada azúcar individual se muestra en Fig. 2. Es interesante que Gal tenía sólo un efecto moderado sobre el aclaramiento de VWF, mientras que Fuc y GalNAc tenían un efecto más pronunciado sobre la inhibición del aclaramiento de VWF.

Ejemplo 2: Efecto de Fuc, Gal y GalNAc sobre el aclaramiento de VWF derivado de plasma en ratones deficientes en VWF

El efecto de los azúcares sobre el aclaramiento de VWF derivado de plasma humano (pd) se evaluó también en ratones deficientes en VWF. Los animales recibieron por vía intravenosa un bolus de una "mezcla de azúcares" constituida por Gal, Fuc y GalNAc (2 g/kg de cada una) 15 min antes de la infusión de Haemate® P (200 UI/kg) tipo O(H). Como se muestra en Fig. 3, se observó un efecto de la mezcla de azúcares comparable al mostrado anteriormente en las ratas sobre el aclaramiento de pd-VWF en los ratones deficientes en VWF.

Ejemplo 3: Efecto de la dosis de azúcar

Se evalúan dosis específicas de azúcares relacionadas con cada uno de los enfoques descritos anteriormente en modelos de investigación de animales tales como ratas y/o ratones deficientes en VWF orientados a encontrar la concentración apropiada para aplicación in vivo. Se administran concentraciones diferentes de azúcares por vía intravenosa. Por ejemplo, puede utilizarse una gama de concentraciones de azúcar de 30 mg/kg a aproximadamente 6 g/kg, y los azúcares se utilizan individualmente y en combinaciones de dos o la totalidad de los 3 azúcares. La administración oral de las diferentes concentraciones de azúcar forma también parte de la investigación. Concomitantemente con la administración de azúcares descrita, se coadministran VWF derivado de plasma o recombinante o preparaciones que contienen a la vez VWF y FVIII; alternativamente, la administración de VWF o VWF y FVIII se retarda aproximadamente 5 min después de la administración del o de los azúcares. Después de la administración, se monitorizan continuamente los niveles de antígeno VWF por aplicación de un sistema ELISA estandarizado. En caso de la administración de FVIII, se miden además los niveles del antígeno FVIII. Las diferentes dosis de azúcares revelan un aumento importante en AUC, dando como resultado una reducción del aclaramiento de VWF (y FVIII). Los enfoques respectivos se investigan ulteriormente en estudios de toxicología in vivo en lo que respecta a su compatibilidad.

Ejemplo de Referencia 4: Efecto de los oligosacáridos

Como se describe en los **Ejemplos 1 a 3**, se aplican enfoques experimentales equivalentes para evaluación de la reducción del aclaramiento tanto de VWF como de FVIII debida a la administración de oligosacáridos. Por ejemplo, se utilizan trisacáridos correspondientes a los antígenos del grupo sanguíneo, solos y en combinación. Para la evaluación inicial, puede seleccionarse una dosis de aproximadamente 2 g por kg; se lleva también a cabo un estudio de descubrimiento de la dosis como se describe en el Ejemplo 3 para los monosacáridos.

El aclaramiento de VWF (y FVIII) se reduce acusadamente en presencia de oligosacáridos específicos.

Ejemplo de Referencia 5: Efecto de los glicopéptidos

El efecto de los asialo-glicopéptidos tanto sobre el aclaramiento de pd VWF humano como sobre el FVIII recombinante se evaluó en ratones deficientes en VWF. Los animales recibieron un bolus de asialoglicoproteína alfa-1 ácida (asialo-AGP) o asialo-fetuína 5 min antes de la infusión de pd VWF altamente purificado (se eliminó el FVIII plasmático) mezclado previamente con FVIII recombinante. Se administraron VWF y FVIII recombinante en una concentración de 200 UI/kg. El pd VWF es bioquímicamente comparable (glicosilación, distribución de multímeros, etc.) a Haemate® P.

Como se muestra en Fig. 4, se observó un aclaramiento reducido para pd VWF en presencia de una concentración de asialofetuína igual o mayor que 100 mg/kg (líneas de trazos). Además, la reducción en el aclaramiento de VWF afecta también al proceso de aclaramiento de FVIII como se muestra en Fig. 5. Una reducción en el aclaramiento de VWF causada por asialofetuína conduce también a una reducción en el aclaramiento de FVIII. Se observó el mismo efecto por aplicación de asialo-AGP (bolus de 250 mg/kg). Una revisión de los resultados del ensayo respectivo se proporciona en Fig. 6. Además, se utilizaron fetuína y alfa-1-ácido-glicoproteína (AGP) como sustancias de control. Estos materiales llevan ácido siálico terminal en lugar de los residuos galactosa terminales característicos de las preparaciones tipo asialo. Como era de esperar, las sustancias de control no mostraban un efecto significativo concerniente a la reducción en el aclaramiento.

Además, como se muestra en Fig. 7, se demostró que el aclaramiento de VWF se reduce en presencia de ASF de bovino (fetuína después de la eliminación de los residuos de ácido siálico terminales) mientras que el efecto de la fetuína de bovino sobre el aclaramiento de VWF es menos importante.

Adicionalmente, el efecto prolongador de ASF sobre el aclaramiento de VWF se mantenía por administración frecuente de ASF (administración intravenosa de ASF en ratas a los 5 min, 120 min, 240 min y 360 min después de la administración intravenosa de 100 UI VWF por kg de peso corporal), como se muestra en Fig. 8. Estos datos se comparan con el aclaramiento de VWF en presencia de ASF que se administró como dosis simple y como administración multidosis de solución isotónica de NaCl utilizada como grupo de control.

Ejemplo de Referencia 6: Interacción con candidatos potenciales receptores de aclaramiento

Debido al hecho de que tanto las asialo-glicoproteínas como los monosacáridos han conducido interesantemente a una semi-vida prolongada de VWF (y FVIII) in vivo, se investigaron receptores celulares respectivos con respecto a la interacción con VWF. Estos estudios se realizaron in vitro y se identificaron candidatos potenciales receptores de aclaramiento que podrían desempeñar un papel crucial en el aclaramiento de VWF debido a interacción con ASF y VWF.

Método:

Se aplicó tecnología SPR (Biacore T200, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suecia) para evaluar los mecanismos de las interacciones biomoleculares en tiempo real entre VWF, agentes de bloqueo de receptores y candidatos de receptores de aclaramiento. Los experimentos de interacción se realizaron a una temperatura de las celdas de flujo de +25 °C por aplicación de un tampón de ejecución que contenía 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ y 0,05% Tween-20 a pH 7,4, que se utilizó también como tampón de dilución de las muestras. Los reactivos y las soluciones stock de tampón se adquirieron de GE Healthcare Biosciences (Uppsala, Suecia). Los dominios extracelulares de proteínas receptoras se adquirieron de R&D Systems (Wiesbaden, Alemania). Los ligandos se capturaron en Chips Sensores C1 Serie S pretratados de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proteínas receptoras se inmovilizaron covalentemente por grupos amino libres a la matriz de dextrano carboximetilado por aplicación del kit de acoplamiento de amina de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se incluyó una celda de flujo en blanco sin proteína inmovilizada como superficie de referencia en el chip para cambio masivo y cambios de fijación inespecíficos.

Se prepararon concentraciones crecientes de ASF y fetuína comprendidas entre 10. 240 y 10 nM como una serie de dilución seriada dos veces en tampón de ejecución y se inyectaron secuencialmente a través de la superficie del chip a 25 µl/min a fin de caracterizar la interacción proteína-ligando. Para los experimentos realizados con monómeros de VWF purificados (pd VWF después de reducción con ditiotretol y carboximetilación con yodoacetamida), las concentraciones estaban comprendidas entre 4000 y 31,25 nM. Las muestras se diseñaron de modo que contuvieran composiciones de tampón similares debido a la alta sensibilidad del sistema SPR a los cambios en la composición del tampón. La velocidad de flujo relativamente alta se seleccionó a fin de evitar la refijación potencial debida a limitaciones de transferencia de masa. Los ciclos del análisis de interacción consistían en una fase de inyección de la muestra de 5 min. Esta fase de asociación iba seguida por una fase de disociación de 17 min en tampón de ejecución. Tanto la superficie del chip como la superficie de control se regeneraron con un pulso de 10 segundos de NaOH 10 mM entre cada ejecución a fin de eliminar el analito fijado de las proteínas receptoras inmovilizadas en la superficie.

Los datos cinéticos se analizaron utilizando el Software Evaluation Biacore T200 Version 1. 0 (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suecia). Se detectó una interacción del analito con el ligando por un aumento en la masa acumulativa, y la fijación específica se identificó por sustracción de la respuesta de fijación registrada de la superficie de control, seguido por sustracción de una media de las inyecciones en blanco de tampón. Se posicionó un punto de

información 20 segundos después del final de la inyección de la muestra y se evaluó como representativo de una interacción estable proteína-ligando, que era interesante. Así, se utilizó este punto para la evaluación y cálculo de las interacciones biomoleculares entre los analitos y los candidatos potenciales de receptores de aclaramiento. Adicionalmente, la respuesta se calculó con relación a la línea basal en cada caso.

Una revisión de los resultados de fijación y la interacción de los candidatos receptores de aclaramiento implicados con VWF y ASF (y prácticamente no con fetuina) se muestra en las Figs. 9 y 10. En conclusión, VWF y ASF se fijan eficientemente a rhASGPR, rhCLEC4M, rmCLEC4F, rhCLEC10A, rhCOLEC12 and rhSCARA5. Así pues, se sugiere que estos candidatos receptores desempeñan un papel crucial en el aclaramiento de VWF.

Ejemplo 7: Inhibición de la interacción de ASF con rhASGPR por utilización de monosacáridos diferentes

Se seleccionó rhASGPR para experimentos posteriores. Se utilizó un enfoque SPR similar a fin de investigar la inhibición de la fijación de ASF en presencia de monosacáridos. Es interesante que galactosa, fucosa y N-acetilgalactosamina inhibían la fijación, fenómeno que está de acuerdo con las observaciones procedentes de estudios en animales realizados anteriormente (véase Fig. 11). Adicionalmente, la fijación de ASF era inhibida en ausencia de Ca^{2+} .

Ejemplo 8:

De acuerdo con el Ejemplo 7, la interacción de los monómeros de pdVWF con los receptores de aclaramiento mencionados anteriormente se inhibe en presencia de monosacáridos tales como galactosa, fucosa y N-acetilgalactosamina.

Ejemplo de Referencia 9: Ensayo de fijación en fase sólida para investigación de la interacción receptor-ligando

Además del análisis de la interacción basada en SPR con VWF monómero, se investigó la interacción de VWF multímero (purificado a partir de plasma humano) con rhASGPR utilizando ensayo de fijación en fase sólida. Adicionalmente, se utilizó como control asialo-VWF (VWF derivado de plasma después de tratamiento con $\alpha(2-3, 6, 8)$ -neuraminidasa).

Se reconstituyó rhASGPR liofilizada (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania) y se diluyó en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M a pH 9,6, adsorbido sobre placas de 96 micropocillos de adsorción alta a la temperatura ambiente durante una noche, después de lo cual se lavó con tampón de lavado (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , y 0,1% (w/v) Tween-20 a pH 7,4). Después de ello, los pocillos se incubaron durante 1 hora con solución de bloqueo (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 y 2,5 % (w/v) BSA at pH 7,4) a fin de bloquear la fijación inespecífica, y se lavaron luego nuevamente con tampón de lavado. Las muestras se diluyeron con tampón de dilución (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0,1% (w/v) Tween-20 y 1% (w/v) BSA a pH 7,4) hasta concentraciones de VWF que oscilaban desde 100 a 3 $\mu\text{g/ml}$. VWF interaccionaba con la proteína receptora inmovilizada mientras se incubaban las muestras durante 1 hora a $+37^\circ\text{C}$. Después de lavar los pocillos, el VWF asociado se detectó subsiguientemente por un anticuerpo policlonal comercial de VWF antihumano de conejo conjugado con HRP (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) que se había diluido previamente 1:16,000 en tampón de dilución. Los pocillos se incubaron con la solución del anticuerpo conjugado con HRP durante 1,5 horas a la temperatura ambiente y se lavaron antes de añadir la solución sustrato, un sustrato TMB cromógeno diluido 1:11 en tampón sustrato TMB (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania), y se incubaron durante 30 min a la temperatura ambiente en la oscuridad. Todos los pasos de lavado se realizaron 3 veces. La reacción se paró con solución de parada POD (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania) y la reacción del sustrato se monitorizó fotométricamente por medida de la diferencia en las longitudes de onda a 450 nm y 620 nm.

Los resultados se dan en Fig. 12. No sólo los multímeros de asialo-VWF interaccionaban con rhASGPR, sino también multímeros de VWF derivados de plasma, que presentaban una estructura de glicosilación natural sin modificaciones.

Ejemplo 10:

De acuerdo con el Ejemplo 9, los multímeros pd VWF interaccionan con los candidatos de receptores de aclaramiento mencionados anteriormente. Además, la fijación se inhibe en presencia de ASF o monosacáridos tales como galactosa, fucosa y N-acetilgalactosamina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un monosacárido aislado para uso en el tratamiento de la hemofilia A y/o la enfermedad de von Willebrand, en donde el monosacárido es un residuo azúcar accesible derivado de antígeno del grupo sanguíneo ABO(H), en donde el monosacárido aislado es uno o más de galactosa, fucosa y N-acetilgalactosamina.
- 10 2. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde se reduce el aclaramiento in vivo del factor von Willebrand.
3. La composición para uso de la reivindicación 2, en donde la reducción del aclaramiento in vivo del factor von Willebrand conduce a un aumento concomitante en el área bajo la curva que representa la concentración de factor VIII.
- 15 4. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el factor von Willebrand se produce endógenamente.
5. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el factor von Willebrand es de origen exógeno.
- 20 6. La composición para uso de la reivindicación 5, en donde el factor von Willebrand se deriva de plasma.
7. La composición para uso de la reivindicación 5, en donde el factor con Willebrand es recombinante.
- 25 8. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5 a 7, en donde la composición se administra a un individuo que se encuentra en necesidad de ello antes de la administración del factor von Willebrand.
- 30 9. Un producto farmacéutico que comprende la composición de cualquier reivindicación anterior y una composición que comprende factor von Willebrand como preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand o la hemofilia A.
- 35 10. Una composición que comprende factor von Willebrand y uno o más de galactosa, fucosa o N-acetilgalactosamina como un monosacárido aislado, para uso en el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand o la hemofilia A.
- 40 11. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el monosacárido aumenta la supervivencia del factor von Willebrand en la sangre de un mamífero por inhibición de la interacción del factor von Willebrand con un receptor de aclaramiento.
12. La composición para uso de la reivindicación 11, en donde el receptor de aclaramiento es un receptor tipo C semejante a lectina.
- 45 13. La composición para uso de la reivindicación 12, en donde el receptor tipo C semejante a lectina se selecciona de los subgrupos asialoglicoproteína y receptores DC y colectinas.
14. La composición para uso de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el receptor tipo C semejante a lectina se selecciona de ASGPR, CLEC4M, CLEC10A, CLEC4F, Collectin-12.
- 50 15. La composición para uso de la reivindicación 11, en donde el receptor de aclaramiento es un receptor de barrido clase A tal como el receptor de barrido A5 (SCARA5).

Figura 1:

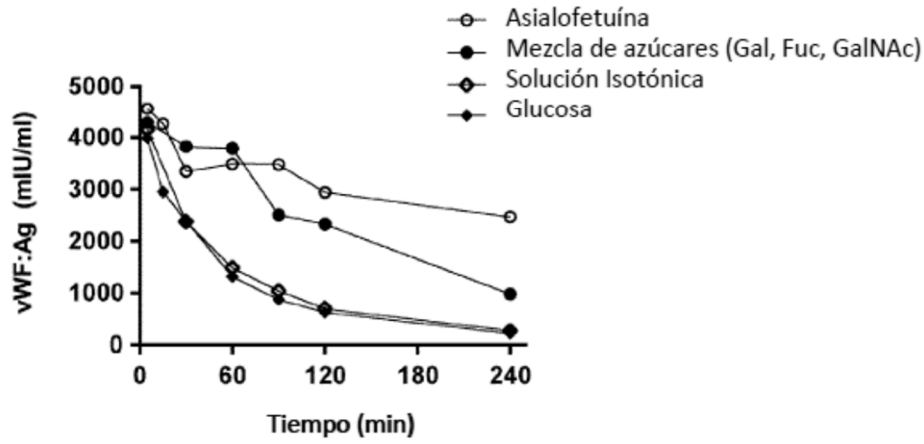


Figura 2:

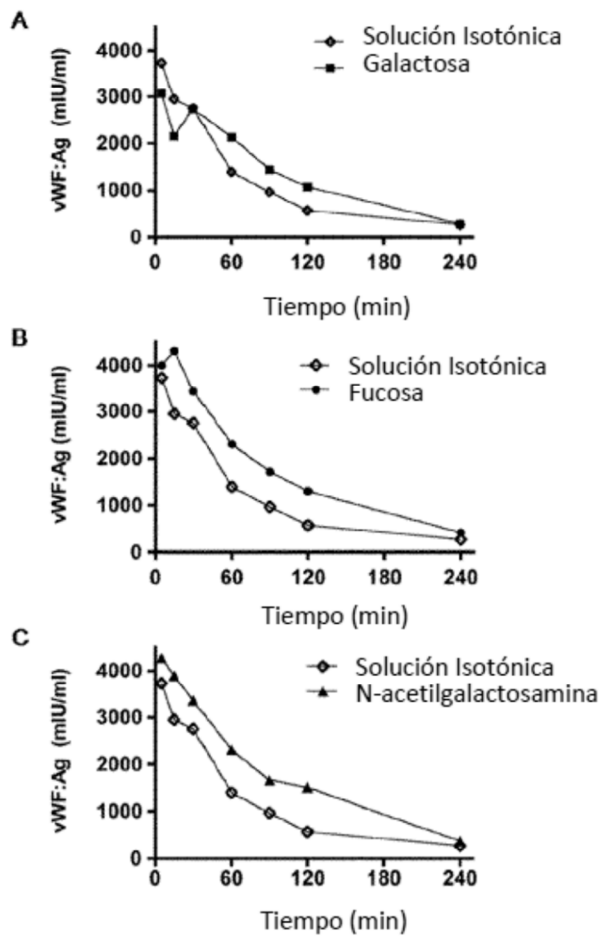


Figura 3:

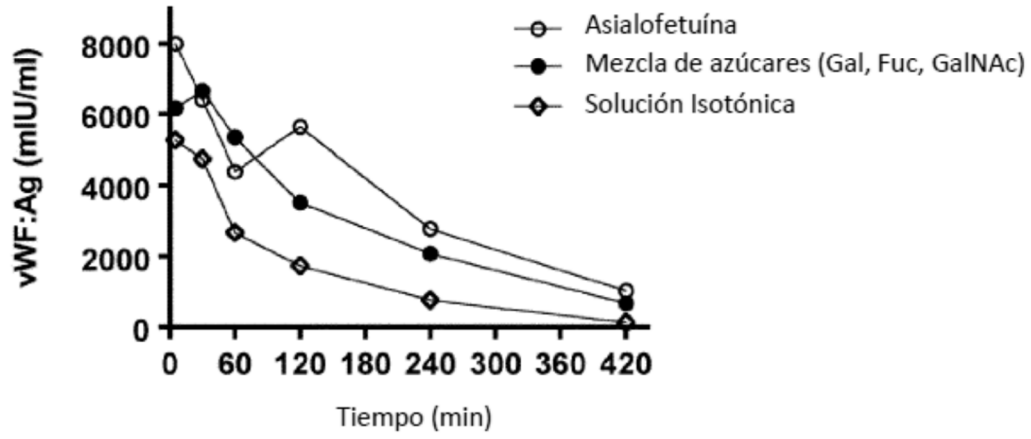


Figura 4:

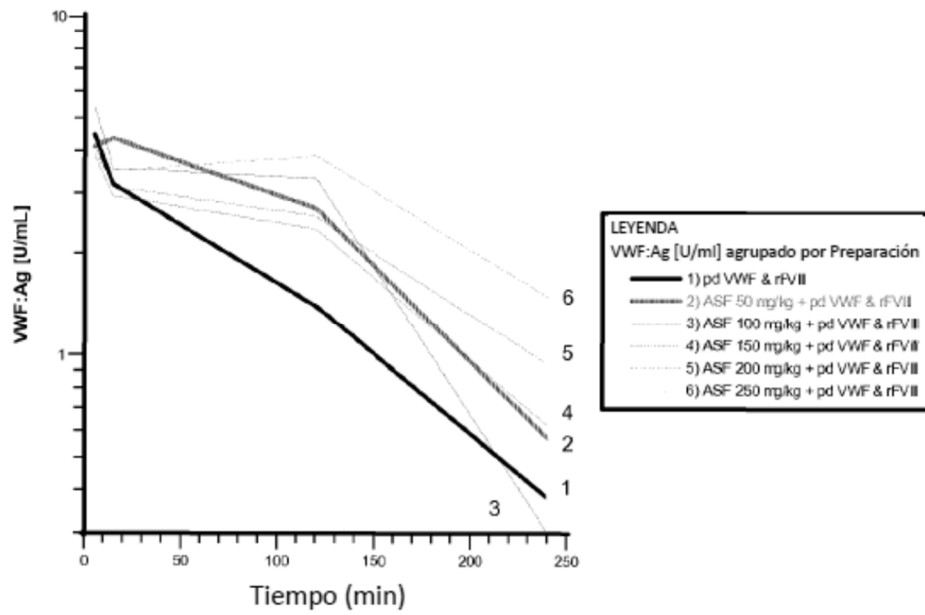


Figura 5:

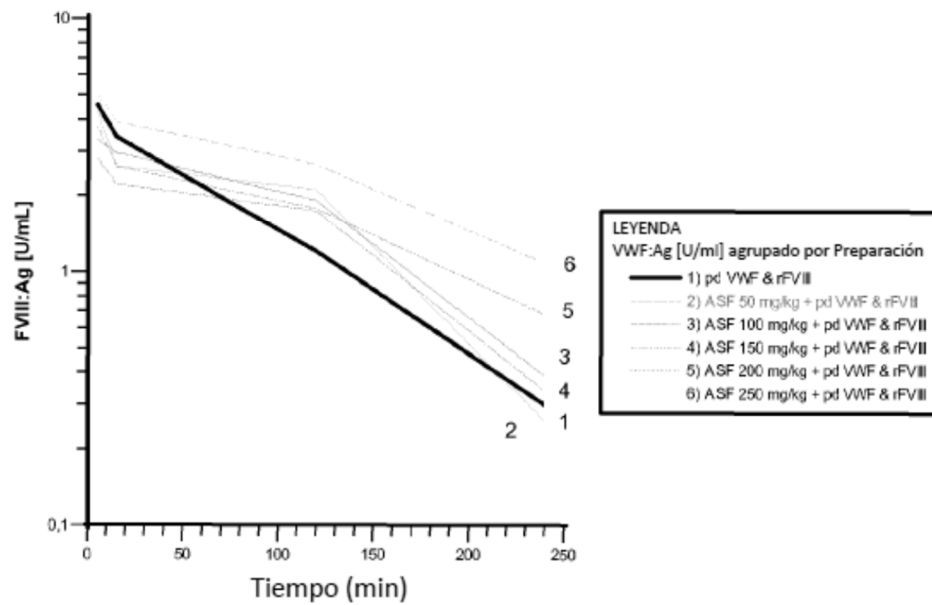


Figura 6:

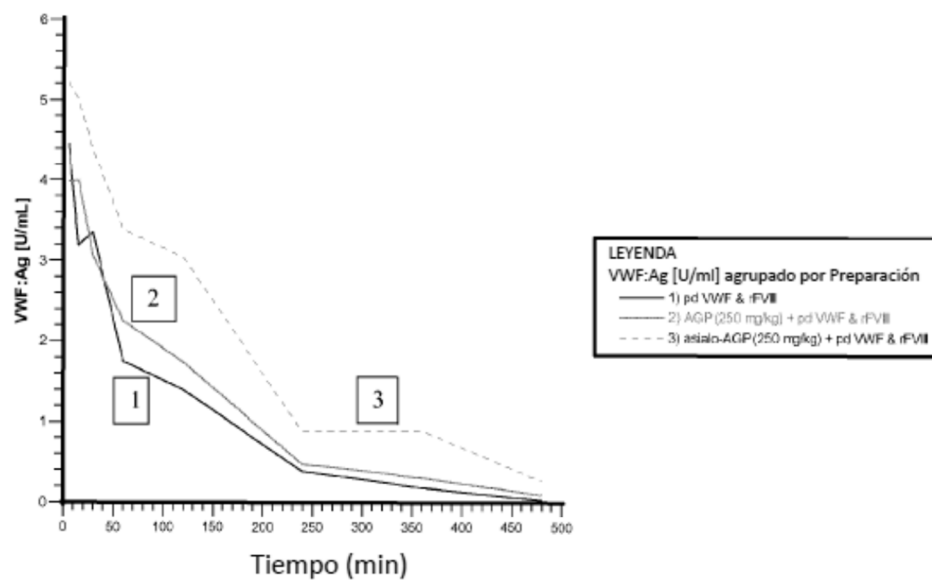


Figura 7:

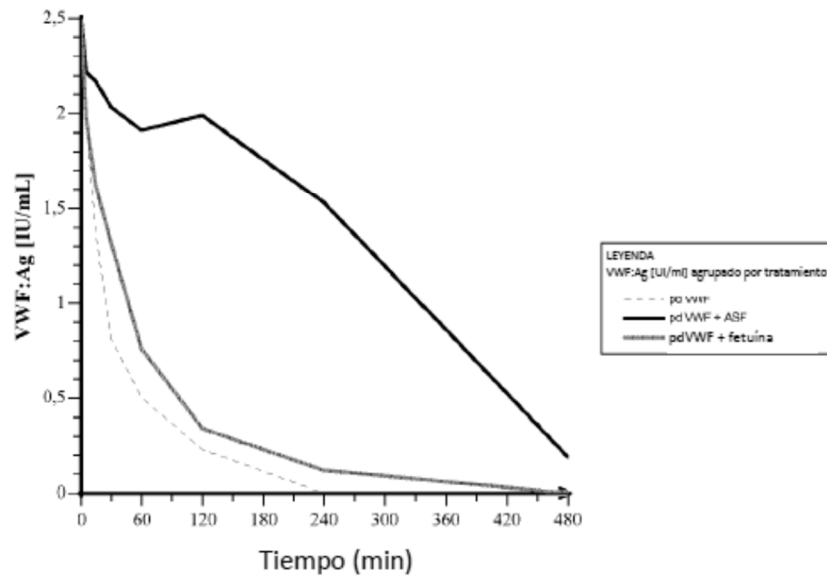
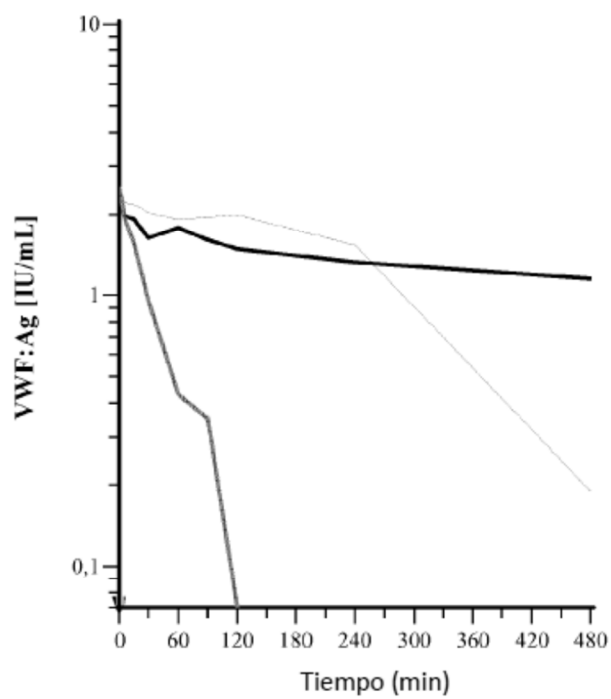


Figura 8:



LEYENDA

VWF:Ag [IU/mL] agrupado por tratamiento

— pd VWF + ASF (dosis múltiple)

— pd VWF + ASF (dosis simple)

····· pd VWF + sol. isotónica NaCl (dosis múltiple)

Figura 9:

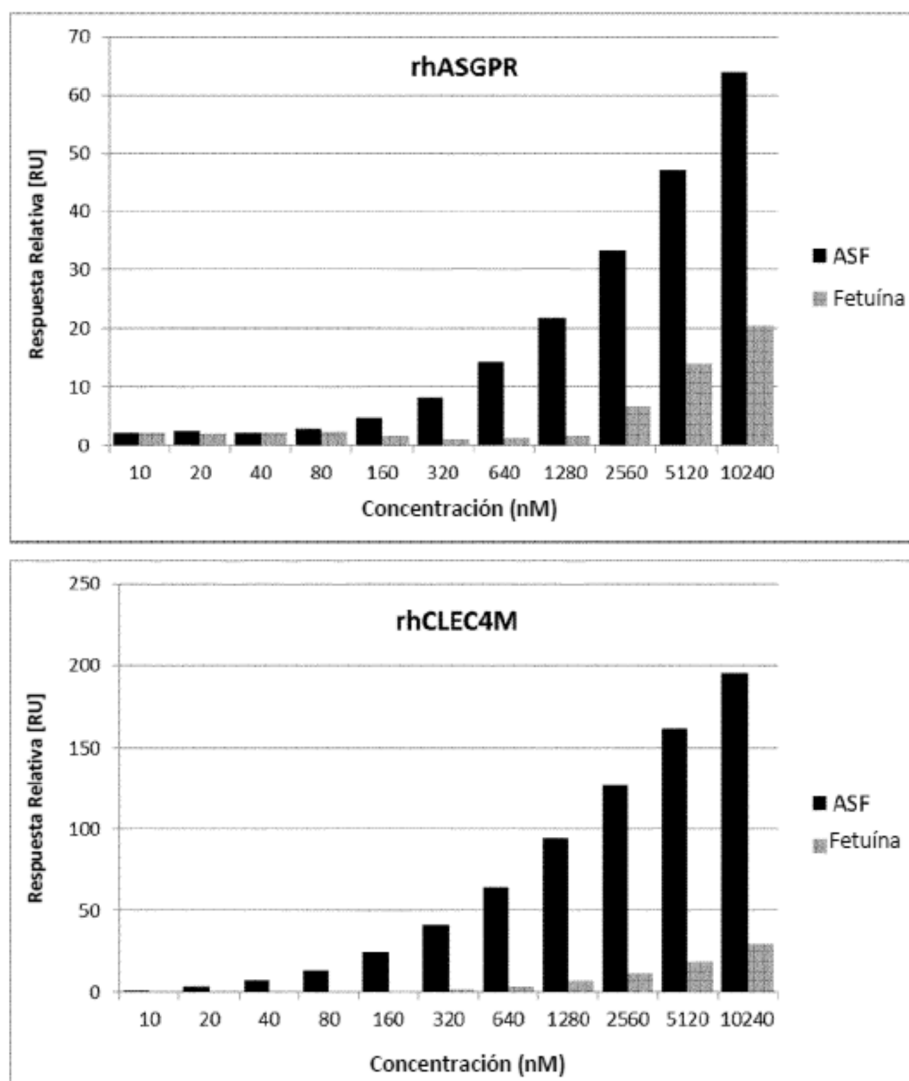


Figura 9, continuación:

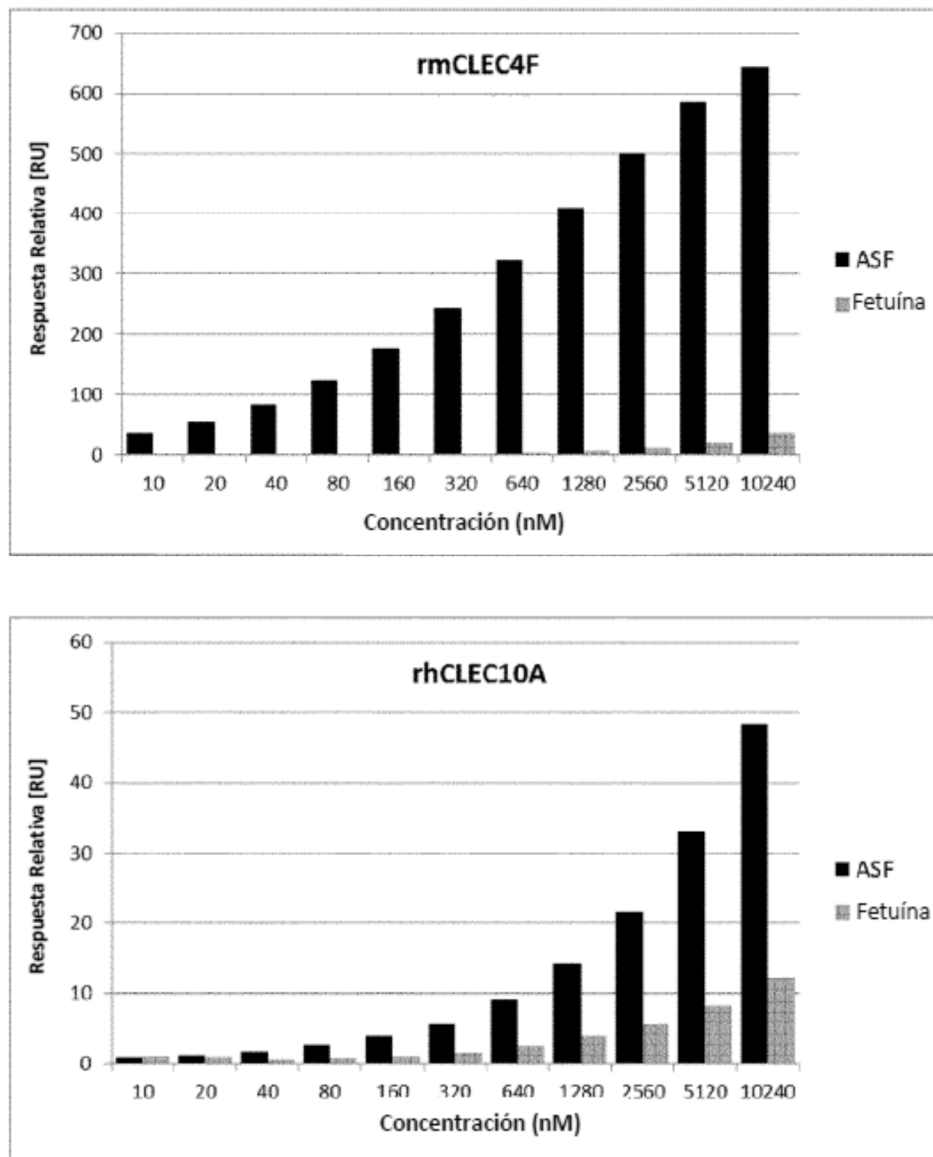


Figura 9, continuación:

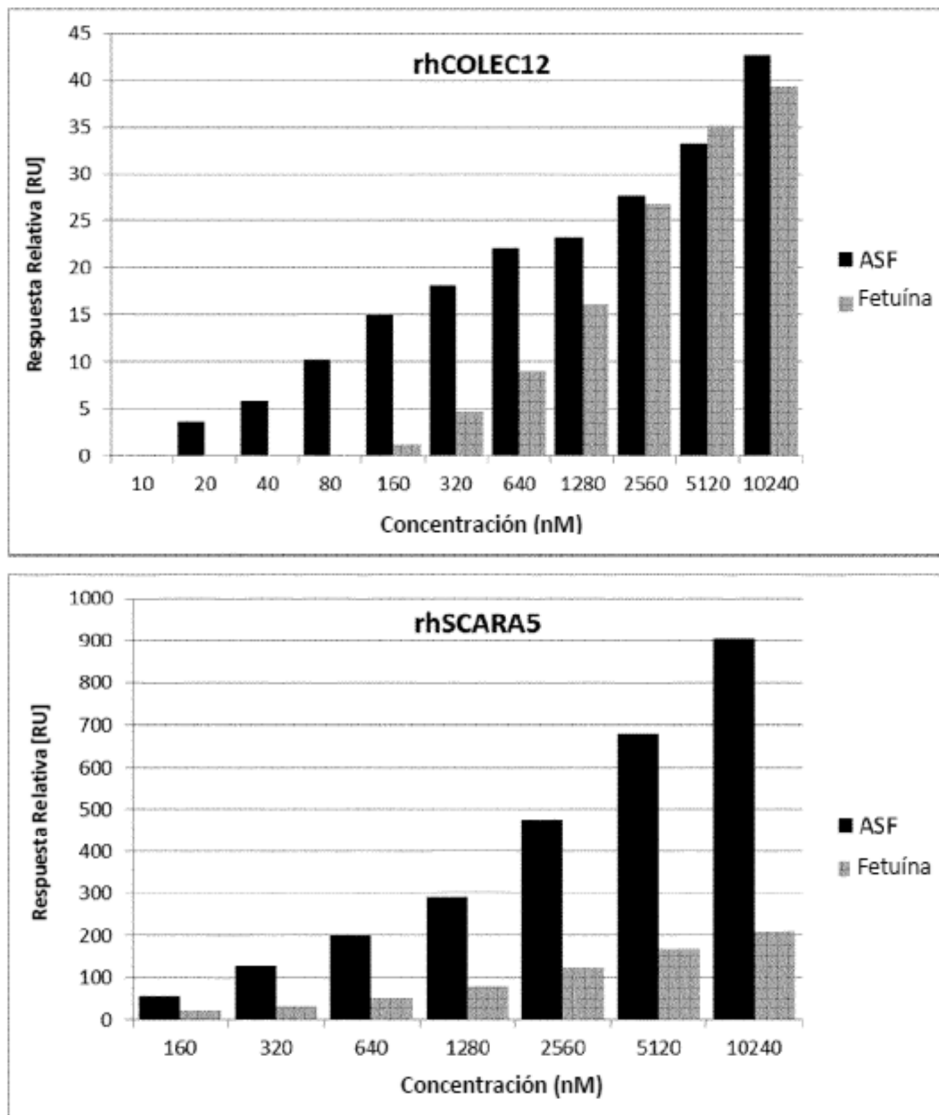


Figura 10:

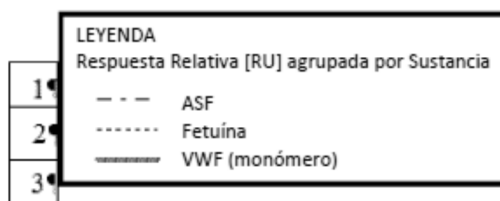
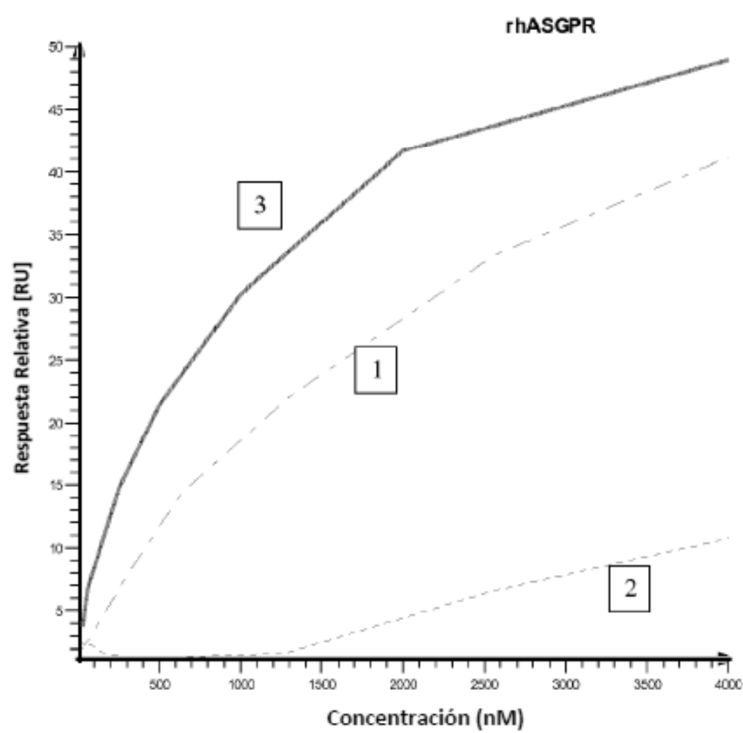


Figura 10, continuación:

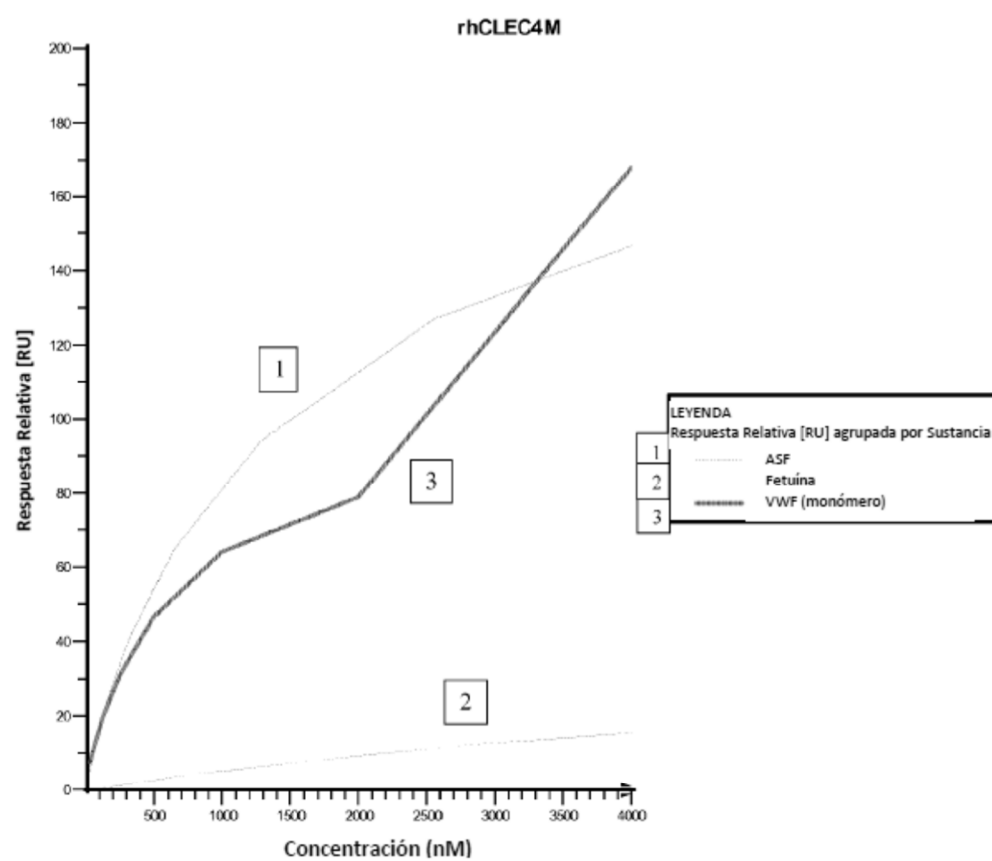


Figura 10, continuación:

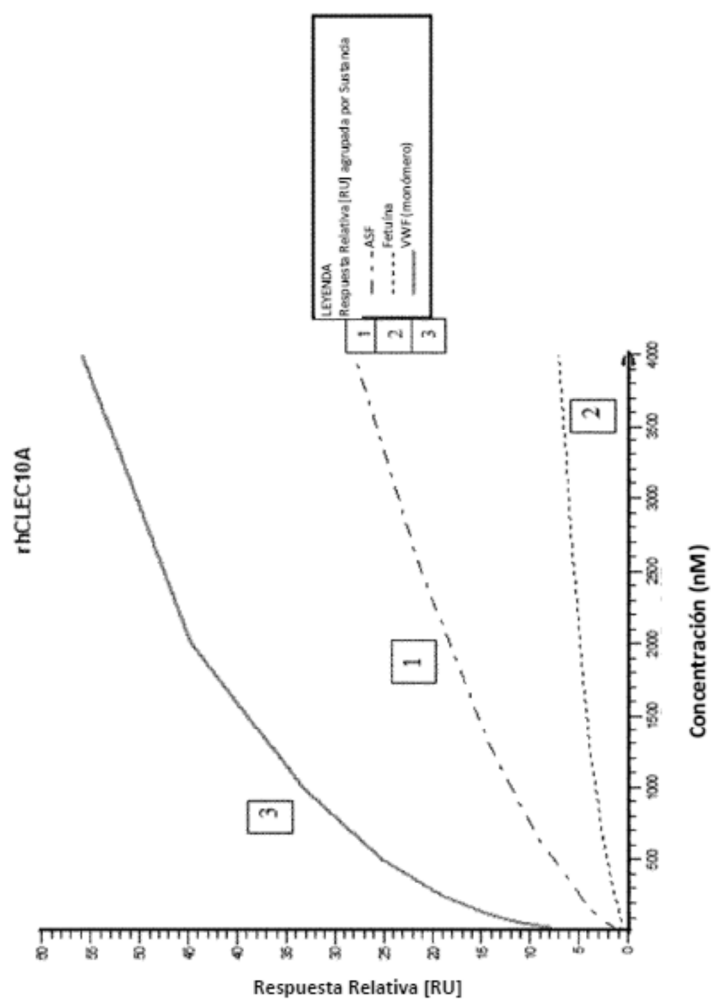


Figura 10, continuación:

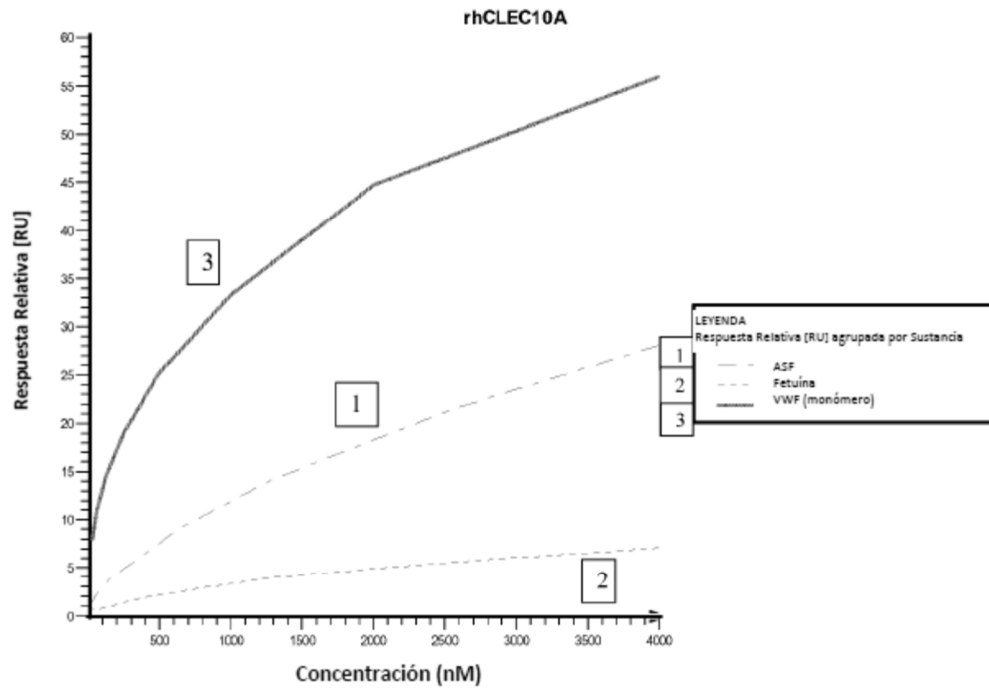


Figura 10, continuación:

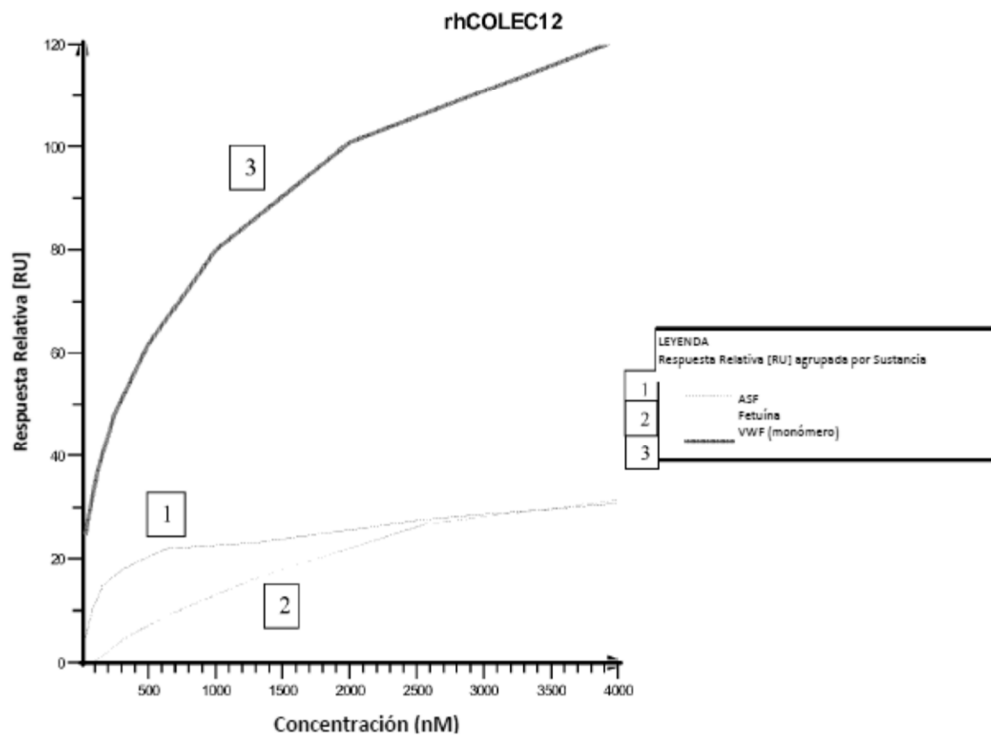


Figura 10, continuación:

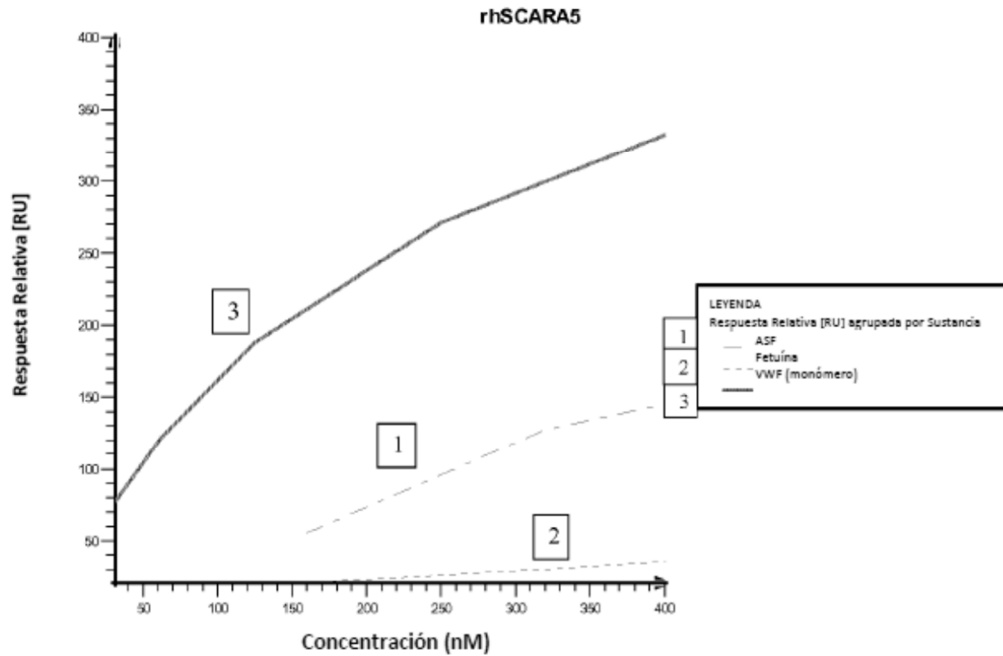


Figura 11:

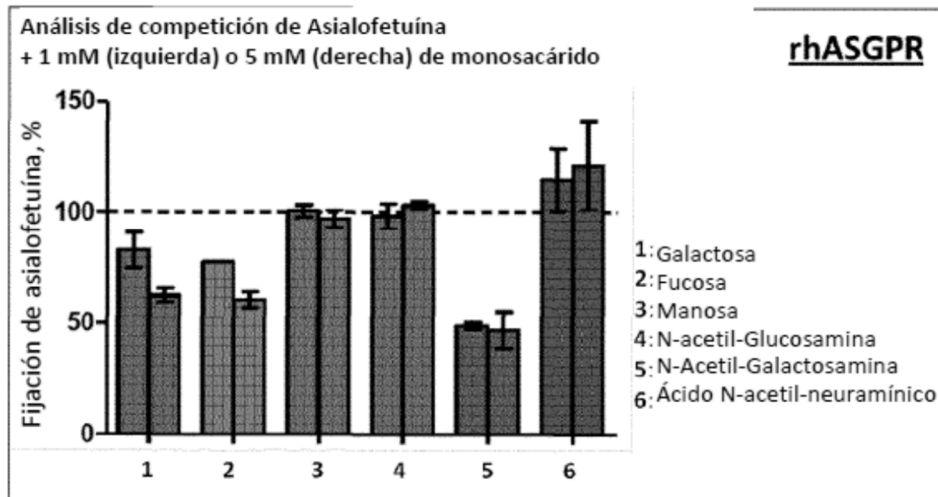


Figura 12:

